



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

BO 124 / 83

El Polimorfismo de la Glicerofosfato  
Deshidrogenasa en dos Poblaciones de la  
Garrapata Boophilus microplus.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Pablo Jesús Montoya Gerardo

México, D. F.

1983



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**A mis padres:**

Luis y Ramona; por su ayuda y por su ejemplo  
de amor y respeto de toda una vida.

**A mis hermanos:**

María Martha

Dora Helia

Luis Antonio

Maricela

José Francisco

Norma Beatriz

Silvia Soledad

Cielo Ramona

Angélica Rossana

e Iván Elías ..... por su compañía y por tantos días y momentos de grata convivencia y - amor fraternal.

Con todo mi cariño.

A mi Esposa Morfa Hilda:

Por ese gran sentimiento que nos une  
y por su eterna motivación.

Con todo mi amor.

A mi asesor M. en C. Sergio González M.

Por la oportunidad de realizar este trabajo  
en el laboratorio de Bioquímica de la ENEP -  
Iztacala.

Al M. en C. Jaime Curts G.

Por la minuciosa revisión de este manuscrito.

Gracias.

## TITULO.

EL POLIMORFISMO DE LA  $\alpha$ -GLICEROFOSFATO DESHIDROGENASA EN DOS POBLACIONES DE LA GARRAPATA Boophilus microplus.

## INTRODUCCION.

### 1.- Justificación.

- Significancia de técnicas bioquímicas en taxonomía animal.
- Técnicas electroforéticas.
- Técnicas cromatográficas.

### 2.- Bases teóricas del polimorfismo protéico.

- Mecanismos de síntesis de proteínas.
- Mutaciones.
- Recombinación.

### 3.- Bases ecogenéticas de la variabilidad protéica.

- La teoría del polimorfismo genético y el mantenimiento de la variabilidad genética.
- Polimorfismo cromosómico.
- Polimorfismo enzimático.

### 4.- Antecedentes de estudios de polimorfismo enzimático en artrópodos y en especial garrapatas.

### 5.- Generalidades de garrapatas e importancia económica y médica veterinaria en el contexto nacional.

OBJETIVOS.

MATERIAL Y METODOS.

RESULTADOS Y DISCUSION.

CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

## 1.- INTRODUCCION

### 1.- JUSTIFICACION.

#### SIGNIFICANCIA DE TECNICAS BIOQUIMICAS DE TAXONOMIA ANIMAL.

Se puede decir que la diversidad entre los seres vivos es casi infinita. No hay dos individuos exactamente iguales en todos sus detalles. Algunas veces las diferencias entre dos individuos de aspecto muy diferente pueden ser salvadas por una serie de otros individuos, difiriendo tan ligeramente cada uno del siguiente que no hay una interrupción apreciable en la serie. Por otra parte, la variabilidad entre los seres vivos, considerada como un todo, no es continua, puesto que exhibe muchas interrupciones distintas en diversas magnitudes, y el trabajo del taxónomo es organizar el conocimiento de la diversidad y variabilidad de los organismos, en un sistema de clasificación que refleje sus similitudes y diferencias, así como su origen evolutivo (Cronquist 1977).

Cualquier unidad de clasificación en Biología se denomina taxón, que Mayr (1969) define como "un grupo taxonómico de cualquier rango que sea lo suficientemente distinto para que se le pueda asignar una categoría definida".

El taxón básico es la especie. La palabra especie es tomada de el latín donde significa un tipo o clase particular. Se ha encontrado que el concepto de especie entraña ciertos problemas en cuanto a que no puede construirse una definición universal que pueda usarse para decidir en to -

das las situaciones si un conjunto determinado de poblaciones pertenece a una única especie, o bien para describir en sí a una población como especie.

En el uso biológico y por conveniencia, como cita Raup (1978), una especie se define como una población o un conjunto de poblaciones reales que viven en un hábitat común y definido, o potencialmente fecundas entre si y que estan aisladas reproductivamente de otros conjuntos parecidos en condiciones naturales.

Esta definición no puede ser aplicada globalmente porque:

1.- No incluye a los organismos fósiles, al no poder constatar que en una comunidad fósil hubo intercambio genético.

2.- No toma en cuenta a organismos asexuales y partenogénéticos.

3.- Se restringe a situaciones simpátricas (Raup 1978).

Ante esto algunos autores se apresuraron para concluir que el concepto de especie biológica era inválido (Dobzhansky 1975b). No obstante, el desarrollo de la confrontación no fué la invalidación, sino el desarrollo en profundidad de el concepto de especie. Se reconoció que no todas las especies son fundidas por el mismo molde. La especiación se produce de diversas formas, dando lugar a diversos tipos de especies (Agamospecie, Especie Paleontológica, Especie Morfológica, etc....), pero existiendo unidad en la diversidad (Dobzhansky 1975a, 1975b). Porque podria ser excesivo decir

que no existen especies excepto en los individuos con cruzamiento sexual exogámico, pero esperar que las especies - sean unidades evolutivas de clase similar independientemente de su biología reproductora, no es sostenible, lo que - es casi más universal que la especiación, es la discontinuidad orgánica (Dobzhansky 1975b).

Así, la taxonomía tiene como objetivo el estudio de - la diversidad orgánica. Al considerar esta diversidad como el resultado de el proceso evolutivo, la taxonomía no sólo establece un sistema biológico que precisa las relaciones de los organismos entre sí, sino que se convierte en la base para la interpretación del proceso.

Siguiendo a Mayr (1969), encontramos que los factores más importantes del actual renacimiento de la taxonomía - son:

- La revisión de sus bases teóricas.
- El uso de computadoras en la llamada taxonomía numérica que ha revivido la aproximación nominalista.
- La bioquímica comparada, incluyendo la comprensión entre los biólogos moleculares de lo importante que es entender la filogenia de los organismos como base para interpretar la evolución de las macromoléculas.
- El desarrollo de la etología comparada y su conjunción con la sistemática.

Y se podría añadir, la comprensión creciente entre -- los no taxónomos de que no es posible algún estudio comparado en biología, ya sea bioquímico, anatómico, embriológico

co, biogeográfico o ecológico, sin un sistema biológico general de referencias, y este sistema es el objeto y fruto de la taxonomía.

Dentro de los rasgos distintivos que conforman la problema de la taxonomía actual tenemos principalmente a la situación del taxónomo profesional cuyo objetivo es la identificación, a la persistencia de una taxonomía esencialista (aristotélica-linneana), a la taxonomía numérica y a las bases de la taxonomía filogenética o evolucionista. - (Halffter, 1978)

Así tenemos que para aquellos profesionistas cuyo objetivo es la identificación de un determinado individuo, - es decir, saber a que especie pertenece, las polémicas que se forman en torno a las diferentes corrientes en taxonomía e incluso las posibilidades de la taxonomía numérica, - son actividades superfluas cuando no molestas, ya que les obliga a extraer información que necesitan de trabajos con disquisiciones filogenéticas, cuya utilidad práctica en -- encuentran discutibles. Desde su punto de vista y para sus - fines, éstas personas tienen razón, y de ninguna manera se debe menospreciar sus necesidades y funciones. Ellos usan la taxonomía para una labor: identificar. (Halffter, 1978)

El proceso de identificar no es solo ocupación de coleccionistas y hombres de museo, sino también una tarea cotidiana en la que se basan trabajos de control de plagas agrícolas y pecuarias, campañas sanitarias, estudios ecológicos y de calidad del medio ambiente, etc.. Es este un --

trabajo básico pero no es ni el único ni el principal objetivo de la taxonomía actual. Y confundir el total del trabajo taxonómico con la identificación, es pasar a la sistemática de ciencia a técnica.

Así pues, conviene distinguir entre dos actividades - que al extraño puedan parecer iguales: clasificar e identificar.

La clasificación es un proceso inductivo. Evalúa muchos caracteres (en un planteamiento utópico, todos los morfológicos y de otro tipo). El clasificador trabaja con muestras de poblaciones y sus conclusiones se refieren a la especie como conjunto de poblaciones así como a los grupos supraespecíficos. Su objetivo es delimitar estos conjuntos y precisar su lugar en el sistema biológico. Este lugar no se debe a un azar sino que se pretende determinar en la forma más aproximada posible cual es el que le corresponde en un sistema que no es más que una representación de la evolución orgánica.

La identificación es un proceso deductivo. Se atiende a un esquema dado y en ella se trata de averiguar donde debe quedar colocado el espécimen con el que se está trabajando. Trabaja con individuos (muchos o pocos), no con poblaciones. (Halffter, 1978)

Por lo anterior, es comprensible que aún a la fecha se sigan publicando trabajos que puedan considerarse claramente dentro de la corriente esencialista (Mayr en 1969, -

llama esencialismo a la concepción Linneana de la taxonomía), pues como se mencionó anteriormente, el sistema esencialista es cómodo y funcional para fines de identificación.

El objetivo de Linneo era establecer un sistema que basado en descripciones precisas y sintéticas, permitiese ordenar en unidades de jerarquías crecientes todos los seres vivos. Pretendía que sus descripciones y agrupamientos reflejasen la "naturaleza" de los seres vivos. De aquí el nombre de su obra "Sistema Naturae". La naturaleza la entendía en el sentido aristotélico de esencia. Postulaba que todos los miembros de un taxón tienen la misma naturaleza esencial. La variación era considerada como trivial e irrelevante, cuando no como aberraciones de la naturaleza.

Esta concepción carece de sentido si no se considera a los taxa como fijos, y a las uniones entre ellos como absolutas. Incluso bajo estas condiciones, una falla sería (véase Mayr 1969) el no poder explicar porqué unas propiedades y otras no, son esenciales.

Las bases conceptuales de esta corriente taxonómica resultaron insostenibles después de 1859, al ser presentada una teoría que explica porqué existen especies y grupos naturales y cuáles son las razones de sus afinidades. Por este motivo, Darwin cambió por completo el sentido de la taxonomía, pues la meta ya no fué describir y ordenar en un sistema las especies creadas, sino descubrir los resultados del proceso evolutivo y plasmarlos en una clasificac-

ción que forzosamente debe ser filogenética.

Para la taxonomía numérica (véase Sokal y Sneath, - - 1963) únicamente los individuos existen. Todos los agrupamientos no derivados de un índice de similitud son artificios de la mente humana. La taxonomía numérica pretende crear una clasificación en la cual los organismos estén agrupados de acuerdo con el grado total de similitud o diferencia. Dicho en otras palabras, los taxónomos fenéticos clasifican a los organismos con base en sus similitudes morfológicas en conjunto, y no en su genealogía.

Esta concepción de la taxonomía, hecha posible por el uso de computadoras, da una falsa interpretación de la relación entre similitud y afinidad. Como Simpson (1961) enfatiza, los miembros de un taxón son similares porque comparten una herencia común. Para la taxonomía numérica pertenecen al mismo taxón porque son similares.

A pesar de que la taxonomía numérica no puede dar sola un sistema de clasificación de los seres vivos, porque ignora la base misma de la vida, la evolución, puede servir como un utilísimos método de análisis para medir la afinidad de especies y grupos de una sistemática que por necesidad, debe ser filogenética.

Podría hacerse la siguiente pregunta....¿Porqué el sistema tiene que ser de naturaleza filogenética?.... La respuesta está en que sólo éste expondrá las relaciones genealógicas de parentesco, y son éstas las que determinan la a-

finidad entre los seres vivos que no es igual a la semejanza entre ellos. Así, encontramos que la diferencia más importante entre la taxonomía filogenética y no filogenética reside en que ésta última no incorporan la dimensión genética.

De esta manera, tenemos que las especies actuales (pero sobre todo los fósiles) caracterizadas mediante criterios morfológicos, sólo corresponden en forma aproximada a las especies biológicas o "genéticas". De lo anterior no puede inferirse una contraposición fundamental entre el concepto morfológico y genético de especie; únicamente señala el grado de exactitud con el que la práctica taxonómica resuelve la tarea que la teoría de la sistemática le presenta. La taxonomía filogenética trata de establecer clasificaciones morfológicas como una primera aproximación al deseado sistema filogenético, y está pronta a modificarlas en concordancia con las evidencias que le aporten la bioquímica, genética, etología etc., a medida que vaya siendo posible incorporarlas. Este es un procedimiento lógico que no puede considerarse inconsistente. (Halffter, 1978)

Así pues, la clasificación del fenotipo constituye únicamente una primera etapa. En la segunda, se trata de inferir el genotipo, el programa de evolución genética, cuyo valor de explicación y predicción es muy superior. El fenotipo puede mostrar muchas similitudes irrelevantes; sólo el análisis del genotipo inferido permite determinar si las similitudes son debidas a convergencia o a la expre --

sión de un genotipo ancestral.

Aquí es donde encontramos que las técnicas bioquímicas cobran un gran significado en estudios realizados tendientes a descifrar o inferir un genotipo dado a través de sus características bioquímicas, tales como proteínas, enzimas, péptidos y patrones de aminoácidos libres.

Estas características bioquímicas son muy importantes porque a través de ellas se ha detectado una gran variabilidad entre poblaciones emparentadas que antes resultaba completamente insospechada. De esta forma ha sido posible diferenciar genotipos que no difieren en lo más mínimo en sus caracteres externos (Ayala, 1973; Ayala y Dobzhansky, 1974); o bien a diferenciar especies tan parecidas morfológicamente que muchas veces, el reconocimiento de sus fenotipos es insuficiente para distinguir entre varios componentes de un grupo. (Micks, 1954). En algunas ocasiones se han encontrado diferencias bioquímicas constitutivas entre poblaciones de una misma especie que se encontraban en diferentes latitudes (Micks, 1957), y también ha sido posible correlacionar un determinado factor medio ambiental con la presencia de ciertas características o propiedades de un componente bioquímico en poblaciones naturales (Clarke, 1975).

Dentro de las técnicas bioquímicas que más se han utilizado para el estudio de esta variabilidad no manifiesta fenotípicamente y con el propósito de una investigación -

las poblaciones, tenemos principalmente a la electroforesis en geles de almidón y acrilamida, y a la cromatografía en papel. A saber:

Las técnicas electroforéticas están enfocadas principalmente hacia el estudio de isoenzimas para la determinación de la variabilidad bioquímica en organismos animales.

El término de isoenzima (Markert y Moller, 1959) se refiere a formas físicamente distintas de la misma actividad catalítica las cuales difieren en su movilidad en electroforesis. Las aloenzimas (Prakash, Lewontin y Hubby, - - 1969) son productos proteínicos de un solo locus genético los cuales difieren en su movilidad electroforética y cuyo comportamiento segregacional en las poblaciones muestra un modelo mendeliano.

La naturaleza de los datos electroforéticos estriba en que los polipéptidos migran a través de un campo eléctrico a diferente velocidad, de acuerdo a su carga neta (la migración también puede depender del tamaño y la forma de las moléculas). Las proteínas que migran a diferentes distancias en un tiempo dado en un campo electroforético, deben diferir cuando menos en un aminoácido. La colinealidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de nucleótidos en el DNA, implican que estas proteínas fueran codificadas por segmentos de DNA que difieren cuando menos entre sí en un par de bases. Por eso, la movilidad electroforética de las proteínas nos provee de una información indirecta acerca del DNA, y de la práctica común de referir-

se a la segregación de proteínas como alelos. (Awise, 1974)

Los corrimientos en un campo electroforético se realizan en base a los extractos de diferentes tejidos de organismos individuales sobre un gel apropiado, localizándose la proteína con un método específico de tinción. De esta forma ha sido posible detectar una gran variabilidad proteica y evidenciar un alto grado de polimorfismo genético en poblaciones naturales de una misma especie, y más aún entre diferentes especies.

Sin embargo el alto grado de similitud entre la mayoría de las poblaciones conespecíficas han hecho difícil para la sistemática bioquímica la identificación de subespecies. Solamente donde las subespecies han experimentado una excepcional suma de divergencia (quizá debido a un fuerte aislamiento reproductivo por barreras geográficas) tienen poblaciones casi monomórficas para diferentes alelos. Ayala (1973) dió la primera descripción formal de un taxón en base a los modelos de aloenzimas, al describir un par de subespecies de Drosophila willistoni; y Ayala y Tracey (1973) en un trabajo posterior muestran que cerca del 20% de los loci presentan una considerable divergencia entre estas dos subespecies de Drosophila willistoni. Hunt y Selander (1973) y Awise y Smith (1974a) pudieron distinguir varios loci polimórficos en subespecies tanto del ratón casero Mus musculus, como de el pez agalla azul Lepomis macrochirus respectivamente.

Sin embargo, en otros casos, la taxonomía bioquímica -

por medio de técnicas electroforéticas no ha sido capaz de distinguir subespecies las cuales habían sido descritas por criterios de la sistemática clásica. Avise y colaboradores (1974a) no encontraron mayores diferencias entre cuatro subespecies descritas de Peromyscus eremicus donde solamente tres de veinticinco loci fueron distintos.

De las poblaciones pertenecientes a diferentes especies la mayoría muestra invariablemente muchas más diferencias genéticas que en poblaciones conoespecíficas. En este caso, no solamente los loci polimórficos sino también los loci monomórficos contribuyen a observar una distancia genética entre especies que son frecuentemente monomórficas para diferentes alelos. Los valores para los coeficientes de similitud genética indican que la mayoría de las especies relacionadas más cerradamente son casi completamente distintas en la composición alélica en un promedio del 25% al 50% de sus loci. (Avise, 1974)

Las grandes diferencias bioquímicas entre especies, hacen de las técnicas electroforéticas una herramienta de gran valor en la descripción e identificación de miembros de diferentes especies. Se ha encontrado que en especies aisladas de Drosophila (Hubby y Throckmorton, 1968; Nair, Brncic y Kojima, 1971; Ayala y colaboradores, 1970), Peromyscus (Smith, Selander y Johnson, 1974), de la rata canguro Dipodomys (Johnson y colaboradores, 1972), todas muestran una diferencia alélica entre el 20 y el 50% o más de sus loci.

Dentro de las principales ventajas teóricas de los datos electroforéticos sobre los otros criterios taxonómicos tenemos:

1.- Objetividad.- La enumeración de los alelos y sus funciones son determinaciones objetivas basadas en la movilidad de las bandas del gel.

2.- Constancia de los caracteres génicos.- Que permite el análisis y diferenciación de los organismos en diferentes etapas de su ciclo de vida, así como su sexo.

3.- Suma de la información genética.- Los datos aloenzimicos necesarios incluyen el número de loci examinados.

4.- Precisión.- Las técnicas electroforéticas arrojan datos más precisos del contenido genético de un organismo. Solamente la determinación de la secuencia de aminoácidos promete mayor precisión pero en el presente son técnicas muy laboriosas y caras.

5.- La analogía implica homología.- Para la mayoría de los loci examinados en la actualidad electroforéticamente, función común implica origen común.

Entre las desventajas existentes en la aplicación de la electroforesis a la sistemática tenemos:

1.- Restricción a organismos vivientes.

2.- Posible limitación en la identidad de las bandas. Pues hay un número finito de bandas distinguibles en un gel.

3.- Dificultades en el conteo de bandas.- Aunque la objetividad es una de las principales ventajas de la electroforesis, no siempre resulta fácil el análisis de un gel.

4.- No detección de diferencias protéicas.- Muchos cambios de nucleótidos puede ocurrir sin alterar las se --

cuencias de aminoácidos, y muchos cambios de aminoácidos - pueden ocurrir sin alterar la carga neta del polipéptido.

5.- No detección de las mutaciones totales.- Los datos electroforéticos no incluyen la información del número de aminoácidos diferentes entre proteínas. Dos alelos pueden estar separados por una o más mutaciones y no ser detectados por la electroforesis. (Awise, 1974)

Por otra parte, las técnicas de cromatografía en papel se han referido a análisis de los patrones de aminoácidos libres en insectos que difieren para cada especie (Micks, 1956); o simplemente con el análisis de los patrones dados en las revelaciones cromatográficas para el material positivo a la ninhidrina y al material fluorescente. (Haddon y Michel, 1951; Buzzati-Traverso, 1953)

El principal fundamento para la aplicación de esta técnica esta basada en la extraordinaria reproductibilidad de estos patrones para cada especie. Así encontramos que Don W. Micks en 1954 empleó la cromatografía en papel como herramienta para diferenciar los mosquitos Culex pipiens, C. fatigans y C. molestus, encontrando para cada especie - un patrón específico en cuanto a la aparición, movilidad y cantidad de los aminoácidos. En 1957, este mismo autor extendió sus investigaciones hacia diferentes especies de insectos y garrapatas, donde observó diferencias muy marcadas cuantitativamente en todos los géneros y especies estudiados. Estas diferencias generalmente comprendían varios-aminoácidos a nivel género, y en dos especies pertenecientes al mismo género la diferencia solamente estriba en el-

contenido de los aminoácidos o en uno sólo de ellos; e incluso llega a apreciar diferencias en las curvas de densidades de los aminoácidos entre linajes de una misma especie.

Como puede apreciarse, la aplicación de estas dos técnicas bioquímicas en problemas taxonómicos tiene una importancia significativa, y más aún por las diversas implicaciones que dejan entrever con la genética y evolución de los organismos (caso concreto, electroforesis).

De las dos técnicas mencionadas, indudablemente la electroforesis ofrece muchas más ventajas que la cromatografía en papel, pues esta última sólo nos da características constitutivas que nada o muy poco pueden revelar; mientras que las técnicas electroforéticas, al detectar la variabilidad protéica nos infiere la variabilidad genética existente y nos revela características funcionales fisiológicamente de las cuales es posible inferir relaciones filogenéticas, y en algunos casos, medio ambientales.

## BASES TEORICAS DE LA VARIABILIDAD PROTEICA.

Los rápidos progresos de la genética molecular durante las últimas décadas, han permitido explicar una síntesis - que abarca la comprensión de los procesos evolutivos a nivel molecular que han puesto de manifiesto que la variabilidad de una especie es muy superior a la postulada inicialmente por Darwin. (Ayala 1978).

Actualmente sabemos que un gen es un segmento de una - de las moléculas extraordinariamente largas de DNA de la célula que almacenan en su estructura la información genética del organismo. El proceso de la evolución biológica consiste precisamente en cambios en estas constituciones genéticas de los organismos. Cada individuo experimenta a través de su vida múltiples cambios en la morfología, fisiología, comportamiento y otros aspectos. Estos cambios carecen de - permanencia; desaparecen con el individuo, no obstante, los cambios que tienen lugar en los materiales hereditarios pueden pasar de un individuo a sus descendientes y, por consiguiente son acumulativos a lo largo de las generaciones. - Los estupendos cambios evolutivos que se han producido a lo largo de la historia de la vida, así como la notable diversidad de los organismos vivos, son el resultado de cambios genéticos acumulados. (Ayala 1980)

En la mayoría de los organismos la información genética está codificada en el Acido Desoxirribonucléico (ADN), - pero en algunos virus está codificada en una sustancia muy relacionada que es el Acido Ribonucléico (ARN). Tanto el --

ADN como el ARN son cadenas largas (polímeros) compuestos de cuatro tipos de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por una base nitrogenada unida a una pentosa —que en el ADN es desoxirribosa y en el ARN ribosa— y, un grupo fosfato.

Las bases nitrogenadas de los nucleótidos son de dos tipos: purinas y pirimidinas. Las dos purinas que se encuentran más comunmente tanto en el ADN como en el ARN son la adenina (A) y la guanina (G). Las dos pirimidinas comunes del ADN son la citosina (C) y la timina (T); el ARN contiene uracilo (U) en vez de timina. (Leningher 1978)

La información genética está codificada en la secuencia de bases nitrogenadas de la doble cadena de polinucleótidos en donde tenemos que las unidades básicas de información no son las bases individuales, sino grupos no imbricados de tres bases consecutivas. Dado que existen cuatro bases, el número de grupos diferentes de tres bases posibles es de,  $4^3 = 64$ . (Harper 1971)

Se ha encontrado que, de hecho, 61 de los 64 tripletes cifran los 20 aminoácidos que se necesitan para la síntesis de proteínas y por consecuencia, puede haber más de una palabra clave ó "codón" para un aminoácido determinado, siendo ésto lo que se ha dado en llamar "degeneración del código genético". Los otros tres tripletes restantes son de terminación. (Harper, 1971)

Así, la información genética contenida en el ADN dirige

ge el desarrollo y el metabolismo del organismo a través de los procesos de transcripción y traducción. El proceso de transcripción tiene lugar en el núcleo (constituyendo la excepción los genes de los cloroplastos y las mitocondrias) y es el mismo para todos los tipos de genes (estructurales y regulares). La secuencia de bases de un segmento de ADN se transcribe y da una secuencia complementaria de ARN de acuerdo con las mismas reglas de apareamiento que en la replicación de ADN con la excepción de que el uracilo se apareara con la adenina. Sólo se transcribe uno de los filamentos. (Ayala 1980)

El ARN transcrito a partir de los genes estructurales se denomina ARN mensajero (ARNm). Los ARNm transportan la información para la información específica de los aminoácidos de los polipéptidos. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido se denomina estructura primaria de dicho polipéptido que después determinan las estructuras secundarias y terciarias de la proteína. (Leningher 1978, Harper 1971)

El proceso por el cual la información codificada en la secuencia de bases del ARNm se usa para dirigir la síntesis de un polipéptido se denomina Traducción. Este proceso tiene lugar en el citoplasma y en él intervienen los ribosomas, las moléculas de ARNt para los diferentes aminoácidos y varias enzimas. Los ARNt están secuencialmente implicados en los apareamientos codón-anticodón. De ésta manera, los aminoácidos correspondientes se sitúan en posición, se forman los enlaces peptídicos entre los aminoácidos adyacentes y se sintetiza un polipéptido ó proteína. (Harper 1971, Lenin

gher 1978)

Hasta ahora se ha hecho referencia de una manera muy somera a los mecanismos de la síntesis de proteínas, que son las que nos van a evidenciar en un momento determinado, de una manera indirecta, la variación genética no manifiesta en caracteres externos de individuos de una población.

Sabemos que el proceso de la evolución depende de la existencia de la variación hereditaria, pues si la replicación del ADN fuera siempre perfecta, la vida no podría haber evolucionado y no podría haberse diversificado.

Los cambios que tienen lugar en los materiales hereditarios y que pueden ser manifiestos o no fenotípicamente se denominan mutaciones. En un sentido lato, la mutación se define como todo cambio en el genotipo que no se deba a la recombinación de genes; así, encontramos dos tipos principales de mutaciones: Las mutaciones génicas o puntuales son los cambios causados por sustitución, adición ó eliminación de un nucleótido o más dentro de una sección de un gen de ADN ó ARN. Las mutaciones cromosómicas son aquellas que cambian el número de los cromosomas, ó el número ó la ordenación de los genes en los cromosomas. (Dobzhensky, 1975)

Una mutación puntual se produce cuando un nucleótido es alterado y la nueva secuencia de nucleótidos pasa a la progenie. El cambio puede ser debido a la sustitución de uno ó más nucleótidos por otros ó a la adición ó delección de uno ó más nucleótidos. Las sustituciones que tienen lu -

gar en la secuencia de nucleótidos del DNA de un gen estructural pueden dar como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos del polipéptido o proteína codificada por el gen, si bien esto no es siempre así debido al carácter degenerado del código genético. (Ayala 1980)

En un gen estructural, una sustitución de nucleótidos que no cambie la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado puede ejercer poco efecto o ninguno sobre el organismo. Una sustitución de nucleótidos que cambie la secuencia de aminoácidos del polipéptido correspondiente ejercerá un efecto mayor ó menor sobre el organismo, según sea el grado en que la función biológica de la proteína esté gravemente afectada. (Ayala 1980)

Las adiciones o deleciones de un nucleótido ó más en la secuencia del DNA de un gen estructural dan como resultado una secuencia alterada de aminoácidos en el polipéptido codificado. A partir del punto de inserción ó deleción, el "Sistema de lectura" del código es desplazado, corridos al menos que el número de adiciones ó deleciones sea igual a tres ó a un múltiplo de 3. Las adiciones ó deleciones de pares de nucleótidos en números distintos de 3 ó múltiplos de 3 cambian completamente la conformación de las proteínas por lo que dependiendo de la función de la proteína pueden resultar letales o no. (Dobzhansky 1975)

Estos tipos de mutaciones puntuales descritas se producen espontáneamente, es decir, son debidas a causas naturales. No obstante, la frecuencia de incidencia de las muta -

ciones puntuales pueden aumentar por exposiciones a radiaciones de alta frecuencia (rayos uv, gamma, x), y por tratamientos con una variedad de sustancias químicas denominados mutágenos. Los mutágenos químicos incluyen la hidroxilamina, el ácido nitroso, varios agentes alquilantes como el gas mostaza y los epóxidos y ciertos compuestos aromáticos denominados acridinas. (Carlson, Sedefort, Logan y Jenkins 1967)

Las frecuencias de mutaciones espontáneas varían de un organismo a otro y de un locus génico a otro dentro del mismo organismo. En virus, bacterias y organismos unicelulares, las frecuencias de mutaciones observadas por gen y por división celular varían desde menos  $10^{-9}$  hasta  $10^{-6}$ . En los organismos superiores la mayor parte de las frecuencias de mutaciones varían desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-4}$  por gen y por gameto. (Citadas por Ayala 1980)

Como puede verse, las frecuencias de mutaciones de los genes individuales son bajas, pero hay que tomar en cuenta que cada individuo posee muchos genes y que las especies están formadas por muchos individuos.

Ahora, el cambio evolutivo no se produce sólo a través de mutaciones puntuales, sino también mediante cambios en la cantidad y organización de los materiales genéticos; y estos cambios evolutivos en la cantidad de DNA puede ser debido a una variedad de procesos incluyendo poliploidia, duplicaciones, deleciones, inversiones y translocaciones en cromosomas, que son, conjuntamente con las mutaciones puntuales los "responsables" de mantener constante la disponi-

bilidad de variantes en la reserva genética, que se reduce continuamente por la eliminación selectiva de las variaciones perjudiciales. Más sin embargo en cada generación la magnitud de variabilidad que agregan las mutaciones a una población dada es insignificante comparada con aquella que se produce por la recombinación de los genes que están presentes. Así, aunque la mutación sea la causa principal en cuanto aportes para mantener la variabilidad genética existente en las poblaciones no surge cada generación por mutaciones nuevas, sino por la reordenación mediante recombinación de las mutaciones acumuladas con anterioridad. Tenemos pues que la recombinación es en realidad suficiente por sí sola para permitir a una población que exponga la variabilidad escondida durante muchas generaciones, sin necesidad de un aporte genético mediante la mutación. (Sttebins 1978)

La reproducción sexual supone la fusión de dos células germinales (el espermatozoide y el óvulo en los animales) - que poseen cada una un solo conjunto de cromosomas en lugar de las dos dotaciones homólogas presentes en todas las células somáticas. Las células germinales se forman mediante los procesos de meiosis o división reduccional en la que el complemento normal de cromosomas se reduce a la mitad. En la primera etapa de la meiosis los cromosomas se duplican y los cromosomas homólogos se aparean. En esta etapa los cromosomas apareados pueden romperse por varios puntos e intercambiar fragmentos, proceso que recibe el nombre de recombinación. Los cromosomas resultantes son un mosaico de los cromosomas homólogos paterno y materno y presentan por tanto una combinación nueva de alelos. Ya en la segunda etapa-

de la meiosis cada célula se divide dos veces para dar lugar a cuatro células germinales en la que los cromosomas homólogos se distribuyan aleatoriamente, de modo que en cada célula germinal hay una mezcla de cromosomas maternos y paternos. (Ayala 1978)

De los 46 cromosomas propios de cada célula humana, - la mitad son copia de los que se han originado en el espermatozoide paterno y la otra mitad son copia de los que se han originado en el óvulo materno (igual para todas las especies de reproducción sexual). Los genes se presentan por tanto, en parejas, uno en un cromosoma materno y el otro - en el correspondiente cromosoma paterno u homólogo. Se dice que los dos genes de cada pareja ocupan un locus ó posición determinada en cada uno de los dos cromosomas homólogos. Existe, por ejemplo, un locus en un par de cromosomas homólogos que codifica el color de los ojos. Así, cada cromosoma puede contener muchos miles de loci génicos. (Ayala 1978)

Un gen en un locus determinado de un cromosoma, puede presentar formas variantes denominados alelos. En una población grande pueden existir varios alelos para un locus, aunque sólo puede haber dos en un individuo.

Cada alelo surge por mutación de un gen preexistente, y puede diferir en una o varios lugares de la secuencia de nucleótidos. Cuando ambos alelos de un locus determinado - son idénticos en los cromosomas homólogos de un individuo, se dice que el individuo es homocigótico para dicho locus.

Cuando ambos alelos son distintos, se dice que el individuo es heterocigótico para dicho locus. (Ayala 1978)

La variabilidad hereditaria, reflejada por la existencia de múltiples alelos en una población, constituye claramente un prerrequisito para el cambio evolutivo. Si todos los individuos de una población son homocigóticos para el mismo alelo de un locus determinado, no puede darse evolución en dicho locus hasta que no surja un nuevo alelo por mutación. Si por el contrario existen dos ó más alelos en una población, la frecuencia de un alelo puede incrementar a expensas de la del otro o de los otros como consecuencia de la selección natural, ante las nuevas combinaciones de alelos dadas por recombinación. (Ayala 1978).

La mezcla de los genes por recombinación (que genera nuevas combinaciones de alelos en el mismo cromosoma) y -- por la distribución aleatoria (que da lugar a combinaciones nuevas de cromosomas en las células germinales) no alterna por si sola las frecuencias génicas ni provoca evolución alguna en ausencia de la selección natural. Por lo tanto, el efecto de la recombinación consiste puramente en reordenar los genes existentes en una población de modo que, en cada generación, nuevas combinaciones de alelos se vayan exponiendo a la selección natural. La reproducción sexual genera, por tanto, una enorme cantidad de diversidad genética, incrementando mucho las posibilidades de evolución y suministrando a la población una adaptabilidad a un ambiente cambiante muy superior a la de una especie asexual. (Ayala 1978)

La pregunta acerca de la cantidad de variabilidad existente en las poblaciones naturales presenta un interés central para los biólogos y especialistas, ya que determina en gran medida la plasticidad evolutiva de una especie. No obstante, la tarea de estimar la variabilidad genética es difícil, ya que en cada generación se halla velada una gran cantidad de variabilidad que no se expresa en caracteres manifiestos. La razón de esto es que, en un individuo heterocigótico para un locus dado, sólo el alelo dominante es el que se expresa, y el recesivo queda velado. (Lewontin 1974)

Esta variabilidad velada puede ponerse de manifiesto cruzando organismos experimentales con parientes próximos, donde, algunos alelos recesivos escondidos en el estado heterocigóticos se harán homocigóticos y entonces se expresarán. (Stebbins 1978)

El problema con este tipo de técnicas mendelianas es que es importante obtener una muestra insesgada de todos los genes de un individuo, debido a que los análisis de la genética clásica (mediante cruzamientos de individuos con caracteres distintos) sólo detectan aquellos loci que son variables (que tienen alelos distintos). Como no había forma de detectar los loci invariantes, resultaba imposible obtener una muestra realmente aleatoria de todos los genes y por consiguiente saber en que proporción los genes de un individuo son heterocigóticos y cual es el grado de variabilidad genética. (Lewontin 1974)

La biología molecular vino a solucionar parcialmente este problema. Como muchos genes codifican proteínas, puede inferirse la variabilidad del material genético a partir de la variabilidad existente en las proteínas producidas por los individuos. Si una proteína determinada es invariante en los individuos de una población, el gen que codifica dicha proteína es muy posiblemente invariante; si la proteína es variable entonces el gen también es variable. Seleccionando cierto número de proteínas que representen una muestra insesgada de los genes de un organismo, resulta posible estimar el número de alelos de una población así como la frecuencia de los mismos. (Ayala, 1978)

Afortunadamente, para este tipo de estudios, existe una técnica sencilla, la electroforesis en gel, que permite estudiar la variabilidad proteica, invirtiendo únicamente una cantidad moderada de tiempo y de recursos. Desde finales de los años sesenta se ha venido explotando esta técnica para estimar la variabilidad genética en diversas poblaciones naturales. (Lewontin, 1974)

Así pues, la variabilidad observada en poblaciones naturales es muy superior a lo predicho por la teoría Darwiniana clásica. Los individuos, en vez de ser homocigóticos para el alelo dominante en la mayoría de los loci, son heterocigóticos en una proporción elevada de los mismos. Esto tiene consecuencias importantes, sobre todo para los animales que se reproducen sexualmente, y en cuanto al entendimiento de las implicaciones de adaptación de los organismos con su medio ambiente.

## BASES ECOGENÉTICAS DE LA VARIABILIDAD PROTEICA.

El polimorfismo genético se define como la presencia-continua en una población de dos ó varios alelos de algunos genes, ó de estructuras cromosómicas variables, las -frecuencias de las cuales se fijan en mayor ó menor grado- mediante selección (Dobzhansky 1975) ó bién, como la existencia conjunta en una misma localidad de dos ó más formas discontinuas de una especie en proporciones tales que la -más rara de ellas no puede mantenerse únicamente por medio de la mutación recurrente. (Ford, 1964)

Vemos entonces que el polimorfismo en poblaciones no es más la variabilidad genética cuando ésta es sumamente acentuada y discontinua. Esta variabilidad, como ya se señaló, es el producto de la acción combinada de la mutación,- cambios en la cantidad del genoma y de la recombinación.

Ahora sabemos que las poblaciones almacenan gran número de alelos, aún cuando no sean totalmente adaptativas en ese momento ó en ese lugar; se mantienen por el contrario- con frecuencias bajas en estado heterocigótico hasta que - el ambiente cambia resultando súbitamente adaptativos;.... Entonces surge una pregunta ¿Como mantienen las poblacio - nes naturales esos enormes reservorios de variabilidad ge- nética necesarios para responder a un ambiente cambiante?. .....porque cabría esperar que cuando un alelo resulta lo- calmente más adaptativo que otro, este último fuese elimi- nado gradualmente por la selección natural en favor de los más ventajosos hasta que todos los loci fueran homocigóti-

cos. La respuesta sería que la persistencia de alelos localmente desventajosos solo puede explicarse postulando mecanismos que mantengan activamente la diversidad por la variabilidad genética, a pesar de que las fuerzas selectivas tienden a eliminarla.

Uno de los principales mecanismos que permite mantener la variabilidad genética potencial es la superioridad del heterocigótico. Los heterocigóticos para dos alelos de un locus dado, o para segmentos cromosómicos u otros cromosomas que contengan agrupaciones de genes adaptativamente valiosas, son en algunos casos adaptativamente superiores a los homocigotos para cualquiera de los dos alelos ó agrupaciones de genes. Si el heterocigoto  $Aa$  sobrevive ó se reproduce mejor que el homocigoto  $AA$  y que el  $aa$ , entonces ningún alelo puede eliminar al otro. (Stebbins 1978). Uno de los mejores ejemplos de la superioridad del heterocigótico para dos alelos lo constituye el caso de la anemia falciforme. Esta enfermedad humana preponderante en Africa tropical y en Oriente medio, está causada por un alelo que da lugar a una forma variante de la hemoglobina, que es el pigmento-transportador de oxígeno de los glóbulos rojos.

Se ha comprobado que la hemoglobina S, descubierta en los portadores del gene de los glóbulos rojos falciformes - difiere de la hemoglobina A ordinaria en la sustitución de un solo aminoácido: contiene Valina (val) en lugar del Acido Glutámico (Glu) en la posición 6 de la cadena beta. Este cambio podría efectuarse mediante el reemplazo de una sola letra del alfabeto genético en el ADN y ARN que se producen

en el gen que porta la clave de la cadena beta de la hemoglobina. (Dobzhansky, 1975). Este ligero cambio en la estructura de la hemoglobina variante tiene efectos catastróficos: hace que las moléculas de hemoglobina formen largos filamentos en el interior de los glóbulos rojos. De ello resulta que las células se colapsan y adoptan una configuración de hoz, dando lugar a una forma grave de anemia que generalmente es fatal antes de alcanzar la edad reproductora. (Goodman et al 1975, Harris 1966)

Dado que el alelo falciforme es obviamente desventajoso, ¿por qué persiste en la población humana de África tropical con una frecuencia tan elevada como es el 30%?. Resulta que los individuos heterocigotos para el carácter falciforme se hallan protegidos frente a la forma letal de malaria, mientras que los homocigotos normales no lo están. El heterocigoto resulta, por lo tanto, claramente superior a ambos homocigotos. Se halla protegido frente a la malaria y no padece la anemia falciforme. (Goodman et al, 1975)

Un segundo mecanismo que permite que la variabilidad potencial se mantenga en las poblaciones es la Selección dependiente de la frecuencia. Se ha comprobado que algunos genes otorgan a sus portadores una ventaja adaptativa mayor cuando su frecuencia en la población es baja que cuando tienen frecuencias medianas ó altas. La selección adversa, como consecuencia, puede hacer que un gen sea más escaso hasta que alcance una frecuencia baja, después de lo cual puede llegar a un equilibrio en esa frecuencia baja. (Stebbins, 1978)

Clarke (1962) hizo una interesante sugerencia respecto a este mecanismo como causante de el polimorfismo de los colores y combinaciones de los mismos en las conchas del caracol terrestre género Cepaea. Las aves depredadoras de este caracol aprenden a distinguir sus presas por un determinado aspecto, y matan en consecuencia, un porcentaje desproporcionalmente alto de las variedades más comunes de este organismo, y un porcentaje relativamente baja de las más raras. La aptitud disminuye, por lo tanto, a medida que aumenta en frecuencia un color determinado. Se trata después, de una selección que depende de la frecuencia.

El hecho de que siempre hay un intervalo de tiempo entre la aparición de una mutación perjudicial y su eliminación por selección natural constituye una tercera modalidad por la cual las reservas genéticas pueden mantener ó aumentar la variabilidad. Si la mutación es recesiva, los heterocigotos tienen una apariencia normal y la selección no los elimina. Si tal mutación aparece cerca de un gen que tiene un valor selectivo especialmente alto, el gen recesivo desfavorable se transmitirá de una generación a otra siempre ligado al gen favorable contiguo hasta que los separa el Crossing-over. Se dispone de evidencia abundante que demuestra que esta "carga de mutaciones" de recesivos-desfavorables, está presente en poblaciones naturales. (Stebbins 1978). Pues cuando se tomó una población de Drosophila silvestre y se cruzaron sus individuos por varias generaciones, entonces comenzaron a aparecer un gran número de alelos letales y semiletals. (Ayala 1965, 1967)

Estos son los principales mecanismos por medio de los cuales la variabilidad genética se mantiene en las poblaciones naturales, suministrando amplias y mejores oportunidades a la evolución, y a las poblaciones un potencial adaptativo más alto. No resulta, pues, sorprendente que siempre que se materialice un nuevo desafío ambiental —un cambio de clima, la introducción de un nuevo depredador o de un nuevo competidor y la contaminación provocada por el hombre— las poblaciones generalmente están capacitadas para adaptarse al mismo.

Un ejemplo reciente muy impresionante de tal adaptación es la evolución hacia la resistencia a los pesticidas sufrida por varias especies de insectos. La historia es siempre la misma: cuando se introduce un insecticida nuevo, basta una cantidad relativamente pequeña para obtener un control satisfactorio de la plaga. Transcurrido cierto período de tiempo, ha de incrementarse la concentración del insecticida hasta que se torne totalmente ineficaz ó no rentable económicamente. En 1947 se consignó por primera vez, la resistencia de ciertos insectos a un pesticida, concretamente a la mosca doméstica (Musca doméstica) en relación con el DDT. Desde entonces en 225 especies de insectos, por lo menos y en otros artrópodos. Las variantes genéticas requeridas para la resistencia a los tipos más diversos de pesticidas se hallan evidentemente presentes en todas las poblaciones expuestas a estos compuestos elaborados por el hombre. (Ayala 1978)

Como se había mencionado anteriormente, la variabili-

dad genética es la causa del polimorfismo observado en las poblaciones, que se manifiesta mediante fenotipos discretamente distintos, por medio de un polimorfismo cromosómico a nivel de diferentes cromosomas y a través de la variabilidad de proteínas codificadas por un mismo locus.

Un buen ejemplo del polimorfismo dado por fenotipos levemente distintos lo constituye los diferentes patrones de coloración observados en los elitros (primer par de alas) de la mariquita asiática Harmonia axyridis, donde se cree que éstos diversos patrones de coloración están determinados por un gen polimórfico. (Ayala 1978)

El polimorfismo cromosómico es ocasionado principalmente por inversiones en las ordenaciones de los cromosomas, que trae como consecuencia (una entre otras) el bloqueo de la recombinación entre los genes situados dentro de ellas y entre sus homólogos en segmentos no invertidos que están dentro de inversiones diferentes. Esto trae como consecuencia la formación de supergenes, los cuales tienen una importancia evolutiva muy destacada. Sí es que el conjunto de genes que lo forman están coadaptados, pues será ventajoso para la población que conserven su integridad, viéndose el supergen favorecido por la selección natural, pero sólo mientras subsistan las mismas condiciones medioambientales. (Prevosti 1978)

Suele aceptarse que el polimorfismo cromosómico sea adaptativo (Dobzhansky 1975). Esta conclusión se basa en varias clases de datos, pues en la observación de las pobla-

ciones naturales, se ha comprobado que las variaciones de las frecuencias de las ordenaciones cromosómicas son paralelas a la de los factores ambientales importantes. Los resultados obtenidos experimentalmente en poblaciones de Drosophila pseudobscura concuerdan con las observaciones hechas en poblaciones naturales. (Dobzhansky y Flavosky 1957; Donzhansky 1975)

El polimorfismo en un loci particular detectado por la variabilidad proteica mediante ensayos electroforéticos, ha sido ampliamente estudiado en los últimos tiempos. Casi todas las poblaciones naturales han resultado ser polimórficas en un 30-80% de sus loci para genes estructurales, y un individuo ha resultado ser heterocigoto al menos en el 5-20% de sus genes estructurales. (Ayala et al 1971; Hubby y Lewontin 1966, Ayala 1980)

El descubrimiento de esta variabilidad genética para algunos pares de alelos ha ocasionado un amplio debate entre dos corrientes de evolucionistas: Los neutralistas y los seleccionistas. Los neutralistas sostienen la idea de que el amplio polimorfismo enzimático encontrado en poblaciones naturales y detectado por electroforesis es selectivamente neutro, y que la fijación de los genes ocurre por deriva genética. (Kimura y Ohta 1971b en Clarke 1975)

Los seleccionistas apoyan la idea de que el polimorfismo proteínico y las frecuencias de sus alelos están relacionados a factores medio ambientales y por consiguiente mantenidos por selección natural. (Richmond 1970; Nills-

1973)

Mas ésto último no resulta fácil de comprobar, pues a veces no se encuentra una explicación satisfactoria para el polimorfismo si se trata de relacionar éste con factores medio ambientales. (Kimura y Ohta 1971a). Por éso - la polémica entre neutralistas y seleccionistas continúa, y el éxito o fracaso de éstos últimos dependerá de su habilidad para demostrar los efectos directos de la selección natural sobre los loci polimórficos.

La naturaleza de los métodos para detectar el polimorfismo enzimático da ciertas ventajas a los seleccionistas puesto que los loci son identificados por su función. Por lo que han convertido su estrategia general en un programa sistemático para determinar si un polimorfismo enzimático está sujeto a selección. Los principales puntos son:

1) Se debe hacer un estudio bioquímico y fisiológico muy detallado de los productos enzimáticos de los alelos, haciendo notar cualquier diferencia entre ellos.

2) Conociendo la naturaleza de las diferencias entre las enzimas, la función de ellas y la ecología del organismo, se podrá postular uno o más factores selectivos y sugerir un mecanismo de conexión entre los factores selectivos y el producto genético.

3) Se deberá probar los mecanismos postulados por manipulación experimental, produciendo respuestas predecibles.

4) A la luz de los experimentos se deberá reexaminar la población natural y buscar una explicación comprensiva-

de los modelos observados de las frecuencias génicas. (Clarke 1975)

Existen trabajos que sí llenan todos estos requisitos, donde se ha detectado el efecto de la selección natural sobre un loci polimórfico particular (Clarke 1975; Vigue C.-L. y Johnson 1973), y otros en los que la relación se esboza pero los resultados no son tan completos y contundentes. (Johnson 1972, 1975)

Por otro lado, también es posible encontrar que parte de la variabilidad observada representa cambios a nivel -- funcional que no alteran la supervivencia ó éxito reproductor del organismo, pero que se fijan en la población al -- ser arrastrados junto con genes selectivos, sin ser puestos a prueba.

Ha de recordarse también que cada locus no se halla -- sometido a selección independientemente de los restantes. La unidad de selección es el organismo completo y no el locus cromosómico, y los alelos de los distintos loci interactúan en formas complejas para dar lugar a un producto final. Como es más probable que los alelos sean puestos a -- prueba como miembros del grupo que como unidades aisladas, el precio pagado por mantener la variabilidad en una población es en realidad muy inferior a lo que se había creído -- en un principio. (Ayala 1980)

ANTECEDENTES DE ESTUDIO DE VARIABILIDAD PROTEICA EN ARTROPODOS Y EN ESPECIAL GARRAPATAS.

Combinando la electroforesis con métodos de tinción - histoquímica, Hunter y Markert (1957) desarrollaron la técnica del Zimograma para identificar enzimas en extractos - de tejidos. Su aplicación pronto condujo al importante descubrimiento de las isoenzimas ó formas moleculares múltiples de una misma enzima (Markert y Moller 1959). Hans Laufer (1960) aprovechó esta técnica para estudiar diferentes formas enzimáticas en el desarrollo de los insectos, utilizando los gusanos de seda Hyalophora cecropia y Samia cynthia. Y hace 16 años, la técnica fué introducida en la genética de poblaciones cuando Hubby y Lewontin (1966) y Harris (1966) intentaron sistemáticamente medir la variación genética en poblaciones naturales, seleccionando muestras de proteínas elegidas al azar.

Así, Hubby y Lewontin (1966) se esforzaron por elaborar una técnica que satisficiera los siguientes requisitos:

- 1) Las diferencias fenotípicas a causa de la sustitución de alelos de un solo locus deberán poder descubrirse en cada organismo individual.
- 2) Las sustituciones en un locus deberá poder distinguirse de las sustituciones que ocurran en otros loci.
- 3) En una proporción considerable de las sustituciones de alelos deberán poder distinguirse unas de otras.
- 4) Los loci estudiados deberán ser una muestra auténtica del genoma en relación con sus efectos fisiológicos y grados de variación. Y como hemos señalado, el estudio de la movilidad electroforética de las proteínas puede

considerarse como el mejor método disponible para llenar - estos requisitos.

Hubby y Lewontin (1966) utilizaron para sus estudios - la mosca Drosophila pseudobscura donde los análisis elec - troforéticos permitieron distinguir diferentes alelos para los siguientes locus: para el locus de la enzima esterasa - 5 distinguieron seis alelos en la población; para la málico deshidrogenasa, cuatro alelos; para la leucina amino - peptidasa, cuatro alelos; se encontraron tres diferentes - fosfatasas alcalinas con dos alelos cada una.

Dentro de las proteínas que no mostraron variación - genética se encontró a la glucosa 6 fosfato deshidrogena - sa, a la  $\alpha$ glicerofosfato deshidrogenasa y a dos diferen - tes fosfatasas alcalinas. Este fué uno de los trabajos pio - neros que empezó a poner al descubierto la gran variabili - dad genética de las poblaciones.

Johnson et al (1966) analizaron electroforéticamente - la variación de seis enzimas en diferentes linajes de Dro - sophila ananassae "clara" y "obscura" de Samoa, encontra - do que cerca del 40-50% de los loci son variables para dos ó más alelos. En el caso de una esterasa (Est. C), la fre - cuencia génica para 3 poblaciones fué estimada, encontra - do marcadas diferencias entre los promedios de las frecuen - cias alélicas para las formas claras y oscuras de esta es - pecie de Drosophila.

Prakash, Lewontin y Hubby (1969) examinaron 24 enzi -

mas con control de los loci en los genes. Se tuvieran muestras de poblaciones naturales de Drosophila pseudobscura -- capturadas en tres localidades del Oeste de los Estados Unidos y en una de Colombia en Sudamérica. Se encontró que entre los genes examinados, el 40% aproximadamente son polimorfos en las diversas poblaciones. Solamente la de Colombia mostró un polimorfismo de menor grado, pero esta población muestra un aislamiento por una laguna de distribución de 2400 Km de ancho. Este trabajo, junto con el de Johnson et al (1966), no sólo demuestran que existe una gran variabilidad genética, sino que esboza ciertas diferencias de esta variabilidad entre los diferentes linajes y poblaciones de la Drosophila.

Posteriormente, Ayala y Powell en 1972, ya hacen un diagnóstico de especies de Drosophila en base a los modelos de aloenzimas. Ellos definen un locus como diagnóstico cuando un individuo puede ser correctamente asignado a una de las dos especies con una probabilidad de certeza del 99% ó más. Así por ejemplo, para Drosophila pseudobscura y D. persimilis ellos encontraron que un locus diagnóstico lo constituye el gene de la esterasa 5, donde las frecuencias de los diferentes alelos para este locus, son completamente diferentes y contrarios en las dos especies.

Sin embargo, entre dos poblaciones de una misma especie, no habían sido encontradas diferencias significativas, pues Ayala et al (1971) realizaron un estudio comparativo de polimorfismo enzimático y cromosómico entre diferentes poblaciones continentales e isleñas de Drosophila willisto-

ni, encontrando que los modelos para el polimorfismo enzimático son cerradamente similares en todas las poblaciones (de islas y continentes), pues aunque se encontraron diferencias locales y regionales en las frecuencias de los genes, generalmente los mismos alelos ocurren en altas, medias y bajas frecuencias en todas las poblaciones. En contraste, el polimorfismo cromosómico está muy reducido en poblaciones de las islas comparadas con las poblaciones continentales.

Ayala et al (1972a) continuaron con sus exploraciones sobre la variabilidad enzimática en la Drosophila willistonii, describiendo la variación alélica en 28 genes en poblaciones naturales de esta especie. El estudio fué realizado en aproximadamente 70 muestras que procedieron de distintas localidades que se extendieron desde la península de la Florida, México, América Central y América del Sur. Ellos encontraron que en promedio, el 58% de los loci son polimórficos en estas poblaciones, y que un individuo es heterocigoto en promedio del 18.4% de sus loci. En este trabajo también se observó que para la mayoría de los genes, las frecuencias en que ocurren los alelos son muy similares en todas las poblaciones. Cabe aclarar aquí que un locus es considerado polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no es mayor que 0.95.

No fué sino hasta 1973 cuando Ayala (1973) dió la primera descripción formal de un taxón en base a los modelos de aloenzimas. Dos subespecies de Drosophila willistonii fueron descritas en base a 5 loci diagnósticos, calcu -

lándose la probabilidad de la identificación incorrecta de un individuo en  $1 \times 10^{-10}$ . Pruebas subsecuentes de aislamiento reproductivo confirmaron que las poblaciones pertenecían al status de subespecies.

Una serie de estudios sobre la alcohol deshidrogenasa en Drosophila melanogaster (Gibson 1970; Day et al 1974a; 1974b; Vigue y Johnson 1973) parecen demostrar que el polimorfismo enzimático está sujeto directamente a la selección natural. Se encontró que en la mayoría de las poblaciones naturales del D. melanogaster son comunes dos alelos para la alcohol deshidrogenasa: (Gibson, 1970) el alelo "Fast" ( $Adh^f$  ó "F"), y un alelo "Slow" ( $Adh^s$  ó "S") llamados así por su relativa movilidad en gel de almidón a pH 8.6. Day et al en 1974a investigaron que la enzima "F" es menos estable al calor que la enzima "S" y que el heterocigoto  $Fs$  presenta un estadio intermedio; mientras que por su parte Vigue y Johnson (1973) mostraron que existe un clino latitudinal en la frecuencia del alelo "F" con 0.50 en el noroeste de los Estados Unidos en relación con 0.10 en la Florida. Este cambio en la frecuencia de F es consistente en relación con la temperatura ambiental, que en este caso puede pensarse que actúa como factor decisivo en la selección del locus de la ADH, pues la enzima F, menos estable al calor, es raro en el sur.

Gibson en 1970 enfatiza que la alcohol deshidrogenasa cataliza la conversión de varias cadenas cortas de alcoholes en sus correspondientes aldehidos o cetonas, encontrando también que la enzima del alelo F es casi doblemente ac

tiva que la enzima S cuando el etanol es usado como sustrato. Day et al (1974a; 1974b) también encontraron fuertes diferencias en la especificidad del sustrato entre las enzimas F y S; donde los extractos FF mostraron uniformemente más actividad usando N-propanol e isopropanol que los extractos SS. El heterocigoto FS aparece generalmente en un punto intermedio.

La explicación adaptativa que brindan Day et al 1974b es la siguiente: La mosca Drosophila melanogaster vive naturalmente entre frutas podridas ó en estado de descomposición, en donde existe un virtual baño de etanol y otros alcoholes, los cuales pueden alcanzar concentraciones del 10% ó más. A semejantes concentraciones estas sustancias pueden ser tóxicas, por lo que ellos concluyen tentativamente que la ADH actúa como una enzima desintoxicadora. Entonces ellos pueden predecir que una alta concentración en el medio de etanol favorecería la presencia del alelo F, situación que se confirma al consultar a Birley 1971 (citado por Clarke 1975)

Sin embargo, ahora se conoce que en la Drosophila una variedad de otros procesos fisiológicos están catabolizados por la ADH, entre ellos al proceso de conversión de retineno en retinol, una reacción crítica para la visión, y el proceso de conversión de gliceraldehído en glicerol, una entrada clave en el metabolismo de los ácidos grasos (Johnson 1980), por lo que, las fuerzas selectivas que actúan sobre cada uno de los loci particulares de la enzima ADH deben ser diferentes, lo que provoca cierta desconfianza

za en la interpretación de los resultados en tanto no se pueda documentar la función fisiológica específica de la variante enzimática de la ADH en estudio. (Johnson 1980)

Como puede observarse, la mayoría de los trabajos a nivel de artrópodos están enfocados hacia el estudio de la Drosophila, pues constituyen un material inmejorable para investigaciones de este tipo. Sin embargo existen trabajos en otros grupos como el realizado por Manning (1977), sobre el cladócero Bosminia longirostris en Bahía Unión, Washington, donde señala que las formas litorales (que son - cartas como rasgo distintivo) y las pelágicas (que son largas) expresan un fenotipo electroforético no sobrelapado de la enzima fosfoglucosa isomerasa. La correlación entre el largo del cuerpo y los patrones de fosfoglucosa isomerasa están al momento de la redacción del artículo, completamente a oscuras para el autor.

En trabajos sobre lepidópteros, Johnson (1976), señala que en las mariposas pertenecientes al género Colias, - solamente las poblaciones que viven en el hábitat de las - regiones montañosas, hábitat termicamente variable, son polimórficos para la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, mientras que las poblaciones de las áreas alpinas y de las tierras bajas, cuyas temperaturas no varían tanto, no lo son. Este trabajo fué realizado en cinco especies de Colias obteniendo resultados similares en todos los casos.

En el mismo trabajo, Johnson reporta que en varias poblaciones de Colias meadi ubicadas en diferentes localida-

des a lo largo de líneas de bosques madereros, donde ocupan hábitats alpinos y montañosos, dentro de una población única se ve una clina marcada de heterocigosis en la  $\alpha$ -GPDH. El alelo "F" (Fast) es casi monomórfico en las regiones alpinas, mostrando la  $\alpha$ -GPDH una marcada heterocigosis en las regiones montañosas, predominando el alelo "S" (Slow) en las regiones bajas.

Como explicación a este fenómeno se excluye el factor alimento, pues las larvas de C. meadii se alimentan por lo común de Astragalus<sup>+</sup> ó Trifolium<sup>++</sup> y existen localidades en que alguno de los dos es completamente excluyentes, -- siendo sin embargo los modelos del polimorfismo de la  $\alpha$ -GPDH los mismos en todas las poblaciones. Esto sugiere ampliamente que los factores térmicos sean los agentes causales selectivos más probables en el mantenimiento de este polimorfismo y del clino observado en la heterocigosis de la  $\alpha$ -GPDH.

Este mismo autor señala en 1974 que los loci de la GPDH de la Drosophila son generalmente mucho más polimórficos en las poblaciones templadas que en las poblaciones tropicales.

+ Astragalus. Leguminosa que crece en forma de maleza en -  
Oeste de E.E.U.U.

++ Trifolium. Trébol que puede ó no crecer junto al pasto-  
(Cronquist 1977)

Los trabajos efectuados sobre el gen que codifica para la  $\alpha$ GPDH han cobrado gran importancia, pues lo ubican entre los pocos loci en los cuales la función fisiológica parece clara, al ser uno de los responsables del mantenimiento de los potenciales de óxido-reducción (niveles redox) -- NAD/NADH en la célula. Se señala que estas enzimas aportan un medio por el cual una célula puede coordinar su respuesta metabólica frente a una perturbación fisiológica generalizada, tal como la que causa un cambio de temperatura (Johnson 1980). Una vez examinados estos loci (como se ha señalado anteriormente) parece presentar que la variabilidad está correlacionada con la temperatura.

Por otra parte, se encuentra la situación que son pocos los trabajos que se han efectuado en aspectos bioquímicos de las garrapatas, y más pocos aún los que tratan la variabilidad protéica en relación a la genética de poblaciones. En el primer caso tenemos como ejemplo los realizados por Reich y Zorzópulos (1978) y Zorzópulos et al (1978) en donde llevan a cabo una caracterización de proteasas en larvas de Boophilus microplus y de fosfomonoesterasas en la misma especie, por medio del método de centrifugación diferencial y cromatografía en columna. En el segundo aspecto, J. A. Healy es el único que hasta el momento ha reportado trabajos de este tipo, primero con la tesis realizada en 1976 en la Universidad Nacional de Irlanda sobre los sistemas de isoenzimas de la garrapata Ixodes ricinus; y posteriormente (Healy 1979a), con el mismo ácaro, detectando el polimorfismo de la  $\alpha$ glicerofosfato deshidrogenasa en 5 poblaciones distintas. Los experimentos fueron realizados so-

bre gel de almidón, y entre los resultados obtenidos se encontró que la actividad de la  $\alpha$ GPDH está positivamente relacionada con la actividad y eficiencia para caminar en I.-ricinus.

Las hembras heterocigóticas exhibieron una mayor actividad de la  $\alpha$ GPDH (ésto fué determinado por el teñido en las aloenzimas) que las homocigóticas, desarrollando además una mayor eficiencia locomotora. También se estudió cuales genotipos resistentes a la desecación y se encontró que el homocigoto SS seguido de FF son superiores al heterocigoto FS; situación contraria a la ya señalada de la actividad locomotora donde el heterocigoto aparece superior a los homocigotos.

En cuanto a las frecuencias alélicas, se encontró que existe una diferencia significativa entre las localidades - de donde procedían las muestras, y además, entre hembra y - macho. Con todo, Healy llega a la conclusión de que estos - estudios proveen una fuerte evidencia de que el polimorfismo de la  $\alpha$ GPDH puede tener una función adaptativa por medio de la selección equilibradora.

Este mismo autor (1979b) también trabajó con la enzima fosfoglucomutasa en poblaciones naturales de Ixoder ricinus por medio de electroforésis en gel de almidón, encontrando 10 formas variantes para esta enzima.

La proporción alélica en 5 poblaciones de estas garrpatas indican de que una diferenciación temporal y espacial

existe, pues se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre garrapatas activas en primavera y otoño dentro de una misma población, lo cual puede ser un indicio de que un proceso selectivo opera para mantener la particular frecuencia alélica y proporción genotípica en cada localidad y en cada estación para las diferentes poblaciones de garrapatas.

Se sugiere que este polimorfismo puede ser usado como una manera más de estudiar las relaciones existentes entre las diferentes poblaciones de Ixodes ricinus en Europa, -- así como para fines y estudios taxonómicos.

Como una explicación adaptativa al alto grado de polimorfismo que exhibe esta enzima, Healy sugiere la teoría - (la cual aclara que es meramente especulativa y con la intención de proveer una explicación ecológica) de que sí existen diferencias genéticas entre las aloenzimas de la PGM (por ejemplo, dependencia de la temperatura, sustrato ó requerimiento del ión Mg) entonces una población de garrapatas podrá tener un arreglo particular en las frecuencias de estas aloenzimas con capacidades variables para una adaptación específica a las condiciones medio ambientales.

Así, a través de los trabajos realizados, se aprecia que son pocos los casos en que la variación genética está correlacionada con el ambiente tal como lo prediciría una hipótesis adaptativa, pues tenemos que, si las variantes proteínicas detectadas por electroforesis reflejaran real-

mente la adaptación diferencial, entonces se podría predecir que la cantidad de esta variabilidad estaría correlacionada con la diversidad ambiental; sin embargo, en ningún caso, los factores del hábitat que son variados, son de importancia demostrable irrefutable para el locus que está bajo estudio. Así pues, como señala Johnson en 1980, la falta de un tratamiento experimental empíricamente suficiente, ha ocasionado que la evaluación experimental de las correlaciones ambientales y geográficas con la variación proteínica permanezca ambigua en la mayoría de los casos.

Aún así, a pesar de la ambigüedad de los estudios indicados anteriormente, casi todos los investigadores han concluido que la variación proteínica es adaptativa y que está mantenida por alguna forma de selección equilibradora.

GENERALIDADES DE GARRAPATAS E IMPORTANCIA ECONOMICA Y MEDICO-VETERINARIA EN EL CONTEXTO NACIONAL.

La garrapata es un ácaro hematófago de distribución mundial y cuya clasificación actual general es la siguiente:

Phylum	Arthropoda
Sub-phylum	Chelicerata
Clase	Acárida
Subclase	Parasitiformes
Orden	Metastigmata
Familias	Ixodidae
	Argasidae
	Nuttalliellidae

De estas tres familias, únicamente las dos primeras se encuentran representadas en México (Hoffman 1962).

Las familias Ixodidae y Argasidae se caracterizan por tener un cuerpo muy esclerosado, una cutícula gruesa coriácea, el hipostoma está provisto de dientes que sirven para fijarse a sus huéspedes, pueden tener o no escudo dorsal.- Esta última es una de las principales diferencias entre estas dos familias, pues una de ellas, la argasidae está formada por garrapatas blandas, llamadas así por estar desprovistas del escudo dorsal. La otra, la ixodidae está constituida por garrapatas que sí poseen el escudo dorsal.

Existen varias diferencias básicas entre estas dos familias de garrapatas. Las Ixodidae comprende la mayoría de

las especies parásitas del ganado vacuno, en cambio las Argasidae son principalmente parásitas del hombre, aves y murciélagos. Las Argasidae se alimentan en una forma moderada pero con frecuencia, mientras que las Ixodidae, particularmente en los estados de ninfa y hembra adulta toman sólo una abundante comida y aumentan el tamaño rápidamente. Los huevos de las Argasidae son depositados en varios grupos pequeños, mientras que los de las Ixodidae son depositados en un sólo grupo grande, después de lo cual la hembra muere. Las Argasidae viven varios años; las Ixodidae raramente más de dos y regularmente menos de uno. Las Argasidae son básicamente garrapatas tolerantes a la desecación mientras que la mayor parte de las Ixodidae no sobreviven por largo tiempo sin una adecuada humedad. (citado por Montoya G. 1978)

De estas dos familias, la que interesa a este trabajo es la Ixodidae, pues comprende el género Boophilus con sus dos especies existentes en México: annulatus y microplus. Existe otra especie que es la B. decoloratus pero ésta sólo se encuentra en Africa. (Hoffman 1962)

El género Boophilus es el que más estragos ocasiona a la ganadería y comprende a los Ixodidos que parasitan un sólo huésped sobre el cual realizan su alimentación, muda y cópula.

La hembra de B. microplus una vez apareada e ingurgitada, se desprende del huésped y busca refugio bajo pie -

dras, troncos, hojarascas, estiércol seco etc., donde permanece en un período de preoviposición el cual puede variar de dos a 39 días dependiendo de temperatura, humedad relativa y precipitación pluvial.

El cuerpo de la hembra sufre contracciones al estar depositando los huevecillos ya recubiertos con una secreción impermeable que los aglutina en forma de racimos de uvas. Al número promedio de huevecillos ovipositados es de 3500 por hembra. El tiempo de incubación para que se realice la eclosión de las larvas también es variable de acuerdo a las condiciones ambientales.

Las larvas recién nacidas que como característica poseen tres pares de patas, trepan de inmediato al pasto alto y arbustos para esperar el paso de un huésped al cual subirse. Este tiempo de espera o acecho suele ser variable pudiendo vivir las larvas sin tomar alimento hasta seis meses.

Una vez que la garrapata se encuentra alojada sobre el huésped empieza a succionar la sangre durante un período aproximado de seis a 18 días, creciendo al mismo tiempo, es entonces cuando muda y sufre la transformación a ninfa. Para entonces ya posee cuatro pares de patas pero todavía es asexual; se alimenta por un período de ocho a 13 días aproximadamente, durante el cual crece y sufre la siguiente muda, transformándose entonces en garrapata adulta definiendo sus caracteres sexuales. La hembra es fecundada y

sigue alimentándose para caer y así iniciar un nuevo ciclo de vida. La duración aproximada del ciclo en B. microplus incluyendo los períodos no parasitarios va de los 40 a los 279 días. (CNPA 1980)

La temperatura mínima que se requiere para el ciclo biológico de este ácaro es de 13.5 °C y con un 70% de humedad relativa; la altura sobre el nivel del mar actúa a veces como un factor limitado en el desarrollo vital, pero no siempre es decisivo. (CNPA 1980)

Entre los principales daños y pérdidas que ocasionan las garrapatas, se mencionan los siguientes:

a) Acción expolistriz.- Para alimentarse con la sangre del ganado, la garrapata perfora la piel, ocasionando con esto que el cuero sea inútil para su utilización en peletería; además las heridas profundas conducen con frecuencia a la formación de abscesos y constituyen los puntos de entrada de infecciones secundarias y miasis, aumentando así las pérdidas en el renglón de pieles.

b) Acción hematófaga.- El único alimento de las garrapatas es la sangre de los animales que parasitan. Cada garrapata requiere de 1.5 ml de sangre en promedio. En consecuencia, un bovino con una infestación alta pierde varios litros de sangre, lo que ocasiona anemia, retardo en el crecimiento, reducción de fertilidad (en los machos, esterilidad ó aborto en las hembras), susceptibilidad para contraer enfermedades, disminución de la producción de leche y carne, muerte por agotamiento, etc.

c) Acción infectante.- Las garrapatas del género Boophilus transmiten dos importantes enfermedades: La piroplasmosis y la anaplasmosis, que son producidas por protozoarios (ba pesia y theileria en piroplasmosis) con síntomas como anemia, inapetencia, ictericia, hipertemia, constipación (caso anaplasmosis), enflaquecimiento y muerte, dependiendo del nivel de infestación.

La presencia de garrapatas en los potreros también tiene una acción restrictiva al frenar el mejoramiento y desarrollo de la ganadería, dificultando en gran escala la introducción del ganado especializado, por ser éste altamente sensible a la garrapata y enfermedades que transmite. (Montoya G. 1978)

Por otra parte, se estima que las pérdidas económicas en nuestro país son superiores a los 3,000 millones de pesos anuales a causa de todos los factores antes mencionados, pues en nuestro país, como un factor muy importante, podemos señalar el hecho de que el servicio veterinario está apenas en formación. (Montoya G. 1978)

A todos los factores antes mencionados que limitan y obstaculizan el desarrollo de la ganadería en nuestro país, podemos agregar el temor al desarrollo de resistencia por parte de las garrapatas a los acaricidas empleados para su combate, tal como ha sucedido en Australia (S. Solís 1980) por mecanismos que se desconocen por completo, reduciéndose de esta manera, en gran escala, las alternativas de con

trol para este problema.

Todo lo anterior, motiva para el conocimiento más completo e integral posible sobre la biología de este parásito; es por ello, que ha sido elegido para el interesante - estudio del polimorfismo enzimático que presentan las especies, con sus implicaciones en la genética, evolución y adaptación de los organismos.

OBJETIVOS.

- Detección del polimorfismo de la  $\alpha$ -Glicerofosfato deshidrogenasa en hembras repletas de la garrapata Boophilus microplus.
- Obtención de las frecuencias génicas para los alelos encontrados de la  $\alpha$ -Glicerofosfato deshidrogenasa en dos poblaciones de Boophilus microplus.
- Determinación de las frecuencias genotípicas que presenta la  $\alpha$ -GPDH en las dos poblaciones de Boophilus microplus.
- Caracterización de las dos poblaciones de Boophilus microplus por medio del polimorfismo observado en la  $\alpha$ -GPDH.

MATERIAL Y METODOS.-

Las muestras de Boophilus microplus consistieron en hembras ingurgitadas que fueron obtenidas de las siguientes localidades:

a) Zacazonapan, Edo. de México.- Situada a 1200 m sobre el nivel del mar, en Latitud N de 19 05' y Longitud W de 100 14', con una temperatura máxima promedio de 31.6 C, con una temperatura mínima promedio de 17.1 C, y una temperatura media de 24.3 C. La precipitación total anual de 825.7 mm. (Bol. an. SARH 1977)

El clima es considerado semicálido, el más cálido de los templados, con un porcentaje de lluvia invernal inferior al 5% de la lluvia anual. (Según Köppen, modificado por E. García, Cartas de Clima, CETENAL)

b) Magdalena, D. F.- Situada a 2839 m sobre el nivel del mar, en Latitud N de 19 14' y Longitud W de 99 12', con una temperatura máxima promedio de 16.9 C (La temperatura máxima del año se registró en 26.0 C), con una temperatura mínima promedio de 5.1 C, y una temperatura media de 11.0 C. La precipitación total anual es de 1113.4 mm. (Bol. an. SARH 1977, Inst. Geog. UNAM-CETENAL 1975).

El clima se clasifica como semifrío con verano fresco largo y con un porcentaje de lluvia invernal inferior al 5% anual. (Cartas de Climas, CETENAL)

La recolección de las garrapatas se efectuó en forma-

directa, con los dedos y a contrapelo de los huéspedes. La identificación se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico y tomando como principal característica la profundidad de la escotadura presente en el primer par de coxas<sup>\*</sup>, ya que en B. microplus es bastante marcada, a diferencia de B. annulatus donde se presenta poco profunda.

En laboratorio, el trabajo se llevó a cabo con el método de electroforesis en geles de acrilamida; ésta se realizó verticalmente en tubos, con acrilamida al 7.5% según la fórmula siguiente: 7.76 g de acrilamida, 2.1 g de metileno-bis acrilamida en 50 ml de agua destilada. De esta solución se tomaron 40.5 ml previamente pasados por papel filtro que se adicionaron a 45.0 ml del Buffer Tris-borato pH 9.1, 135  $\mu$ l de TEMED y 4.5 ml de solución de Persulfato de Amonio (40 mg en 4.5 ml de agua destilada). (Weber K., 1969)

El buffer Tris-borato empleado en la elaboración del gel y utilizado en las celdas de la cámara electroforética estuvo constituido con 87 mM de Tris, 8.7 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA a pH 9.1 . (Ayala et al 1972)

Para los corrimientos electroforéticos se utilizaron garrapatas repletas, las cuales fueron molidas y homogenizadas en forma individual en 50  $\mu$ l del buffer Tris-borato ya descrito al cual se le adicionó el 5% de sacarosa. En tubos capilares se tomaron por succión bucal aproximadamen

\* coxa: primer segmento de los miembros que une a éstos con el cuerpo y sirve de asiento a las porciones móviles de los mismos.

te 30  $\mu$ l de los extractos, completándose el volumen del tubo con 50-60  $\mu$ l del buffer antes mencionado con ayuda de una microjeringa. Los tubos fueron sellados en uno de sus extremos con plastilina y parafina y centrifugados a 5000 RPM durante 10 minutos.

Del sobrenadante de cada tubo capilar, se colocaron 20  $\mu$ l en un tubo con gel (para la realización individual de los corrimientos), adicionando a cada uno de ellos 1 gota de glicerol y 10  $\mu$ l del azul de Bromofenol como indicador en el corrimiento, procurando una buena homogenización de esta mezcla. La electroforesis fué corrida a 250-305 voltios y 30-45 ma por espacio de una hora y 20 minutos. Posteriormente, los tubos fueron colocados en un vaso de precipitado con agua fría para facilitar su extracción, la cual fué realizada con una aguja especial paralelo y con sumo cuidado.

Para detectar las bandas de actividad de la  $\alpha$  GPDH en los geles, se empleó una solución que contiene 40 mg de  $\text{NAD}^+$ , 450 mg de  $\alpha$  glicerofosfato (substrato), 10 mg de NBT, 90 mg de EDTA en 50 ml del buffer Tris-HCl pH 8.5 (Ayala et al 1972), en donde se colocaron de 10 a 12 geles, usando como recipiente una probeta de 100 ml. Esto se incubó en la oscuridad por 1 hora y 30 minutos agregando al término de ese período 3 mg de PMS, volviendo a incubar en la oscuridad hasta la aparición de las bandas oscuras por un período entre 7 y 11 horas.

Después de que las bandas de la enzima aparece la reacción es parada por el lavado de los geles con agua. Las bandas detectadas se fijan con una solución de 45 par

tes de metanol por 55 partes de una solución de ácido acético (ácido glacial acético diluido 1:5 con agua). Después de 2 horas, los geles fueron colocados en una solución al 50% de la solución próxima pasada que se mencionó, para ser almacenados en refrigeración.

Las frecuencias génicas de los alelos son obtenidas en base al criterio de probabilidad clásica; las frecuencias genotípicas son obtenidas por el conteo directo de los patrones de bandas sobre los geles. Para las frecuencias esperadas, en el caso de las genotípicas, éstas se calcularon con expansión del multinomio  $(p_1+p_2+\dots+p_n)^2$ , donde  $p_1-p_n$  son las frecuencias de los diferentes alelos de acuerdo al criterio de Hardy-Weinberg, y ambas frecuencias (obtenidas y esperadas) son comparadas por medio de la prueba de Chi cuadrada. (Everitt, 1977)

En el caso de las frecuencias génicas, las esperadas se obtienen por medio de una tabla de contingencia de  $3 \times 2$ , dándosele el mismo tratamiento estadístico de la  $\chi^2$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION.-

Se observaron cinco patrones de bandas en los geles de acrilamida como consecuencia de la migración diferencial de la  $\alpha$ GPDH hacia el ánodo, proveniente de los extractos individuales de B. microplus.

Estos cinco patrones son resultado de la combinación de los 3 alelos encontrados, los cuales fueron denominados de la siguiente manera:

Alelo "M" ó muy rápido, por ser el que cubrió mayor distancia en el gel durante el tiempo de corrimiento, la frecuencia de aparición de este alelo fué muy pequeña, como se señalará posteriormente.

Alelo "R" ó rápido, con una migración intermedia entre los tres alelos encontrados. La frecuencia de este alelo fué mayor en la población de Magdalena D. F.

Alelo "L" ó lento, con mayor frecuencia de aparición en la localidad de Zacazonapan, Edo. de México.

La  $\alpha$ GPDH se concibe como una enzima dimérica (Healy, 1979a) determinada por un solo locus para el cual son segregados diferentes alelos.

En esta investigación, de las dos poblaciones estudiadas, se encontró la segregación de los tres alelos anteriormente mencionados, ("M", "R" y "L") con diferentes frecuencias de aparición en cada una de las poblaciones.

Los patrones encontrados en los tubos de gel en base a las combinaciones de los alelos fueron los siguientes: - MM (Muy rápido, Muy rápido), ML (Muy rápido, lento), RR (Rápido, rápido), RL (Rápido, lento) y LL (Lento, lento). La combinación MR (Muy rápido, rápido) se estimó no encon-

trar, dadas las posiciones de las bandas en los geles. (Figura # 1, placa # 1)

Como consecuencia, tres de estos patrones, exhibieron una sola banda (MM) (RR) y (LL), por lo cual se considerarán homocigotos. Los otros dos modelos fueron triple bandeados; uno de ellos interpretado como el producto heterocigoto entre los alelos M y L y el otro entre los alelos R y L.

En el Cuadro No. 1 se presentan el número de alelos muestreados para cada población, sus combinaciones y sus frecuencias absolutas de aparición. De este cuadro se puede apreciar que en la población de Magdalena, de 62 garrapatas muestreadas (como consecuencia, 124 alelos muestreados) sólo en una vez se presentó el alelo MM como homocigoto, por lo que aquí encontramos dos alelos de este tipo. En esta misma población se presentó en tres garrapatas la combinación ML por lo que fueron seis alelos muestreados, de los cuales tres corresponden al alelo "M" y tres al alelo "L": de esta forma encontramos que en la muestra de la población de Magdalena, el alelo M estuvo presente en 5 ocasiones, (Cuadro No. 2) y así sucesivamente para los demás alelos en las dos poblaciones.

De lo anterior puede inferirse que la presencia de un tipo de alelo varía en su proporción de una población a otra, pues encontramos que mientras el alelo "R" es predominante en Magdalena D. F., el alelo "L" lo es en Zacazonapan, México. En el Cuadro No. 3 se dan las frecuencias relativas de aparición para cada alelo (frecuencias génicas) en las dos poblaciones, así como el porcentaje de heterocigotos encontrados.

De las frecuencias expresadas en el Cuadro No. 3 para los tres alelos de las dos poblaciones bajo estudio, se puede pensar que las diferencias son significativas en dos de ellos, o sea en los alelos R y L. Para el alelo M, dada su baja frecuencia de aparición, esto es difícil de considerar.

La forma de evaluar estadísticamente las diferencias de frecuencias observadas entre estas dos poblaciones fue realizada por medio de una tabla de contingencia de 3x2 tal y como se ilustra en el Cuadro No. 4, utilizándose el estadístico chi-cuadrada (Everitt, 1977), de donde se obtuvo un valor de  $\chi^2 = 4.529$  con dos grados de libertad, la cual al contrastarse en una tabla de valores de probabilidad para la distribución  $\chi^2$  (Stansfield, 1975), la prueba se hace significativa cuando  $P = 0.10$ , que para los fines de este trabajo se considera aceptable.

Las marcadas diferencias en las frecuencias génicas entre las dos poblaciones, y el valor de  $P = 0.10$  para la distribución de la  $\chi^2$ , nos sugiere ampliamente la búsqueda de un factor que pueda determinar estas diferencias, y en un afán por ubicarlo, podemos designar tentativamente y a priori al factor térmico como responsable, pues tal como se señaló anteriormente, la principal diferencia ecológica entre las dos poblaciones en estudio lo constituye la temperatura (y en segundo término, la ASNM), pues mientras que en Magdalena D. F. la temperatura media es de  $11^\circ\text{C}$ , en Zacazonapan es de  $24.3^\circ\text{C}$ . (Bol. An. SARH, 1977)

Así tenemos que en Magdalena, localidad con la temperatura más baja, es donde el alelo "R" se presenta con mayor frecuencia, mientras que en Zacazonapan el alelo "L" es el que predomina. Esto coincide en cierta forma con lo expues-

to por Johnson (1976) en su trabajo sobre las mariposas *colias*, donde señala que en los hábitats alpinos, hábitats - térmicamente fríos y poco variables, el alelo "F" (fast) - de la  $\alpha$ GPDH es casi monomórfica, presentando el alelo "S" (slow) una mayor frecuencia conforme la altura disminuye y la temperatura aumenta.

Se dice que coincide en cierta forma porque si bien - es cierto que en el presente trabajo el alelo "R" no muestra características monomórficas, si tiene una mayor frecuencia de aparición en la zona más fría, y una situación similar se observa con el alelo "L". Sin embargo la comparación siempre será discutible por tratarse de diferentes grupos de artrópodos con distintas condiciones de vida.

Por otra parte, se tiene a favor para esta investigación el que se considere que el gen que codifica para la  $\alpha$ GPDH sea uno de los pocos en los cuales la función fisiológica parece clara y que además pueda responder positivamente a cambios de temperatura (Johnson, 1980), pues es una forma más de avalar los resultados expuestos en este trabajo y de explicar (en una primera aproximación), el polimorfismo encontrado en éstas dos poblaciones.

En el Cuadro No. 5 se anotan las frecuencias observadas y esperadas para los diferentes arreglos de alelos posibles, con sus respectivos valores de  $\chi^2$  y P, con 5 grados de libertad. Aquí los valores de la  $\chi^2$  nos provee de la información necesaria para tener idea de la desviación que estas dos poblaciones tienen con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, donde se observa que la desviación en la población de Magdalena es más aparente ( $0.10 < P < 0.20$ )

quizá debido a una mayor definición del factor selectivo - propuesto (en este caso, temperatura baja), aunque hay que dejar claro que los valores de P para las dos poblaciones - no son significativos estadísticamente.

El mayor patrón de referencia para este trabajo lo - constituye el realizado por Healy (1979a) pues lo desarrolla sobre una garrapata, Ixodes ricinus, y sobre la enzima  $\propto$  GPDH. Entre las diferencias que se encuentran en estos dos trabajos tenemos que Healy reporta cuatro alelos en lugar de tres, con la variante de "VS" (muy lento) que se estimó no encontrar aquí.

Como puede apreciarse en el Cuadro No. 6, la heterocigosis encontrada en estas dos poblaciones de B. microplus es muy alta, tanto que supera la predicha por el equilibrio de Hardy-Weinberg....¿Señalaría esto la ventaja del heterocigoto?..., Healy (1979a) también reporta heterocigosis muy altas (0.477, 0.489, 0.650, 0.563,) para las poblaciones que estudió, pero además en ensayos subsecuentes se señala que las hembras heterocigotas son superiores a las hembras homocigotas en cuanto a la capacidad locomotora, - más no así a la desecación donde demostraron ser inferiores.

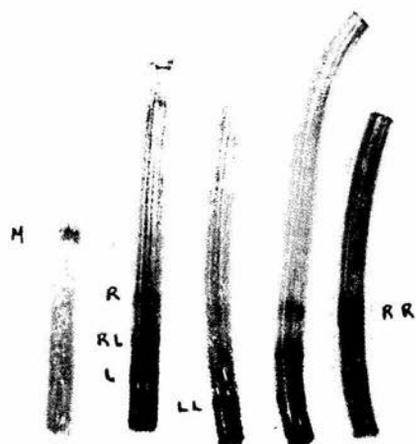
Continuando con el deseo de encontrar una explicación lógica a los resultados obtenidos, y ante la situación de que en la población de Magdalena se presenta una mayor proporción de hembras heterocigotas (que Healy reporta con mayor eficacia locomotora), recordando el hecho fisiológico de que, a bajas temperaturas, los insectos pueden crear calor adicional por medio del incremento de su metabolismo -

muscular (Smith-Nielsen, 1975).

Con base en lo anterior, nos atrevemos a proponer que la mayor proporción de hembras heterocigótas en esta localidad (Magdalena) se da por la situación de que a bajas temperaturas se requeriría una mayor capacidad locomotora para desplazarse y encontrar a su huésped, evitando un "entumecimiento" que podía colocarlas ante una probable situación de muerte.

En Zacazonapan encontramos que la heterocigosis se presenta en una mayor frecuencia. Se sabe también que las hembras heterocigótas son menos resistentes a la desecación que las hembras homocigótas (Healy, 1979a). En esta localidad de Zacazonapan la temperatura es más elevada que en Magdalena, además la precipitación es menor; entonces, ante la idea de que la conjunción de estos dos factores (temperatura y precipitación) pudiera influir en la provocación del fenómeno de la desecación en las garrapatas, podríamos aceptar la correlación de estos parámetros ambientales con la frecuencia del heterocigosis encontrada en esta población.

De esta forma podemos interpretar tentativamente, el exceso de heterocigosis (caso Magdalena D. F.) y las diferencias en las frecuencias de los alelos entre las dos poblaciones, aclarando una vez más que, las correlaciones hechas a este trabajo son meramente especulativas, y con la intención de proveer a los resultados de el presente de una explicación ecológica con base en experimentos anteriores, pues una investigación más completa y profunda (tal como se detalla en el capítulo III) escapa de los objetivos y alcances de este trabajo.



Placa # 1.- Fenotipos electroforéticos de 5 individuos de B. microplus mostrando de izquierda a derecha el alelo M (muy rápido), el heterocigoto R - (rápido) - L (lento), el alelo L (lento), otro heterocigoto R-L y el homocigoto R (rápido).

Población: Zacazonapan.

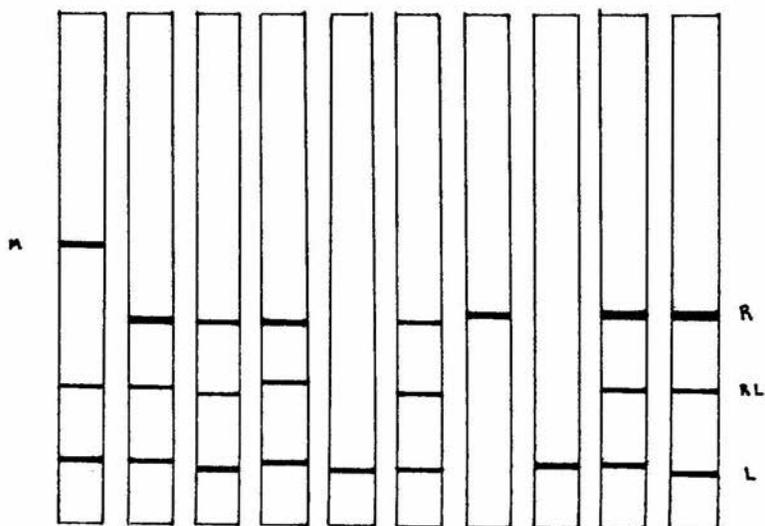


Figura No. 1 Representación esquemática de 10 fenotipos electroforéticos de la GPDH correspondientes a 10 individuos de Boophilus microplus.

Cuadro No. 1

Frecuencias absolutas de las combinaciones alélicas de la  $\alpha$ -GPDH en dos poblaciones de Boophilus microplus.

Localidad	Garrapatas Muestreadas	Alelos Muestreados	Combinaciones	Individuos (Frec. abs.)	No. de tipos de alelos
Magdalena	62	124	MM	1	2
			MR	0	0
			ML	3	6
			RR	14	28
			RL	37	74
			LL	7	14=124
Zacazonapan	52	104	MM	0	0
			MR	0	0
			ML	3	6
			RR	7	14
			RL	27	54
			LL	15	30=104

Cuadro No. 2

Frecuencias absolutas de los alelos de la  $\alpha$ -GPDH en dos poblaciones de B. microplus.

Alelo	LOCALIDADES	
	Magdalena D. F.	Zacazonapan Mex.
M	5	3
R	65	41
L	54	60
TOTAL	124	104

Cuadro No. 3

Frecuencias relativas de los alelos de la  $\alpha$  GPDH en dos poblaciones de B. microplus.

	LOCALIDADES		
	Magdalena D. F.	Zacazonapan Mex.	Total
No. de alelos muestreados	124	104	228
Alelos			
M	0.040322	0.02884	0.035087
R	0.524193	0.39423	0.464912
L	0.435493	0.57692	0.50000
Proporción de Individuos Heterocigotos	0.64516	0.57692	0.614035

Cuadro No. 4

Tabla de Contingencia de 3x2 para análisis de las diferencias de frecuencias alélicas de la  $\alpha$ -GPDH en dos poblaciones de B. microplus.

		LOCALIDAD		Total
		Magdalena D. F.	Zacazonapan Mex.	
ALELO	M	O <sub>i</sub> =5 E <sub>i</sub> =4.35	3 3.65	8
	R	65 57.65	41 48.35	106
	L	54 62	60 52	114
Total		124	104	228

$$\frac{(O-E)^2}{E} \sim \chi^2 = 4.529; \quad \text{°L} = 2 \quad P = 0.10$$

Cuadro No. 5

Comparación de los valores observados y esperados\* de los fenotipos (frec. genotípicas) de la  $\alpha$ -GPDH en las dos poblaciones de B. microplus.

Localidad		Fenotipos (arreglos alélicos)					
		MM	MR	ML	RR	RL	LL
Magdalena D. F.	Observados	1	0	3	14	37	7
	Esperados *	0.10	2.63	2.17	17.03	28.24	11.74

$$\chi^2 = 7.65; \text{ °L}=5; 0.10 \leq P \leq 0.20$$

Zacazonapan, Mex.	Observados	0	0	3	7	27	15
	Esperados *	0.04	1.18	1.73	8.07	23.64	17.31

$$\chi^2 = 6.59; \text{ °L}=5; P \leq 0.20$$

\* Los valores esperados fueron calculados en base del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Cuadro No. 6

Comparación de las frecuencias absolutas y relativas en los valores observados y esperados\* de Heterocigotos en las dos poblaciones.

		Frec. Rel.	Frec. Absol.
Magdalena D. F.	Observados	0.64516	40
	Esperados*	0.53387	33.09
Zacazonapan, Mex.	Observados	0.57692	30
	Esperados*	0.51057	26.55

\* Valores esperados, en base al equilibrio de Hardy - Weinberg

CONCLUSIONES.-

1) El polimorfismo de la enzima  $\alpha$ -Glicerofosfato deshidrogenasa, es detectado en la garrapata Boophilus microplus por la técnica empleada en este trabajo, bajo el uso de un sustrato específico, pues la uniformidad observada en los patrones de bandas sobre los geles así lo aprueban.

2) Cada banda es, en una primera aproximación, un producto génico, y una distinta movilidad significa una diferencia genética elemental. Desgraciadamente, al igual que en todos los trabajos de electroforesis, una falta de diferencias es ambigua ya que muchos cambios génicos no se ven reflejados en la carga, y por consecuencia en la movilidad de la proteína sobre el gel (Lewontin, 1974). Entonces, este último hecho significa que los cálculos relativos a diferencias genéticas entre especies, basados en estudios electroforéticos de proteínas son solamente subestimaciones de la real variación genética entre las poblaciones.

3) De acuerdo a los resultados, el polimorfismo encontrado de la  $\alpha$ -GPDH en el presente estudio la ubica como una enzima poco polimórfica, pues solamente se encontraron tres alelos en las poblaciones tratadas, a diferencia de otros reportes anteriores donde por ejemplo, Healy (1979b) encuentra 10 alelos para la fosfoglucomutasa en la garrapata I. ricinus, Hubby y Lewontin (1966) reportaron 6 alelos para la Esterasa 5, Ayala y col. (1972) 7 alelos para la Leucina amino-peptidasa (Lap-5), etc.. Estos mismos autores señalan un polimorfismo reducido para la  $\alpha$ -GPDH.

Lo anterior va de acuerdo con la hipótesis señalada por Selander (1980), donde clasifica a las enzimas en dos -

grupos principales: El grupo I, integrado por enzimas que se caracterizan por poseer un sustrato fisiológico único - que por lo común es generado y utilizado intracelularmente (ejemplo, enzimas que metabolizan la glucosa) y Grupo II - con enzimas denominadas "no específica" o enzimas con substratos fisiológicos múltiples, que de cierto modo reflejan la diversidad ambiental y que, por lo tanto, son más polimórficos. La  $\alpha$ -GPDH pertenece al Ier. grupo.

4) Se confirma la concepción de la GPDH como enzima dimérica, al presentar un heterocigoto con tres bandas donde la banda central sea la conjunción del alelo rápido ("R" ó "M") y del alelo lento ("L") presentándose éstos además en una situación homocigota, con una sola banda que nunca fué central.

5) Las frecuencias génicas de los alelos encontrados para la  $\alpha$ -GPDH en las dos poblaciones de B. microplus, son claramente diferenciales entre si, y los resultados arrojados por la prueba de  $\chi^2$ , nos proporcionan suficiente evidencia experimental ( $P \geq 10$ ) para apoyar la hipótesis de que las diferencias en las frecuencias de los alelos son debidas a factores medio ambientales (tal como el factor térmico propuesto) y no a factores de azar.

6) En cumplimiento de uno de los objetivos señalados para este trabajo y de acuerdo con los resultados contenidos en el Cuadro No. 3, podemos caracterizar a la población de Magdalena D. F. con la alta frecuencia observable del alelo R (0.5241). Así mismo, se puede argumentar que la población de Zacazonapan se caracteriza por presentar una alta frecuencia de aparición del alelo "L". Todo esto,

para las condiciones y épocas del muestreo realizado.

7) Lo anterior, no conduce a la afirmación de que es tos alelos estén fijados en sus respectivas poblaciones, - ni que ésto se deba al factor medio ambiental propuesto, - pues a pesar de que como Johnson (1980) señala, que la --  $\alpha$ -GPDH es una enzima modulador redox, y por lo tanto puede estar sujeta a selección por medio de la temperatura, - tal como lo prediciría una hipótesis adaptativa (y que además se ha visto avalada por una serie de resultados experimentales, como pudiera ser este caso), no podemos a firmar lo anterior, dadas las limitaciones de este trabajo.

8) Es necesario entonces realizar un estudio bioquímico y fisiológico muy detallados de los productos enzimáticos de los alelos, haciendo notar cualquier diferenciaentre ellos, tal como señala Clarke (1975); postulando - posteriormente el factor selectivo más apropiado, pudiéndose probar ésto por manipulación experimental con respuestas predecibles que puedan ser extrapoladas a la población natural.

9) Quedará por estudiar, aparte de las ya mencionadas diferencias bioquímicas y fisiológicas de los productos de los alelos, él que exista una diferenciación temporal en las frecuencias génicas para una sola población, - realizando muestreos que sean representativos para cada una de las estaciones en estudio, como pudiera ser invierno-verano.

10) Se sugiere además, el estudio posterior y confirmativo para los datos aportados por este trabajo, en po -

blaciones de garrapatas con características ecológicas similares a las ahora estudiadas, pues por el momento, desgraciadamente en nuestro país se carece de antecedentes al respecto.

BIBLIOGRAFIA CITADA:

- Avise, J. C., 1974. Sistematic value of electroforetic - data. System. Zool. 23: 465-481.
- Avise, J. C., y M. H. Smith, 1974a. Biochemical genetics of sunfish I. Geographic variation and Subspecific intergradation in the bluegill, Lepomis macrochirus. Evolu - tion. 28: 42-56.
- Avise, J. C., M. H. Smith, R. K. Selander, T. E. Lauror, y P. R. Ramsey, 1974a. Biochemical polymorphism and sys - tematics in the genus Peromyscus V. Insular and minland - species of the subgenus Haplomylomys. System. Zool. --- 23: 226-238.
- Ayala, F. J., 1965. Evolution of fitnes in experimental - poblations of Drosophila serrata. Science. 150: 903-905.
- Ayala, F. J., 1967. Evolution of fitnes III. Improvement of fitnes in irradiated population of Drosophila serrata. Proc. Nat. Acad. Sci. 58: 1919-1923.
- Ayala, F. J., 1973. Two new subspecies of the Drosophila willinstoni group (Diptera: Drosophilidae), Pan. Pacific. Ent. 49: 273-279.
- Ayala, F. J., 1978. Mecanismos de la evolución. Sci. Am - er. Ed. en Español. 26: 18-33.

- Ayala, F. J., 1980. Genética molecular y evolución. En - Ayala, F. J. Evolución molecular. Editorial Omega S. A.- Barcelona, España. pp. 1-20.
- Ayala, F. J., y T. Dobzhansky. 1974. A new subspecies of Drosophila pseudobscura ( Diptera: Drosophilidae ) Pan.- Pac. Entomol., 50: 211-219.
- Ayala, F. J., C. A. Mourao, S. Pérez-Salas, R. Richmond, y T. Dobzhansky, 1970. Enzyme Variability in the Drosophila willistoni, group I. Genetic differentiation among-sibling species. Proc. Nat. Acad. Sci. 67: 225-232.
- Ayala, F. J., y J. R. Powell, 1972. Allozymes as diagnostic caracteres of sibling species of Drosophila. Proc.- Nat. Acad. Sci. USA. 69: 1094-1096.
- Ayala, F. J., J. R. Powell, y T. Dobzhansky, 1971. Polymorphisms in continental and island populations of Drosophila willistoni. Proc. Nat. Acad. Sci. 68: 2480-2483.
- Ayala, F. J., J. R. Powell, M. L. Tracey, C. A. Mourao y S. Pérez-Salas 1972a. Enzyme variability in the Drosophila willistoni group IV. Genic variation in natural populations of D. willistoni. Genetics 70: 113-139.
- Ayala, F. J., y M. C. Tracey. 1973. Enzyme variability - in the Drosophila willistoni group VIII. Genetic differentiation and reproductive isolation between two subspecies. Heredity. 64: 120-124.

- Boletín Anual del Servicio Meteorológico Nacional, 1977. Resumen Climatológico. SARH, México.
- Buzzati-Traverso, N. A., 1953. Paper chromatographic patterns of genetically different tissues: A contribution to the biochemical study of individuality. Proc. Nat. Acad. Sci. 39: 376-391.
- Carson, E. A., Sederof, y M. Logan, 1967. Evidence favoring a frame-shift mechanism for ICR-170 INDUCED mutations in Drosophila melanogaster. Genetics. 55: 295-313.
- Cartas de Climas, Köppen, modif. por E. García, CETENAL.
- Centro Nacional de Parasitología Animal 1980. FCNGG, SARH-BNCR. México.
- Clarke, B., 1962. Balanced polymorphism and the diversity of sympatric species. Systematics Assoc. Publ. 4: 47-70.
- Clarke, B., 1975. The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: Detecting the direct effects of natural selection on particular polymorphic loci. Genetics. 79: 101-113.
- Climas. Edos. de Guerrero, Morelos y D. F. Inst. de Geografía, UNAM-CETENAL. México 1975 pp. 114-207.

- Cronquist, A., 1977. Introducción a la Botánica. CECSA, México. pp. 81-82.
- Day, T. H., P. C. Hillier, y B. Clarke, 1974a. The properties of genetically polymorphic isozymes of alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster. Biochem. Genet. 11: 141-153.
- Day, T. H., P. C. Hillier, y B. Clarke, 1974b. The relative quantities and catalytic activities of enzymes produced by alleles at the alcohol dehydrogenase locus in Drosophila melanogaster. Biochem. Genet. 11: 155-165.
- Dobzhansky, T., 1975a. Genética del proceso evolutivo. - Edit. Extemporáneos S. A. México D. F. pp. 51-62; 71; 102-107; 126-138; 213-220; 338-361.
- Dobzhansky, T., 1975b. Aspectos orgánicos y moleculares de la formación de las especies. En Ayala F. J. 1980, Evolución Molecular. Ed. Omega S. A. Barcelona España - pp. 98-109.
- Dobzhansky, T., Plavorsky, 1957. An experimental study of interaction between genetic drift and natural selection. Evolution. 11: 311-319.
- Everitt, B. S., 1977. The analysis of contingency table. Ed. Chapman and Hall, New York. Cap. 3
- Ford, E. B., 1964. Ecological genetics. Methuen, Londres. pp. 84-104.

- Gibson, J. B., 1970. Enzime flexibility in Drosophila melanogaster. Nature. 227: 959.
- Goodman, M., G. W. Moore, y G. Matsuda, 1975. Darwinian evolution in the genealogy of haemoglobin. Nature 253: - 603-608.
- Hadorn, E., y H. K. Mitchel, 1951. Propertees of mutants of Drosophila melanogaster and changes during developments as revealed by paper chromatography. Proc. Nat. - Acad. Sci. 37: 650-665.
- Halffter, G., 1978. La taxonomía. En Estrada L. y J. Flores. Perspectivas en la Biología y en la Física. Asoc. - para la divulgación científica, H. A. Lorentz, A. C. México D. F. pp. 123-129.
- Harper, H. A., 1971. Manual de Química Fisiológica. El - manual moderno S. A. México D. F. pp. 56-66; 71-77.
- Harris, H. A., 1966. Enzime polymorphism in man, Proc. - Roy. Soc. Sev. B., 164: 298-310.
- Harris, H. A., 1969. Enzime and polymorphism in human po- pulations. British, Med. Bull. 25: 5-13.
- Healy, J. A., 1979a. Analysis of Glicerophosphate dehy- drogenase variability in the tick Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) Genética. 50: 19-30.

- Healy, J. A., 1979b. Phosphoglucomutase polymorphism in the tick Ixodes ricinus. Parasitology. 78: 7-17.
- Hoffman, A., 1962. Monografía de los ixodoidea en México, I parte. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 23: 210-221.
- Hubby, J. C., y R. C. Lewontin, 1968. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in Drosophila pseudobscura. Genetics. 54: 577-594.
- Hubby, J. C., y L. H. Throckmorton, 1968. Protein differences in Drosophila. IV. A study of sibling species. Amer. Nat. 102: 193-205.
- Hunt. W. G., y R. K. Selander, 1973. Biochemical genetics of hybridization in european house mice. Heredity.- 31: 11-33.
- Hunter, R. C., y C. L. Markert, 1957. Histochemical demonstrative of enzyme separated by zone electroforesis in starch gels. Science. 125: 1294-1295.
- Jenkins, J. B., 1967. Mutagenesis a complex locus in Drosophila with the monofunctional alkylating, ethyl methanesulfonate. Genetics. 57: 783-793.
- Johnson, G. B., 1971. Metabolic implication of polymorphism as an adaptative strategy, Nature. 232: 347-349.

- Johnson, G. B., 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. Science. 184: 28-37.
- Johnson, G. B., 1976. Polymorphism and Predictability - at the Glycerophosphate Dehydrogenase locus in *colias* Butterflies: Gradients in allele frequency within single populations. Biochem. Genet. 14: 403-426.
- Johnson, G. B., 1980. Poliformismo genético y función--enzimática. En Ayala. F. J. Evolución Molecular, Ed. - Omega. Barcelona España 1980. pp. 47-60.
- Johnson, F. M., Kanap C. G., R. H. Richardson, Wheeler, M. R., y W. S. Stone, 1966. An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark y light Drosophila ananassae strains from American y Western Samoa, Genetics. 56 : 119-125.
- Johnson, W.Z., y R.K. Selander. 1971. Protein variation y systematics in Kangaroo rats (Genus *Dipodomys*).- System. Zool. 20:377-405.
- Johnson, W.Z., R.K. Selander, M. H. Smith, y Y. L. Kim, 1972. Biochemical genetics of sibling species of the -- cotton rat (Sigmodon). Studies in genetics VII. Univ. - Texas Publ. 7213: 297-305.
- Kimura, M., y T. Ohta. 1971a. protein polymorphism as a phase of molecular evolution. Nature 229: 407-469.

- Kimura, M., y T. Ohta, 1971b. Teoretical aspects of po -  
pulations genetics. Princeton University Press Princeton,  
New Jersey.
- Lauffer, H., 1960. Blood proteins in insect development.-  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 89(3): 490-415.
- Lehninger, A. L., 1978. Bioquímica. Ediciones Omega. Bar-  
celona España. pp. 872-877; 891, 903, 928-934; 942-957; -  
969-983.
- Lewontin, R. C., 1974. The genetic basic of evolutionary-  
change, Columbia University Press. New York. pp. 17-29; -  
63-79; 88-139.
- Manning, B. J., 1977. Phenotypes y genotypes in cladoce--  
ran populations. Dep. of Biol. Sci. Dart Mouth Coll. Ha -  
nnover 365-371.
- Markert, C. L., y F. Moller, 1959. Multiple forms of enzy  
mes: tissue, ontogenetic, y species specific patterns. --  
Proc. Nat. Acad. Sci. 45: 753-763.
- Mayr, E., 1969. Principles of Systematic Zoology. Mc. - -  
Graw-Hill, New York. pp. 3-25; 72-105.
- Micks, D. N., 1954. Paper cromatographic as tool fos mos-  
quito taxonomy. Proc. Soc. Exptl. Biol. y Med. 79: 191---  
193.

- Micks, D. W., 1956. Paper chromatographic as tool insect taxonomy. Ann Ent. Soc. Amer. 50: 500-505.
- Micks, D. W., y F. J. Gibson, 1957. The characterization of insects y ticks by their free amino-acid patterns. -- Proc. Nat. Acad. Sci. 45: 753-763.
- Montoya G. N., 1978. Importancia Económica de la Campaña Nacional Contra la Garrapata en el Estado de Sinaloa. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México. 108 p.
- Nair, P. S., D. BRNCIC, y Kojima, 1971. Isozyme variations y evolutionary relationships in the mesophragmatica species group of Drosophila. Studies in genetics VI.- Univ. Texas Publ. 7103: 17-28.
- Prakash, S., R. C. Lewontin, y J. L. Hubby, 1969. A molecular approach to the study of genic heterozigosity in natural populations. IV. Patterns of genis variation in central, marginal y isolated populations of Drosophila pseudobscura. Genetics 61: 841-858.
- Prevosti, A., 1978. Polimorfismo cromosómico y evolución. Sci. Amer. Ed. en Español. 26: 90-103.
- Raup, D. M. y S. M. Stanley, 1978. Principios de Paleontología Ed. Ariel España. pp. 113-141.

- Reich, C. F., y J. Zorzópulos, 1978. Boophilus microplus: Characterization of larval proteases. Exp. Parasitol. -- 44: 1-6.
- Richmond, R. C., 1970. Non-Darwinian evolution: a critique. Nature. 225: 1025-1028.
- Selander, R. K., 1980. Variación genética en poblaciones naturales. En Ayala, F. J., Evolución Molecular, Ed. Omega, Barcelona España 1980. pp. 21-46.
- Simpson, G. G., 1961. Principles of animal taxonomy. Columbia University Press . 247 p.
- Smith, M. H., R. K. Selander, y W. E. Johnson, 1974. Biochemical polymorphism and systematics in the genus Peromyscus. IV. Evolutionary genetics of the sibling species P. leucopus and P. gossypihus. J. Mammal. 54: 1-13.
- Sokal, R. R., y P. H., A. Sneath, 1963. Principles of numerical taxonomy. W. H. Freeman CO. 359 p.
- Solis, S. 1980.- Comunicación personal. Depto. de Ecología, CNPA, FCNCG, SARH-BNCR, México.
- Stebbins, G. L., 1978. Procesos de la evolución orgánica. Ed. Prentice/Hall Internacional, Madrid, España. 199 p.
- Vigue, C. L. y F. M. Johnson, 1973. Isozyme variability in species of the genus Drosophila. IV. Frequency-proper-

ty-environmental relation of allelic alcohol dehydrogenase in P. melanogaster. Biochem. Genetic. 9: 213-227.

- Weber, K., y M. Osborn, 1969. J. Biol. Chem. 224: 4400.
- Wills, C. W., 1973. In defense of naive pan-selectionism. Amer. Natur. 107: 23-34.
- Zorzópulos, J., C. J. Reich, y V. Galassi. 1978. Boophi - lus microplus: Characterization of larval phosphomonoeste rasas and isolation of subcellular fractions with high phosphatase activity. Exp. Parasitol. 45: 128-138.

## APENDICE

### Significado de Abreviaturas.

Tris.- Hidroximetil aminometano.

TEMED.- N, N, N', N'.- Tetrametiletilendiamina.

EDTA.- Etilendinitrilotetracetato disódico.

NAD<sup>+</sup>.- Nicotinamida adenín dinucleótido.

NBT.- Nitro azul de tetrazolio (Nitro blue tetrazolium).

PMS.- Metasulfato de Fenazina (Phenazine methosulfate).