

252270 66
zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRUCTURA GENETICA DE CINCO ESPECIES
DE INSECTOS (Coleoptera: Bruchidae)
DEPREDADORES DE SEMILLAS DE VARIETADES
SILVESTRES Y CULTIVADAS DE FRIJOL.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ANTONIO GONZALEZ RODRIGUEZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA



TESIS CON
CALIFICACION



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Estructura genética de cinco especies de insectos (Coleoptera:
Bruchidae) depredadores de semillas de variedades silvestres y
cultivadas de frijol.

realizado por Antonio González Rodríguez

con número de cuenta 9158637-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa

Propietario

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Propietario

Dr. Juan Nuñez Farfán

Suplente

Dra. Betty Benrey Boguslavsky

Suplente

M. en C. Alicia Callejas Chavero

Consejo Departamental de Biología

M. en C. ALEJANDRO MARTINEZ NEVA

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

*A mis padres, Letticia y Antonio
Y mis hermanas, Claudia y Laura
Y mis grandes amigos,
Manuel, Adrián y Rodrigo
Y Claudia*

A Babi

Y (por supuesto) también a Ale Vázquez-Lobo, Rolando, Andrés Valle, Viridiana, Paco, Roberto Keller, Natalia, Andrés Keimman, Andrés Camou, Alejandra Martinelli, Rodolfo, Leonardo, con quienes comparti. de una manera u otra, estos años.

Y a Pablo, Víctor, Rosaura, Sergio, Adriana, Memo, Sofía, Eneida, Angeles, Rosalinda, Lupita, Caroline, Alvaro, León, Paty, Carlos, Micky, Ale, Alicia, Luis, Jenny, que hacen que trabajar en el GeMoyEv sea tan divertido y por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que de manera directa o indirecta contribuyeron a la realización de ésta tesis.

En primer lugar, a Ken Oyama, por la paciencia con la que la dirigió, pero sobre todo por su gran apoyo y su amistad e imperturbable buen humor.

A Daniel Piñero, Juan Nuñez, Betty Benrey y Alicia Callejas, quienes amablemente la revisaron y corrigieron.

A América Castañeda, por enseñarme a hacer electroforesis, por brindarme su ayuda y orientación en más de una ocasión y por sus comentarios a la primera versión escrita.

A los que en diversos momentos me ayudaron con las electroforesis, especialmente Eduardo de la Torre. A Rosaura, porque sin ella el laboratorio sería un caos.

A Toño, Lety, Alicia, Andrea, Gaby, Lucho y demás miembros del laboratorio de Ecología de Insectos por esas salidas a (colectar vainas y) comer quesadillas en Tepoztlán, y por los mil detalles en que me ayudaron.

A Claudia y su mamá por dejarme imprimir en su casa y por todo lo demás.

El apoyo económico para ésta investigación fue proporcionada al Dr. Ken Oyama y la Dra. Betty Benrey por la DGAPA (proyecto IN 205294), que además me otorgó, durante dos años consecutivos, una beca para tesis de licenciatura.

ÍNDICE

ABSTRACT

RESUMEN

PRESENTACIÓN	1
INTRODUCCIÓN	3
Especialización en insectos fitófagos	3
<i>Estudios supraespecíficos</i>	5
<i>Estudios intraespecíficos</i>	7
Estudios en Bruchidae	16
Objetivos	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Descripción del sistema de estudio	20
Métodos de colecta	24
Electroforesis	27
Análisis de los datos	29
RESULTADOS	36
<i>Acanthoscellides</i>	38
Análisis intrapoblacionales	38
Análisis interpoblacionales	43
<i>Distancias genéticas</i>	43
<i>Estructura genética y flujo génico</i>	49
Comparaciones entre especies	53
<i>Zabrotes</i>	54

Análisis intrapoblacionales	54
Análisis interpoblacionales	57
<i>Distancias genéticas</i>	57
<i>Estructura genética y flujo génico</i>	59
DISCUSIÓN	62
<i>Acanthoscellides</i>	62
<i>Especialización a diferentes hospederos</i>	62
<i>Diferenciación genética de las poblaciones</i>	66
<i>Comparaciones entre especies</i>	67
<i>Zabrotes</i>	68
<i>Asociación con los hospederos</i>	68
<i>Diferenciación genética de las poblaciones</i>	69
<i>Comparaciones entre especies</i>	69
Perspectivas	71
LITERATURA CITADA	73
APÉNDICE A	85
APÉNDICE B	90

ABSTRACT

We used enzymatic markers to study the populations of five species of seed predators (Coleoptera: Bruchidae) that feed on *Phaseolus* beans, in order to analyze some of the factors that determine their genetic structure. We considered 1) the use of different hosts as a possible cause of genetic differentiation among the groups of individuals associated to each one and 2) the effect of the geographic separation among populations.

We obtained 19 samples of infested seeds from five wild and cultivated varieties of beans, belonging to two species: *P. coccineus* var. *coccineus*, *P. c.* var. *darwinianus*, *P. vulgaris* (cultivated), *P.c.* var. *formosus* and *P. v.* var. *Mexicanus* (wild). From these seeds, emerged five bruchid species: *Acanthoscelides obtectus*, *A. obvelatus*, *Acanthoscelides* sp., *Zabrotes subfasciatus* and *Z. silvestris*.

In *A. obtectus* and *A. obvelatus*, Nei's genetic distance did not show correlation with the species or status (wild vs. cultivated) of the host from which the insects were obtained, thus not giving support to the idea that there are host races in this species. *Acanthoscelides* sp. was present in only one sample, and *Z. subfasciatus* and *Z. silvestris* only in cultivated beans, so it is not possible to associate the genetic distances with the type of host. Genetic distances are not correlated in all cases with the geographic distance.

F-statistics suggest a greater genetic differentiation among the populations of *A. obtectus* ($F_{ST} = 0.089$) in comparison with that found in *A. obvelatus* ($F_{ST} = 0.054$). This pattern holds even when the analysis is performed including only the populations of both species collected at a similar geographic scale. The differentiation among *Z. subfasciatus* populations is very considerable ($F_{ST} = 0.260$). We suggest that the association of the populations with stored seeds could increase their genetic differences due to the frequent extinctions and recolonizations they probably suffer.

The comparison of the levels of genetic variation present in *A. obtectus* and *A. obvelatus* showed that the first species has a significantly greater ($P < 0.05$) expected heterozygosity. These kind of differences are also present between *Z. subfasciatus* and *Z. silvestris*, but in this case were not statistically tested because data insufficiency. However, it is worth noting that in both genera, the species (*A. obtectus* and *Z. subfasciatus*) that have the wider geographic distribution and constitute important pests, are also the ones that have higher levels of genetic variation.

RESUMEN

Se utilizaron marcadores enzimáticos para estudiar las poblaciones de algunos de los insectos (Coleoptera: Bruchidae) que depredan las semillas de plantas del género *Phaseolus*, con el objetivo de analizar algunos de los factores que podrían estar determinando su estructura genética. Se consideró 1) el uso de distintos tipos de recursos como la causa de la diferenciación genética entre los grupos de individuos asociados a cada uno y 2) el efecto de la separación geográfica entre las poblaciones.

Se obtuvieron 19 muestras de semillas de frijol de cinco variedades silvestres y cultivadas pertenecientes a dos especies: *P. coccineus* var. *coccineus*, *P. c.* var. *darwinianus*, *P. vulgaris* (cultivadas), *P. c.* var. *formosus* y *P. v.* var. *mexicanus* (silvestres). A partir de ellas emergieron brúquidos de cinco especies en dos géneros: *Acanthoscelides obtectus*, *A. obvelatus*, *Acanthoscelides* sp., *Zabrotes subfasciatus* y *Z. silvestris*.

En *A. obtectus* y *A. obvelatus*, las distancias genéticas de Nei entre poblaciones no mostraron asociación con la especie o status (silvestre vs. cultivado) de las semillas a partir de las cuales emergieron. *Acanthoscelides* sp. estuvo presente en una sola localidad y ambas especies de *Zabrotes* se obtuvieron únicamente de frijoles cultivados, por lo que nos es posible asociar las distancias genéticas entre sus poblaciones con el tipo de hospedero. Las distancias genéticas no están en todos los casos correlacionadas con las distancias geográficas entre las localidades.

Los estadísticos de F indican una mayor diferenciación genética entre las poblaciones de *A. obtectus* ($F_{ST} = 0.089$) en comparación con las de *A. obvelatus* ($F_{ST} = 0.054$). Este patrón se mantiene aún cuando únicamente se incluyen en los análisis a las poblaciones colectadas a una escala geográfica similar. La diferenciación entre las poblaciones de *Z. subfasciatus*, es muy considerable ($F_{ST} = 0.260$). Se propone que la asociación de las poblaciones con semillas almacenadas podría incrementar la diferenciación genética entre ellas debido a las extinciones y recolonizaciones frecuentes a las que están sujetas.

La comparación de los niveles de variación genética presentes en *A. obtectus* y *A. obvelatus* mostró que la primera especie posee una heterocigosidad promedio esperada significativamente mayor ($P < 0.05$). Entre *Z. subfasciatus* y *Z. silvestris* también se observan diferencias, aunque no se probaron estadísticamente debido a la insuficiencia de datos. Sin embargo es notable que en ambos géneros, las especies (*A. obtectus* y *Z. subfasciatus*) que tienen la distribución geográfica más amplia y que constituyen plagas importantes sean las que poseen los mayores niveles de variación genética.

PRESENTACIÓN

Este trabajo forma parte de un proyecto más amplio sobre la integración de aspectos ecológicos y genéticos de una interacción a tres niveles tróficos. El sistema estudiado consiste de varias especies y variedades silvestres y cultivadas de plantas del género *Phaseolus* (Fabaceae), los insectos de los géneros *Acanthoscelides* y *Zabrotes* (Coleoptera: Bruchidae) que depredan sus semillas y algunos himenópteros parasitoides que son enemigos naturales de estos últimos.

Este proyecto se inserta en el área de la ecología evolutiva de las interacciones planta-insecto. Se intenta responder, para el caso de este sistema de estudio en particular, algunas de las interrogantes más persistentes en relación a las causas y consecuencias tanto ecológicas como evolutivas, de los patrones de uso de recursos por parte de los insectos. Por ejemplo, ¿qué determina que algunos insectos estén altamente especializados mientras que otros son generalistas?, ¿cuál es el papel de la conducta y de la adaptación fisiológica en la especialización?, ¿qué tan importantes son los "compromisos" en el desempeño sobre distintos recursos en la evolución de la especialización?, ¿cuál es la relación general entre preferencia y desempeño en los insectos?, ¿qué efectos tiene la presencia de un tercer interactuante sobre la relación entre los otros dos?, ¿qué importancia tiene la variación intra- e interpoblacional de cada una de las especies involucradas en la interacción?, ¿cuál es el papel de fenómenos genéticos como el flujo génico entre poblaciones sobre los procesos de especialización?, ¿existe la posibilidad de especiación simpátrica por especialización a diferentes recursos?, ¿existe la coevolución?. Estas son algunas de las preguntas que más frecuentemente son objeto de estudios teóricos y empíricos.

Uno de los enfoques utilizados en este proyecto ha sido realizar experimentos para evaluar los efectos de la variación intraespecífica en *Phaseolus coccineus*, producidos por selección artificial bajo domesticación, sobre la relación entre la preferencia y el desempeño del brúquido *Zabrotes subfasciatus* (Callejas, 1996).

Por otro lado, también se han examinado los efectos de esta misma variación en *P. coccineus* sobre la interacción entre *Z. subfasciatus* y el parasitoide *Stonocorse bruchivora* (L. Ríos, en preparación).

Otro enfoque, que es el utilizado en esta tesis, consiste en emplear marcadores moleculares para obtener datos acerca de la estructura genética de algunas poblaciones de las especies de insectos involucradas. A partir de esta información se pueden extraer conclusiones sobre los factores que posiblemente están determinando la diferenciación entre poblaciones y establecer si las diferencias se deben simplemente a limitaciones al flujo génico resultado de la separación geográfica y sin relación con el uso de distintos hospederos, o si efectivamente los procesos de especialización que podrían estar ocurriendo como consecuencia de la variación intra- e interespecífica en el frijol, determinan restricciones al flujo génico entre grupos de individuos que manifiestan preferencia hacia distintos recursos, inclusive cuando se encuentran en simpatria. Realizar estos análisis para varias especies relacionadas que utilizan recursos semejantes, permite comparar los patrones de variación y estructura genética observados en cada una y tratar de correlacionarlos con algunos aspectos de la biología e historia de vida de los organismos.

INTRODUCCIÓN

Especialización en insectos fitófagos

Los patrones de uso de recursos por parte de los insectos surgen por una combinación de procesos que ocurren desde el nivel individual hasta el supraespecífico. Por ejemplo, se puede observar una tendencia hacia la especialización a todos estos niveles. En muchos taxa de insectos el número de especies monófagas u oligófagas supera al de polífagas (Jermy, 1984). Fox y Morrow (1981) mostraron que, en general, las poblaciones no usan todos los hospederos con los que la especie en conjunto se asocia a lo largo de su distribución geográfica, dando origen a la hipótesis de la especialización local (Thompson, 1994). Además, en las poblaciones oligófagas, los individuos pueden manifestar preferencia hacia alguno de los hospederos posibles y ser monófagos (Courtney, 1981). Por lo tanto, la especialización y la variación en el uso de recursos son dos caras de una misma moneda. Ambos aspectos son fundamentales para los estudios de ecología evolutiva de las interacciones.

Berenbaum (1990) agrupa las hipótesis para explicar la prevalencia de la especialización en adaptativas y no adaptativas. Las hipótesis no adaptativas postulan que los taxa especialistas son numerosos porque tienen una tendencia intrínseca a especiar, pues es posible que el aislamiento reproductivo aparezca frecuentemente entre grupos de individuos que usan un número limitado de recursos.

Por su parte, las hipótesis adaptativas parten de que la especialización es ventajosa porque lleva asociada una mayor eficiencia en el uso de los recursos (Futuyma et al., 1984). Esta mayor eficiencia puede ser en términos de

localización del recurso, de su asimilación metabólica, o de defensa contra enemigos naturales (Berenbaum, 1990). Obviamente, está implícita la idea de que entre mayor sea la especialización, menor será la eficiencia en el uso de otros recursos diferentes (Futuyma y Moreno, 1988). Por lo tanto, dos de las predicciones que se desprenden son que un insecto especialista será más eficiente en el uso de "su" recurso que un insecto generalista que lo utiliza entre varios otros, y que existen "trade-offs" (compromisos) en el desempeño sobre distintos hospederos, es decir, que si el desempeño de un insecto sobre un cierto recurso es alto, deberá ser bajo sobre otros (Futuyma y Moreno, 1988; Jaenike, 1990; Via, 1990). Además, un insecto en posibilidades de elegir, deberá alimentarse del recurso que le proporcionará un mejor desempeño, es decir, se espera la correlación positiva entre la preferencia hacia una planta y la supervivencia y desarrollo del insecto en esa planta (Thompson, 1988).

Los "trade-offs" sobre distintos hospederos y la correlación entre preferencia y desempeño son ideas centrales en muchos de los trabajos que han sido emprendidos en el área de las interacciones, especialmente los que abordan temas como la especialización local, la adopción de nuevos hospederos, los cambios de hospedero y la formación de razas asociadas a distintos hospederos. A continuación se describen algunos de estos trabajos, agrupados según se ubiquen en un nivel supraespecífico o intraespecífico y con especial énfasis en aquellos que han utilizado marcadores moleculares.

Estudios supraespecíficos

Una observación muy consistente es que ciertos grupos de insectos se encuentran asociados, parcial o totalmente, con plantas relacionadas taxonómicamente y/o similares en su química secundaria (Ehrlich y Raven, 1964; Berenbaum, 1990; Feeny, 1992). Este patrón muestra que los insectos son en muchos casos conservadores en sus afiliaciones con las plantas (Mitter et al., 1991) y que la adquisición de nuevos hospederos o los cambios de hospedero son eventos relativamente poco frecuentes, ocurren en direcciones determinadas y en general se dan con mayor facilidad entre especies de plantas semejantes en algunos de los aspectos mencionados (Brooks, 1988; Mitter y Farrell, 1991). Futuyma (1983) llamó la atención sobre lo paradójico de este hecho, pues cabe esperar que la selección natural favorezca la adopción de hospederos que puedan ser localmente más abundantes que el hospedero utilizado por la población de insectos, hecho que casi nunca se observa, lo cual podría estar indicando que la asociación histórica entre un linaje de insectos y un grupo de plantas limita de alguna manera la posibilidad de que exista la variación genética necesaria para que se den los cambios de hospedero (Funk et al., 1995).

Sobre esta línea de investigación, se reconstruyó la filogenia de varias especies de escarabajos del género *Ophraella* mediante el análisis de secuencias del ADN mitocondrial y de datos morfológicos y aloenzimáticos y sobre ésta se mapeó la historia de afiliación más parsimoniosa entre los escarabajos y las plantas que utilizan, tanto al nivel de tribu como al de géneros y especies. Se encontró que los cambios de hospedero se dan más frecuentemente de una especie a otra o de un género a otro dentro de una misma tribu de plantas, que entre especies situadas en tribus distintas (Funk et al., 1995). Además, el patrón de cambios de hospedero

mostró tal especificidad y polaridad, incluso en hábitats muy diferentes, que se ve apoyada la noción de que existen restricciones que determinan en gran medida qué cambios de hospedero son posibles (Funk et al., 1995). Esta conclusión se vio reforzada por los resultados de experimentos diseñados para detectar la presencia de variación genética cuantitativa en cada una de cuatro especies de *Ophraella* respecto al uso que pueden hacer de plantas de las que se alimentan sus congéneres. Se midieron las siguientes variables: supervivencia de las larvas, oviposición y respuesta de alimentación hacia alguna planta que no es utilizada por la especie de escarabajo en cuestión, sino por otra especie cercanamente relacionada, y se encontró evidencia de que existe muy poca variación genética de ese tipo (Futuyma et al., 1994, 1995).

Sin embargo, también hay casos en los que las distintas poblaciones de una sola especie de insecto pueden aparentemente hacer uso de nuevos hospederos con mucha facilidad y cuyas poblaciones locales frecuentemente usan distintas plantas, como por ejemplo, la mariposa *Euphydryas editha* (Singer et al., 1992, 1993). Radtkey y Singer (1995) usaron los patrones de restricción del ADN mitocondrial para inferir las relaciones evolutivas entre 24 poblaciones de este insecto y para establecer la historia de los cambios de hospedero, que resultó ser compleja, con colonizaciones independientes de una misma planta por poblaciones separadas y varias reversiones hacia plantas anteriormente utilizadas, aunque también se encontró evidencia de cierto conservadurismo en las preferencias.

Hacen falta más estudios que midan la variación genética cuantitativa en las respuestas de los insectos hacia las especies de plantas de las que no se alimentan normalmente en la naturaleza, para establecer cuánta de ella existe en la generalidad de las especies de insectos y conocer por lo tanto cuánto potencial existe para que ocurran cambios de hospedero (Futuyma et al., 1993).

Por otra parte, el problema de por qué algunas especies son relativamente generalistas mientras que otras están muy especializadas puede tener, aunque parcialmente, una explicación filogenética. Es decir, que los grupos que utilizan pocos recursos tiendan a dar origen a otros grupos igualmente especializados, incluso independientemente de cual sea el hospedero utilizado. Sin embargo, los estudios de este tipo no han dado resultados claros todavía (Jaenike, 1990; Mitter y Farrell, 1991; Thompson, 1994).

Estudios intraespecíficos

La mayor parte de los trabajos sobre interacciones realizados hasta la fecha se han efectuado al nivel de las poblaciones locales de una especie. Muchos de estos estudios han tratado de someter a prueba la hipótesis de la existencia de "trade-offs" en el desempeño sobre distintos hospederos como una explicación para la especialización, y de la correlación entre preferencia y desempeño como un resultado adaptativo de la especialización. Este último punto ha recibido particular interés para el caso de aquellas especies de insectos holometábolos que durante su etapa larvaria deben obligatoriamente utilizar el hospedero en el que su madre ovipositó, pues la adecuación de la progenie dependerá en gran medida de esta elección.

De esta manera, se han evaluado, para diversas especies de insectos, los patrones de desempeño de cierto número de individuos sobre dos o más de las posibles plantas hospederas. Los individuos pueden provenir de varias poblaciones, cada una localmente especializada en diferentes plantas, o de una misma población que usa más de un hospedero. Frecuentemente se estudian ambos

niveles simultáneamente. Los parámetros que generalmente se miden para cada planta son: preferencia de alimentación u oviposición, supervivencia, tasa de desarrollo, peso final de algún estadio (generalmente la pupa), fecundidad de los adultos resultantes. Se emplean diseños experimentales de genética cuantitativa para establecer la base genética de las variaciones observadas (Via, 1990). Lo que se espera es la correlación positiva de los parámetros en un mismo hospedero (e.g., si un insecto muestra mayor predilección hacia una planta, su supervivencia y desarrollo también deberán ser mejores en ella) y “trade-offs”, es decir correlaciones negativas entre hospederos (e.g., si un determinado genotipo tiene un alto desempeño en una especie de planta, este será pobre en otras especies).

Los resultados obtenidos no siempre han apoyado estas hipótesis. Se ha encontrado que la variación en el uso de los recursos tiene en muchos casos una base genética, tanto entre poblaciones como intrapoblacionalmente (Futuyma y Peterson, 1985; Singer et al., 1989, 1991; Via, 1990), pero las correlaciones esperadas no siempre existen. En particular, la correlación positiva entre preferencia y desempeño muchas veces no se cumple, y a veces puede ser negativa, pues en algunas especies de insectos, las hembras prefieren ovipositar en plantas sobre las que la supervivencia y desarrollo de las larvas son menores (Courtney, 1981; Futuyma y Moreno, 1988; Thompson, 1988; Jaenike, 1989). La correlación positiva entre al menos algunos de los parámetros del desempeño (supervivencia, tasa de desarrollo, peso al pupar, fecundidad de las hembras) en general sí se observa, pero puede diferir entre hospederos (Rausher, 1984; Via 1984b; Pashley, 1988).

Respecto a los “trade-offs”, la imagen general que se presenta en las revisiones sobre el tema (Futuyma y Peterson, 1985; Via, 1990), es que en especies con reproducción sexual, su búsqueda ha sido infructuosa en más de la

mitad de las ocasiones y que además, aparecen más frecuentemente en individuos pertenecientes a poblaciones que se alimentan de diferentes plantas (e.g., Rausher, 1984), que en individuos de la misma población. Lo anterior quiere decir que dentro de una población, cuando algún genotipo tiene un alto desempeño sobre una cierta planta, su desempeño sobre otra no necesariamente será bajo, sino que puede ser también alto (Rausher, 1984; Via, 1984a; Hare y Kennedy, 1986). Sin embargo, estudios como los de Futuyma y Philippi (1987), Pashley (1988) y Jaenike (1989) sí han encontrado este tipo de "trade-offs". Es notable que los estudios que han dado resultados positivos son posteriores a la crítica de Rausher (1988) a los diseños experimentales previos, lo cual significa que la cuestión no está cerrada todavía.

Otras posibilidades que han sido propuestas son que los "trade-offs" no están condicionados por características intrínsecas de las plantas, como la química secundaria, a la cual se le había dado importancia preponderante, sino por los enemigos naturales asociados, los cuales constituirían la fuerza principal que mantendría la especialización (Bernays y Graham, 1988).

Algunos autores (Futuyma, 1983; Futuyma et al., 1984) opinan que es difícil discriminar entre dos opciones: 1) que la evolución hacia la especialización se deba a que en las poblaciones ocasionalmente surgen genotipos fisiológicamente eficientes en el uso de un cierto recurso, los cuales tienen ventajas adaptativas sobre otros genotipos y 2) que las adaptaciones fisiológicas que permiten hacer uso eficiente de un recurso evolucionen *después* de la especialización puramente conductual. Si la segunda posibilidad es correcta, en muchos casos los "trade-offs" no tendrían porque observarse.

Berenbaum (1990) menciona algunos ejemplos de la manera en que la conducta permite hacer uso de algunos recursos, aún sin adaptación fisiológica. Algunas plantas de la familia Umbelliferae presentan furanocumarinas, que son compuestos altamente tóxicos. Algunos de los insectos especialistas que se alimentan de estas plantas poseen sistemas enzimáticos capaces de desintoxicar estos compuestos, sin embargo, muchos otros dependen de ciertas estrategias de alimentación (i.e., elegir sitios en que la concentración de furanocumarinas es menor) para no intoxicarse.

Todas estas discusiones son también relevantes para otro tema importante en la literatura sobre interacciones. Nos referimos a la posibilidad de especiación en simpatria por formación de razas asociadas a distintos hospederos (Bush y Diehl, 1982; Johnson et al., 1996). Cuando en una población de un determinado insecto existe inicialmente variación en el desempeño sobre distintos hospederos, cabe esperar que la selección natural favorezca la asociación de los genotipos con el hospedero sobre el que su desempeño es mejor. Esta asociación puede llevar a la adquisición de nuevas adaptaciones que fomenten una mayor especialización. De esta manera se formarán en la población "razas" diferenciadas genéticamente, asociadas cada una a un cierto hospedero. El proceso de diferenciación puede incluso seguir hasta que las razas constituyan de hecho especies distintas. Sin embargo, este modelo requiere de que se cumplan una serie de condiciones en las que la conducta juega un papel preponderante. En primer lugar, se necesita que los genotipos presenten una correlación positiva entre su preferencia y el desempeño sobre un cierto recurso. Además, los genotipos deberán aparearse preferentemente entre sí, pues de lo contrario no podrán formarse grupos de individuos diferenciados genéticamente y asociados a distintos hospederos (Johnson et al., 1996).

Pareciera, por lo tanto, que la formación de razas asociadas a hospederos no puede ser un fenómeno muy común. Sin embargo, en varias ocasiones se han reportado posibles ejemplos (Diehl y Bush, 1984; Mopper, 1996), aunque en algunos casos no está claro que los hospederos sean realmente simpátricos, o que las variaciones observadas tengan una base inequívocamente genética (Futuyma y Peterson, 1985). Por ejemplo, Jaenike (1981) estableció una serie de criterios para determinar la existencia de razas asociadas a hospederos y descartó prácticamente todos los posibles casos existentes hasta entonces.

Las técnicas moleculares pueden resultar útiles para el estudio de algunos de los problemas que hemos mencionado, sobre todo cuando se combinan con los resultados de experimentos ecológicos y de genética cuantitativa. Gracias a los marcadores moleculares se puede medir el grado de subdivisión y la cantidad de flujo génico entre poblaciones geográficamente separadas. Esta información es importante, puesto que se ha afirmado que el flujo génico es capaz de reducir la adaptación local, ya que tendrá un efecto disruptor sobre los complejos de genes coadaptados surgidos por selección natural (Slatkin, 1987).

Por ejemplo, Bossart y Scriber (1995) encontraron evidencia de que los individuos de tres poblaciones de la mariposa *Papilio glaucus* manifiestan preferencia y tienen un mejor desempeño sobre el hospedero que cada una de las poblaciones usa localmente. Sin embargo, no se encontró diferenciación en nueve loci enzimáticos polimórficos, lo cual significa que el flujo génico entre estas poblaciones ocurre libremente. Los autores concluyeron que sus resultados son un ejemplo de la manera en que los efectos opuestos de la presencia de distintos regímenes selectivos en cada población, y del flujo génico, pueden actuar para mantener la variación en características ecológicamente relevantes.

Los marcadores moleculares también pueden servir para detectar procesos de especialización a distintos hospederos, ya sea en simpatria o en alopatría.

En un estudio de este tipo, Waring et al. (1990) obtuvieron 21 muestras del díptero formador de agallas *Eurosta solidaginis*, 12 de ellas asociadas a la planta *Solidago gigantea* y 9 a *S. altissima*. En tres localidades se encontraron ambos hospederos en simpatria. Se observó que las distancias genéticas de Nei entre las poblaciones tuvieron mayor correlación con la planta hospedera a la que estaban asociadas las poblaciones, que con la distancia geográfica. Esto se hizo evidente en un dendograma elaborado mediante el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973), pues cada uno de los dos grupos principales que se formaron incluyó a las poblaciones provenientes de cada planta. La única excepción fue una de las muestras tomadas en una de las localidades con los hospederos en simpatria, que se ubicó en el grupo de las poblaciones colectadas sobre el otro hospedero (pero curiosamente no junto a la muestra tomada del otro hospedero en el mismo lugar).

Roininen et al. (1993) obtuvieron resultados similares con otro formador de agallas, *Euura atra* (Hymenoptera: Tenthredinidae), que es excepcional dentro de su familia por el gran número de especies de hospederos que puede utilizar. Sin embargo, los autores pusieron a prueba la hipótesis de que esta especie consiste en realidad de un conjunto de razas o incluso una serie de especies hermanas asociadas cada una a un hospedero particular. Mediante experimentos de preferencia de oviposición y la electroforesis de los productos enzimáticos de 8 loci polimórficos, encontraron que las hembras preferían significativamente a la especie de hospedero sobre la que habían sido tomadas, y que prácticamente no existe diferenciación genética entre las muestras provenientes de un mismo hospedero, pero sí entre hospederos, aún cuando estos se encuentren en simpatria.

Los trabajos llevados a cabo con el díptero *Rhagoletis pomonella* son clásicos en el tema de la formación de razas asociadas a hospederos. Se halló que este insecto posee dos razas en simpatria, una asociada a *Crataegus* spp. y la otra al manzano cultivado *Malus pumila* (Feder et al., 1993, 1994). Los experimentos de captura-recaptura demostraron que los insectos adultos preferentemente se reproducen y ovipositan en la misma planta en la que ellos se desarrollaron, es decir, le son fieles a su hospedero, lo cual actúa como una barrera reproductiva entre ambas razas. Sin embargo, los datos aloenzimáticos indican que el flujo génico entre ellas es de aproximadamente 6% por generación, el cual sería suficiente para eliminar rápidamente sus diferencias genéticas, de no estar estas mantenidas por selección natural (McPherson et al., 1988; Feder et al., 1990, 1994).

Por último, mencionaremos algunos trabajos realizados al nivel intraespecífico pero que se ubican mejor en el marco de las hipótesis no adaptativas para explicar la abundancia de taxa especialistas. Estos estudios se preguntan cuáles son los efectos que tiene la especialización sobre la estructura poblacional del insecto. Por ejemplo, muchos insectos móviles son capaces de localizar y seleccionar a su planta hospedera dentro de comunidades vegetales que incluyen a veces decenas o cientos de otras especies. Los insectos poseen por lo general, medios de locomoción, órganos sensoriales y patrones conductuales que les permiten hacerlo eficientemente y con alto grado de discriminación (Myers, 1985; Ramaswamy, 1988; Renwick y Radke, 1988; Renwick y Chew, 1994). Es posible que precisamente por ésto, la estructura poblacional del insecto esté determinada al menos en parte, por la estructura poblacional de la planta, sobre todo en insectos altamente específicos. Por ejemplo, si la distribución geográfica de la planta es muy fragmentada, sus insectos asociados probablemente tenderán a quedarse cerca de los parches de plantas y ocurrirá poco flujo génico y por lo tanto, diferenciación genética entre poblaciones asociadas a parches localizados.

En contraste, cuando las poblaciones locales de plantas son efímeras y su distribución cambia constantemente, los herbívoros se verán obligados a migrar entre localidades con cierta frecuencia, o se extinguirán junto con sus hospederos, fenómenos que pueden tener como consecuencia aumentos o disminuciones significativas en el grado de diferenciación genética entre poblaciones (Wade y McCauley, 1988; McCauley, 1991a). Estos estudios de hecho también podrían denominarse “de los efectos de las discontinuidades espaciales y temporales del hábitat” (Roderick, 1996).

McCauley (1991b) estudió la estructura genética del escarabajo especialista *Tetraopes tetraophthalmus* en relación con el tamaño de los parches de la planta de la que se alimenta, *Asclepias syriaca*. Se observó que las poblaciones encontradas sobre parches grandes estuvieron menos diferenciadas ($F_{ST} = 0.004$) que lo que lo estuvieron entre sí las poblaciones de los parches pequeños ($F_{ST} = 0.018$). Algunos experimentos de captura-recaptura apoyaron la conclusión de que esto se debe a que los parches pequeños mantienen tamaños poblacionales menores, además de que la tasa de emigración de ellos es superior, por lo que actúan como exportadores netos de migrantes, mientras que los parches grandes actúan como importadores netos.

Algunos otros trabajos han considerado la escala geográfica de las discontinuidades en la distribución de los hospederos. Rank (1992) muestreó al crisomélido *Chrysomela aeneicollis*, que durante toda su vida se encuentra asociado a *Salix* spp., en los siguientes niveles geográficos: 1) tres distintas localidades separadas por cerca de 40 km, 2) dentro de cada localidad, parches de *Salix* spp. con menos de 3 km entre sí y 3) dentro de cada parche, 2 a 8 árboles individuales separados entre 2 y 150 m. Se encontraron valores significativos de

F_{ST} entre localidades y entre parches, y en algunos casos, entre árboles de un mismo parche.

Por su parte, Costa y Ross (1993, 1994) estudiaron la estructura genética del lepidóptero *Malacosoma americanum*, que es gregario durante su etapa larval, considerando los siguientes niveles: 1) la colonia, 2) las colonias ubicadas en un mismo árbol hospedero, 3) el parche de árboles, 4) los demes locales compuestos por varios parches de árboles y 5) distintas regiones geográficas separadas por más de 200 km. Este insecto tiene una distribución muy amplia, pero en todas las localidades es casi completamente específico del árbol *Prunus serotina*. La estructuración más notable se observó en el nivel *entre* colonias, pues los individuos que forman cada una están estrechamente relacionados; mientras que a los demás niveles se encontraron valores de F_{ST} que implicaron muy poca diferenciación y por lo tanto, altos valores de flujo génico, lo que no deja de ser sorprendente si consideramos la distancia que separaba los lugares de colecta en las distintas regiones.

El estudio simultáneo de la estructura genética de la planta huésped y de alguno de sus insectos asociados puede ser útil para determinar si siguen patrones de subdivisión semejantes. Por ejemplo, Michalakis et al. (1993) no encontraron correlación entre la estructura genética del curculiónido *Larinus cynarae*, que mostró muy poca diferenciación a todas las escalas de muestreo, y la de la planta por la que muestra predilección en la localidad estudiada, la asterácea *Onopordum illyricum*, cuyos valores de F_{ST} fueron significativos entre varias poblaciones. La argumentación de los autores fue que los escarabajos seguramente son vágiles y tienden a dispersarse entre parches, mientras que las plántulas generalmente se establecen a unos pocos metros de su progenitor.

Whitlock (1992) puso a prueba la predicción teórica de que la inestabilidad de las poblaciones, puesta de manifiesto por frecuentes extinciones y recolonizaciones locales, puede tener como efecto incrementar su diferenciación genética promedio. Utilizó al escarabajo *Bolitotherus cornutus* que se alimenta, durante todas las etapas de su ciclo de vida, de los cuerpos fructíferos de tres especies de hongos que crecen en troncos muertos: *Ganoderma applanatum*, *Fomes fomentarius* y, menos frecuentemente, *Ganoderma tsugae*. Midió varios parámetros demográficos relevantes para los modelos teóricos, como por ejemplo: la distribución de los tamaños poblacionales, la tasa de migración, la tasa de extinción de las poblaciones establecidas, el número de fundadores de las poblaciones nuevas y la probabilidad de que todos los fundadores provinieran de una misma población. Estos datos cumplieron con las condiciones de los modelos. Por último, mediante electroforesis de enzimas, se encontró que las poblaciones recientemente fundadas de *B. cornutus* están más diferenciadas entre sí que las poblaciones que han permanecido estables por mayor tiempo.

Estudios en Bruchidae

La familia Bruchidae (Coleoptera) incluye unas 1300 especies de insectos que durante su etapa larval se alimentan de las reservas nutritivas contenidas en las semillas de una gran variedad de plantas (Southgate, 1979). Ninguna de ellas ha sido previamente estudiada utilizando marcadores moleculares para analizar su estructura genética, aunque en experimentos ecológicos y de genética cuantitativa se han encontrado diferencias de preferencia y desempeño sobre distintos hospederos. Por ejemplo, Janzen (1977), hizo ovipositar a *Callosobruchus maculatus* sobre las semillas de 63 especies de plantas no hospederas y observó que en todos los casos las larvas no pudieron completar su desarrollo por diversas

razones; una de las más importantes fue la toxicidad y dureza del tegumento de las semillas. Este tipo de experimentos demuestran que algunos hospederos no pueden ser explotados si no es mediante adaptaciones específicas (Center y Johnson, 1974).

En otros casos, se han reportado diferencias en el desempeño sobre las distintas plantas que el insecto utiliza. Siemens y Johnson (1990) encontraron que cuando individuos de *Stator limbatus* provenientes de *Cercidium floridum* ovipositan sobre las semillas de esta misma planta, la progenie que emerge es significativamente más numerosa que cuando las madres provienen de *C. microphyllum* o *Acacia greggi*. Sin embargo, sobre estos dos hospederos los brúquidos se desempeñaron igualmente bien independientemente del hospedero del que provinieron. Por su parte, Shade et al. (1987) midieron el desempeño de *Acanthoscelides obtectus*, en términos de su mortalidad, tiempo de desarrollo y peso seco de los adultos, sobre semillas de *Phaseolus vulgaris* y *P. acutifolius* y hallaron que el desarrollo de estos insectos se dificulta en cierta medida en las semillas de *P. acutifolius*. Por el contrario, Fox (1993) observó correlaciones positivas en el desempeño de *C. maculatus* sobre *Vigna angularis* y *V. unguiculata*, es decir, no hubo "trade-offs" entre ambos hospederos. Sus diseños experimentales le permitieron establecer la base genética de las correlaciones. Además, no encontró correlación positiva entre la preferencia y ninguno de los parámetros del desempeño.

Callejas (1996) midió el efecto de la variación intraespecífica de *P. coccineus* sobre la preferencia y desempeño de *Zabrotes subfasciatus*, utilizando dos poblaciones de una variedad silvestre de este frijol y dos variedades cultivadas. El desempeño de estos insectos fue mejor en una de las variedades cultivadas, pero también y en contra de lo esperado, en las semillas de una de las poblaciones

silvestres. Además, no hubo correlación positiva entre la preferencia y el desempeño.

Objetivos

En este trabajo se usan marcadores enzimáticos para las poblaciones de cinco especies de brúquidos (*Acanthoscelides* sp., *A. obiectus*, *A. obvelatus*, *Zabrotes subfasciatus* y *Z. silvestris*), que depredan las semillas de dos especies de frijol que presentan variedades silvestres (*Phaseolus coccineus* var. *formosus* y *P. vulgaris* var. *mexicanus*) y cultivadas (*P. c.* var. *coccineus*, *P. c.* var. *darwinianus* y *P. vulgaris*). El objetivo es inferir, a partir de los datos de estructura genética, algunos aspectos de la ecología y la evolución del uso de recursos en estos insectos. En particular, se pretende:

- 1) Determinar hasta donde sea posible el patrón de uso de recursos de estos insectos. En otras palabras, ¿cuál o cuáles de las variedades de frijol mencionadas son de hecho utilizadas por cada especie de brúquido y con qué frecuencia?. Esto proporcionará un indicio de sus preferencias y grado de especialización.
- 2) Describir los patrones de diferenciación genética y establecer su posible correlación con el tipo de hospedero y/o la distancia geográfica. En el primer caso, se parte de que las diferencias intra- e interespecíficas en el frijol pueden estar determinando la existencia de razas asociadas a cada tipo de hospedero. Sobre todo, las diferencias entre las variedades silvestres y las cultivadas, que son resultado de la selección artificial bajo domesticación, parecen *a priori* lo suficientemente importantes como para requerir distintas adaptaciones y estrategias de explotación. Suponiendo que esto efectivamente sea cierto, y que además se cumplen las otras condiciones mencionadas anteriormente para la

formación de razas asociadas a hospederos, lo que aquí se espera es una menor diferenciación genética, entre aquellas poblaciones obtenidas a partir del mismo tipo de hospedero que entre las obtenidas de hospederos diferentes.

Por otra parte, se pretende examinar en qué medida la subdivisión de las poblaciones es un simple resultado de la distancia geográfica entre las localidades, o alternativamente, de las limitaciones que tienen las capacidades de dispersión de los brúquidos. Además, cuantificando la magnitud del flujo génico se podrá obtener cierta idea de hasta que grado los posibles procesos de adaptación local pueden verse entorpecidos por el intercambio de individuos.

3) Efectuar algunas comparaciones de los patrones de subdivisión y la cantidad de variación genética presente en las especies estudiadas. En caso de que existan diferencias importantes, pueden buscarse correlaciones con otras diferencias que presentan las especies, por ejemplo, respecto a la amplitud de su distribución geográfica, su importancia como plagas y algunos aspectos de su historia de vida.

Por último, es importante recalcar que este trabajo forma parte de un proyecto más amplio que tiene por objetivo lograr la integración de los aspectos ecológicos y genéticos de la interacción entre las plantas de frijol, los depredadores de sus semillas y los parasitoides de estos últimos. De esta forma, los resultados aquí presentados son complementarios con los obtenidos mediante experimentos ecológicos y de genética cuantitativa realizados de forma paralela, que buscan evaluar las preferencias y el desempeño de los brúquidos sobre distintos hospederos y establecer su base genética. Gracias a esta combinación de enfoques se puede lograr una visión mucho más completa de los procesos de especialización y adaptación local de estos organismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del sistema de estudio

Los géneros *Acanthoscelides* y *Zabrotes* contienen varias decenas de especies (Johnson, 1983; Kingsolver, 1990), pero las más conocidas son *Acanthoscelides obtectus* y *Zabrotes subfasciatus* porque a nivel mundial son dos de las plagas más importantes de las semillas almacenadas de frijol (Cardona y Posso, 1987; Abate y Ampofo, 1996).

Los adultos de *A. obtectus* miden de 4 a 5 mm de longitud. Son de color café pardo, los élitros no cubren totalmente el abdomen, son estriados y con varias manchas definidas. Las hembras y los machos son muy semejantes, aunque las hembras próximas a ovipositar son de mayor tamaño y tienen el pigidio más pequeño, mientras que en los machos la sutura que separa al pigidio del último segmento abdominal hace una pronunciada curvatura hacia la región anterior (Jonhson, 1983).

En condiciones de almacén, las hembras ponen hasta 60 huevecillos entre las semillas. Cuando eclosionan, las larvas penetran al interior de las semillas, donde pasan por cuatro estadios larvales antes de pupar. Al final de la tercera semana, la larva hace una celda pupal en la cual realiza la cuarta muda e inicia la metamorfosis. Después de emerger, los adultos permanecen en las celdas durante varios días antes de salir al exterior. En condiciones experimentales (25 ° C y 55 % de humedad relativa), el ciclo de vida dura entre 27 y 28 días, aunque puede ser más largo dependiendo de las condiciones específicas (Ortega, 1987).

Por su parte, los adultos de *Zabrotes subfasciatus* miden entre 2 y 3 mm de longitud. Las hembras son de color negro, con cuatro manchas de color blanco en los élitros, el macho es de color gris uniforme y un poco más pequeño que la hembra (Kingsolver, 1990).

La hembra oviposita entre 40 y 60 huevos a lo largo de su vida, los cuales adhiere a la testa de las semillas. El período de oviposición dura de 3 a 4 días y el de incubación de 4 a 5 días a una temperatura de 30° C y 70 % de humedad relativa (Sánchez, 1992). Las larvas también pasan por cuatro estadios, y su tiempo de desarrollo es de 28 a 30 días, prolongándose cuando la temperatura es menor a 27 °C (Ramírez, 1991).

El desarrollo de ambos brúquidos transcurre por completo en el interior de una sola semilla. Varios adultos pueden emerger de cada semilla, dependiendo del tamaño de ésta. Por ejemplo, se ha observado que de semillas grandes de *Phaseolus coccineus* var. *coccineus* pueden emerger hasta 15 individuos de *Z. subfasciatus* (Callejas, 1996).

A pesar de su status como plagas de almacén, ambas especies también han sido reportadas atacando las semillas de variedades silvestres de frijol (Delgado et al., 1988; Leroi et al., 1990). Sin embargo, existen grandes diferencias en las características de las semillas y del hábitat entre ambos tipos de condiciones, como resultado del proceso de domesticación y del manejo que se le da a las semillas después de cosechadas. En el campo, la conducta de *A. obtectus* es diferente, pues deben localizar las vainas maduras de su hospedero y penetrar por una abertura situada en la línea de dehiscencia cercana al pedicelo. De esta manera, puede ovipositar de manera que los huevecillos queden en contacto con las semillas. Otra estrategia que ha sido observada, es la elaboración de un orificio para penetrar a

través de la pared de la vaina, sobre todo cuando éstas no han madurado completamente (Ortega, 1987; Delgado et al., 1988; Leroi et al., 1990). Las hembras de *Z. subfasciatus* también utilizan la abertura en la línea de dehiscencia para adherir sus huevecillos a la primera semilla contenida en la vaina, u ovipositan sobre las semillas en el suelo después de que han sido dispersadas por la "explosión" de las vainas.

El proceso de selección artificial bajo domesticación ha tenido por efecto incrementar de forma notable la variación intra- e interespecífica en estas plantas. En las cuatro especies de *Phaseolus* que se usan en la agricultura (*P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* y *P. acutifolius*) se han encontrado importantes diferencias bioquímicas, fisiológicas, morfológicas y fenológicas entre las variedades silvestres y cultivadas. Según Smartt (1988), las variedades cultivadas presentan 1) gigantismo de las partes utilizadas por el hombre (principalmente semillas y vainas), 2) supresión de los mecanismos de dispersión de las semillas, 3) cambios en la forma de crecimiento, 4) cambios en la historia de vida, 5) pérdida del período de latencia de las semillas, 6) diferencias bioquímicas y 7) varios tipos de cambios fisiológicos con respecto a las formas silvestres que probablemente les dieron origen.

De todos estos cambios, los que probablemente son más relevantes para los brúquidos son el tamaño de la semillas y su composición bioquímica. Leroi et al. (1990) reportan que de los frijoles silvestres *P. vulgaris* var. *mexicanus* y *P. coccineus* var. *formosus* en promedio emergen 1.5 individuos de *A. obtectus* por semilla, mientras que en sus contrapartes cultivadas, *P. vulgaris* y *P. coccineus* var. *coccineus* pueden desarrollarse hasta 10 ó 15 individuos. Los adultos emergidos de las semillas silvestres son además de tamaño consistentemente menor, lo cual puede estar asociado con una fecundidad también menor.

Gepts (1990) utilizó a la proteína faseolina y a varias enzimas como marcadores y encontró que el proceso de domesticación tuvo efectos similares a los de un cuello de botella, pues los niveles de variabilidad genética son mucho menores en las variedades cultivadas. Como resultado o paralelamente a la pérdida de diversidad genética también ha ocurrido una reducción en la diversidad de compuestos secundarios, muchos de ellos defensas potenciales contra herbívoros y patógenos. Lindig y Espinosa (1997a,b), encontraron que las plantas silvestres de *P. vulgaris*, *P. coccineus* y *P. lunatus* tienen una mayor diversidad de isoflavonoides inducibles, lo cual las hace menos susceptibles al ataque de hongos patógenos. De igual manera, la cantidad de compuestos tóxicos de las semillas se ha reducido notablemente. Por ejemplo, la concentración de glucósidos cianogénicos en *P. lunatus* cultivado es 20 veces menor que la de algunas plantas silvestres (Smartt, 1988). En *P. vulgaris* se ha encontrado que las semillas silvestres presentan arcelina; una proteína que en experimentos de laboratorio ha demostrado ser un factor de resistencia contra *A. obtectus* y *Z. subfasciatus*, mientras que en las semillas cultivadas la concentración es tan reducida que no muestran resistencia (Cardona y Posso, 1987).

La presencia de enemigos naturales es otra gran diferencia entre las condiciones silvestres y las de almacén. Pérez y Bonet (1984) encontraron que en la zona de Tepoztlán, Morelos, las larvas de *A. obtectus* que se desarrollan en semillas silvestres son parasitadas por cinco especies de himenópteros pertenecientes a cinco familias distintas. En cambio, tanto *A. obtectus* como *Z. subfasciatus* sufren un parasitismo mucho menor cuando se desarrollan en semillas cultivadas almacenadas (A. González, observación personal). Por su parte, el empleo rutinario de insecticidas en los almacenes es un factor al que no tienen que enfrentarse las poblaciones que usan hospederos silvestres.

Las otras especies estudiadas en este trabajo son brúquidos con los que *A. obtectus* y/o *Z. subfasciatus* coexisten comúnmente en algunas regiones, pero que no están tan ampliamente distribuidas ni se han convertido en plagas tan importantes como ellas. Tal es el caso de *Acanthoscelides obvelatus*, que difiere de *A. obtectus* sólo en la coloración del último artejo antenal y la disposición de la armadura del saco interno de la genitalia masculina, por lo que se considera que son especies hermanas (Johnson, 1983). En la región de Tepoztlán, Morelos, frecuentemente se les encuentra juntas, tanto en frijoles cultivados como silvestres (Leroi et al., 1990; A. González, observación personal). Sin embargo, *A. obvelatus* se distribuye únicamente en México y parte de América Central (Delgado et al., 1988). En esta tesis se incluyeron ambas especies, más una tercera especie no determinada del mismo género.

Zabrotes silvestris es una nueva especie cuyo reconocimiento como tal se efectuó en primera instancia gracias a los análisis genéticos realizados en este trabajo (ver más adelante), ya que ella y *Z. subfasciatus* son también un par de especies hermanas casi idénticas en su morfología externa. La descripción formal de esta nueva especie se está preparando para su publicación (J. Romero-Nápoles, en preparación).

Métodos de colecta

Las semillas cultivadas de *P. vulgaris* y de *P. coccineus* var. *coccineus* y *P. coccineus* var. *darwinianus* se obtuvieron mediante su compra directa en mercados de varias localidades del país. Se eligieron poblados de tipo rural para tratar de asegurar que el frijol hubiera sido cultivado en las cercanías del lugar y no transportado desde sitios alejados. Este muestreo se efectuó a dos escalas

geográficas. Entre noviembre de 1995 y febrero de 1996 se visitaron mercados ubicados en los estados de Puebla, Querétaro, Morelos, Veracruz, Oaxaca, Guerrero y San Luis Potosí (Cuadro 1). En cambio, entre diciembre de 1996 y

Cuadro 1. Año de colecta, especie, variedad y status de las semillas obtenidas en cada una de las localidades incluidas en este estudio.

Localidad	Clave	Año de colecta	Especie y variedad de frijol	Silvestre/Cultivada
Aguaxitlán, Pue.	AGU	1996	<i>P. coccineus</i> var. <i>coccineus</i>	Cultivada
Cuetzalan, Pue.	CUE	1996	<i>P. coccineus</i> var. <i>darwinianus</i>	Cultivada
Veracruz, Ver.	VER	1996	<i>P. coccineus</i> var. <i>coccineus</i>	Cultivada
Veracruz II, Ver.	VERII	1996	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Jalpan, Qro.	JAL	1996	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Oaxaca, Oax.	OAX	1996	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
San Luis Potosí, SLP	SLP	1996	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Taxco, Gro.	TAX	1996	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Tehuacán, Pue.	TEH	1996	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Tepoztlán I, Mor.	TEPI	1996	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Tepoztlán II, Mor.	TEPII	1996	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Tepoztlán III, Mor.	TEPIII	1997	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Tepoztlán IV, Mor.	TEPIV	1997	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Tepoztlán V, Mor.	TEPV	1997	<i>P. vulgaris</i>	Cultivada
Bosque de Tlalpan, D.F.	TLA	1996	<i>P. coccineus</i> var. <i>formosus</i>	Silvestre
Huitzilac, Mor.	HUI	1996, 1997	<i>P. coccineus</i> var. <i>formosus</i>	Silvestre
Tierra de Gordillo, Pue.	GOR	1997	<i>P. coccineus</i> var. <i>formosus</i>	Silvestre
Tepoztlán, Mor.	TEP	1997	<i>P. vulgaris</i> var. <i>mexicanus</i>	Silvestre
San Andrés de la Cal, Mor.	SAC	1996, 1997	<i>P. vulgaris</i> var. <i>mexicanus</i>	Silvestre

enero de 1997 se adquirieron únicamente frijoles sembrados en el estado de Morelos y puestos a la venta en el mercado de Tepoztlán (Cuadro 1). Esto se hizo con el objeto de evaluar la relación entre la distancia geográfica y la diferenciación genética de las poblaciones de brúquidos. Por su parte, las semillas de frijol silvestre se obtuvieron gracias a la colecta, también durante las dos temporadas consecutivas, de las vainas maduras de *P. vulgaris* var. *mexicanus* y *P. coccineus* var. *formosus* en localidades de Morelos, Puebla y D.F. Por lo tanto, la escala geográfica de estas colectas es comparable a la colecta de frijoles cultivados de 1997. En el Cuadro 2 se detallan la ubicación, altitud, tipo de vegetación y clima de las localidades silvestres.

Las semillas cultivadas y las vainas silvestres fueron llevadas al laboratorio donde se esperó la emergencia de los insectos. Los individuos se congelaron a -80°C hasta que la electroforesis se llevó a cabo.

Cuadro 2. Ubicación, altitud, tipo de vegetación y clima de las localidades en las que se colectaron variedades silvestres de *Phaseolus*.

Clave	Municipio, Estado (Latitud, Longitud)	Altitud MSNM	Tipo de Vegetación	Clima
TLA	D.F., México (1913 N, 9914 W)	2800	Ecotono de matorral xerófilo y bosque de <i>Quercus</i> y <i>Pinus</i>	C(W) (W)b
HUI	Huitzilac, Mor. (1900 N, 9916 W)	2200-2300	Bosque de <i>Quercus</i> y <i>Pinus</i> con zonas abiertas de cultivos anuales.	C(w) ² (w)
GOR	Tilapa, Pue. (1837 N, 9834 W)	1250	Vegetación secundaria en bosque de galería (<i>Taxodium</i> sp.) en el límite de zona agrícola.	Aw ⁰ (w)
TEP	Tepoztlán, Mor. (1990 N, 9907 W)	1900	Bosque de <i>Quercus</i> , límite de bosque con la zona agrícola.	AC(w) ¹ (w)
SAC	Tepoztlán, Mor. (1855 N, 9908 W)	1430	Bosque tropical caducifolio, límite del bosque (Tezcal) con la zona agrícola.	A (w) (w)

Tomado de Leroi et al. (1990)

Electroforesis

Se empleó la técnica de electroforesis de isoenzimas en acetato de celulosa (Richardson et al., 1986), siguiendo el protocolo detallado por Herbert y Beaton (1986). Los brúquidos completos se maceraron con 30 µl de agua desionizada, en el interior de tubos para microcentrifuga de 1 ml. El homogenado obtenido se centrifugó a 6400 rpm durante 10 min. Se tomaron 8 µl del sobrenadante de cada muestra, el resto se congeló a - 80°C para realizar posibles repeticiones. Se probaron las siguientes enzimas: alcohol deshidrogenasa (ADH; E.C. 1.1.1.1), aldehído oxidasa (AO; E.C. 1.2.3.1), fosfatasa alcalina (ALP; E.C. 3.1.3.1), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; E.C. 1.1.1.49); glutamato-oxaloacetato transferasa (GOT; E.C. 2.6.1.1), glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH; E.C. 1.1.1.8), isocitrato deshidrogenasa (IDH; E.C. 1.1.1.42), lactato deshidrogenasa (LDH, E.C. 1.1.1.27), leucina aminopeptidasa (LAP), malato deshidrogenasa (MDH; E.C. 1.1.1.37), enzima málica (ME; E.C. 1.1.1.40), peptidasa (PEP; E.C. 3.4.11 ó 3.4.13), fosfoglucomutasa (PGM; E.C. 2.7.5.1) 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH; E.C. 1.1.1.44), y fosfoglucosa isomerasa (PGI; E.C. 5.3.1.9). Para las especies de *Acanthoscelides*, las enzimas para las que se logró una buena definición fueron IDH (con dos loci), GPDH, MDH, PGI y PGM. Para *Zabrotes* spp., se seleccionaron IDH (también con dos loci), GPDH, GOT, MDH y PGI. En los Cuadros 3 y 4 se especifican las condiciones para la electroforesis de cada una de las enzimas para cada género. En el apéndice B se proporcionan las fórmulas para preparar las soluciones amortiguadoras y las fórmulas para la tinción de cada una de las enzimas utilizadas (tomadas de Herbert y Beaton, 1986).

Cuadro 3. Enzimas estudiadas y condiciones para la electroforesis en *Acanthoscelides* spp.

Enzima	Locus	Número	Amortiguador	Voltaje	Tiempo
Isocitrato deshidrogenasa	IDH-1 IDH-2	E.C. 1.1.1.42	Citrato-Fosfato (A) pH = 6.4	150 V	1.5 hr
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	GPDH	E.C. 1.1.1.8	Tris-Citrato (J) pH = 8.2	150 V	40 min
Malato deshidrogenasa	MDH	E.C. 1.1.1.37	Citrato-Fosfato (A) pH = 6.4	80 V	2 hr
Glucosa-Fosfato Isomerasa	PGI	E.C. 5.3.1.9	Citrato-Fosfato (A) pH = 6.4	80 V	2 hr
Fosfoglucomutasa	PGM	E.C. 2.7.5.1	Tris-Maleato (K) pH = 7.2	50 V	2 hr

Cuadro 4. Enzimas estudiadas y condiciones para la electroforesis en *Zabrotes* spp.

Enzima	Locus	Número	Amortiguador	Voltaje	Tiempo
Isocitrato deshidrogenasa	IDH-1 IDH-2	E.C. 1.1.1.42	Citrato-Fosfato (A) pH = 6.4	60 V	2 hr
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	GPDH	E.C. 1.1.1.8	Tris-Citrato (J) pH = 8.2	150 V	40 min.
Glutamato-oxaloacetato transaminasa	GOT	E.C. 2.6.1.1	Tris-HCl (O) pH = 9.0	140 V	1 hr
Malato deshidrogenasa	MDH	E.C. 1.1.1.37	Citrato-Fosfato (A) pH = 6.4	120 V	2 hr
Glucosa-fosfato isomerasa	PGI	E.C. 5.3.1.9	Citrato-Fosfato (A) pH = 6.4	100 V	1.5 hrs

Análisis de los datos

Se formaron matrices de datos con los genotipos inferidos de todos los individuos analizados para cada uno de los loci estudiados. Estas matrices se utilizaron para correr el programa de computadora BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981). Con este programa se obtienen en primer lugar las frecuencias alélicas para cada locus en cada población. A partir de éstas, es posible calcular una serie de estimadores que permiten evaluar la cantidad de variación genética *dentro* de las poblaciones y la distribución de esa variación *dentro* y *entre* poblaciones. A esto último se le llama estructura genética.

Análisis intrapoblacionales. Los estimadores más utilizados para medir la variación genética presente en las poblaciones son (Hartl y Clark, 1989):

1) Proporción de loci polimórficos o polimorfismo (P). Un locus es polimórfico cuando presenta más de un alelo. Puesto que la probabilidad de encontrar más de un alelo en un locus se incrementa conforme aumenta el número de individuos muestreados, se determinó un criterio arbitrario para decidir si un locus es polimórfico, sea cual sea el tamaño de muestra. De esta manera, se dice que es polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no excede el 95 ó el 99 %. Para estimar el polimorfismo, únicamente se calcula la proporción de loci que fueron polimórficos con respecto al total de loci estudiados.

2) Heterocigosidad promedio esperada (H). Es el porcentaje promedio de loci heterocigos por individuo, o equivalentemente, el porcentaje promedio de individuos heterocigos por locus. Para calcularla, primero se obtiene la heterocigosidad en cada locus como $H = 1 - \sum p_i^2$; donde p_i es la frecuencia de cada uno de los alelos presentes en el locus, y luego se obtiene el promedio para todos

los loci estudiados. Este índice puede tomar valores desde 0 (cuando no existe variación genética) a 1.

3) Número promedio de alelos por locus (A). Es simplemente el resultado de obtener el promedio aritmético del número de alelos presentes en cada uno de los loci estudiados.

Se calcularon estos tres índices para cada una de las poblaciones de brúquidos. El polimorfismo se obtuvo con el criterio del 95% y la heterocigosidad esperada en cada locus mediante el método de Levene (1949) que da una estimación no sesgada aún cuando los tamaños de muestra sean pequeños. La heterocigosidad observada se obtuvo contando directamente el número de individuos heterocígos por locus.

Para estimar la estructura intrapoblacional (Crow, 1986; Hartl, 1988; Hartl y Clark, 1989):

1) Coeficiente de endogamia (F). Fue propuesto por Wright (1921) y mide la reducción en la heterocigosidad *dentro* de una población debido al cruzamiento entre parientes, con respecto a la heterocigosidad esperada en equilibrio Hardy-Weinberg. Se dice que una población está en equilibrio Hardy-Weinberg cuando no está presente ninguna de las fuerzas evolutivas y entonces las frecuencias alélicas y genotípicas permanecen estables y no cambian de generación en generación. Bajo estas condiciones, la relación entre las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas está dada simplemente por la fórmula del binomio cuadrado. Para dos alelos es la siguiente:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

donde p = frecuencia del alelo A; q = frecuencia del alelo a; p^2 = frecuencia del genotipo AA; $2pq$ = frecuencia del genotipo Aa y q^2 = frecuencia del genotipo aa.

En aquellas poblaciones en las que los apareamientos entre parientes ocurren comúnmente, las frecuencias genotípicas no se encuentran en esta relación con las frecuencias alélicas, sino que existe un menor número de heterócigos que el esperado. El índice F se calcula como $F = (H_o - H)/H_o$, siendo H_o la heterocigosidad esperada y H la heterocigosidad observada. Los valores positivos indican deficiencia de heterócigos observados y los negativos exceso.

Este índice se calculó para cada locus polimórfico y población. La significancia de los resultados se estimó mediante una prueba de X^2 de Li y Horovitz (1953), que utiliza la fórmula $X^2 = F^2 N (k-1)$; $gl = [k(k-1)]/2$; k = número de alelos, N = tamaño de muestra.

2) Otra manera de evaluar la importancia de las desviaciones en las frecuencias genotípicas con respecto a lo esperado en equilibrio Hardy-Weinberg es comparando la frecuencia esperada de cada genotipo con su frecuencia observada mediante una prueba de X^2 de bondad de ajuste. Esto se hizo para cada locus en cada población utilizando la fórmula de Levene (1949) y la corrección de Yates para tamaños de muestra pequeños. El análisis se repitió agrupando todos los genotipos en tres clases: 1) los homocigotos para el alelo más común; 2) los heterocigotos para el alelo común y cualquier otro alelo y 3) cualquier otra combinación. Esto se hace debido a que la prueba de X^2 no es muy confiable cuando la frecuencia esperada de ciertas clases es baja (Sokal y Rohlf, 1969), como es el caso de los homócigos para los alelos raros.

Análisis interpopulacionales. Determinar si un locus se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg en todas las poblaciones muestreadas es además importante para establecer su neutralidad, lo cual es un requisito para poder utilizarlo en los

análisis que se describen a continuación. Cuando un locus es neutro, las frecuencias alélicas en cada una de las poblaciones no dependerán de procesos específicos de cada localidad, como el grado de endogamia o el régimen selectivo; sino que únicamente son resultado de la cantidad de flujo génico entre poblaciones y de la deriva. Una vez satisfecha esta condición, pueden calcularse los siguientes índices (Crow, 1986; Hartl, 1988; Hartl y Clark, 1989):

1) Estadísticos de F de Wright. Propuestos por Wright (1951), son los índices más frecuentemente usados para describir la estructura poblacional. Funcionan a tres niveles jerárquicos: en una población subdividida podemos hablar de individuos (I), subpoblaciones (S) y la población total (T). H_i es la heterocigosidad *observada* de un individuo en una subpoblación dada, H_S es la heterocigosidad *esperada* de un individuo en una subpoblación equivalente en la que todos los apareamientos se realizaran al azar y H_T es la heterocigosidad *esperada* de un individuo si la población total no estuviera subdividida y los apareamientos se realizaran al azar. Los tres estadísticos son F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} y se definen como $F_{IS} = (H_S - H_i)/H_S$; $F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$; $F_{IT} = (H_T - H_i)/H_T$. Por lo tanto, F_{IS} mide la reducción en la heterocigosidad de un individuo debido a apareamientos no al azar dentro de la subpoblación en la que se encuentra, con respecto a una subpoblación ideal en la que todos los apareamientos se realizaran al azar. Puede tomar valores positivos cuando la heterocigosidad es menor que la esperada y negativos cuando la heterocigosidad es mayor que la esperada. F_{ST} mide la reducción en la heterocigosidad *esperada* de un individuo que se encuentra en una subpoblación con respecto a la *esperada* en un individuo que se encontrara en una población no subdividida con apareamientos al azar, es decir, mide los efectos de la subdivisión. Toma valores entre 0 (ambas subpoblaciones tienen idénticas frecuencias alélicas) y 1 (existen alelos alternativos fijos en cada una de las subpoblaciones).

Por último, FIT mide la reducción en la heterocigosidad *observada* de un individuo que se encuentra en una subpoblación con respecto a la *esperada* en un individuo en una población no subdividida con apareamientos al azar, es decir, toma conjuntamente en cuenta los efectos de los apareamientos no al azar dentro de las subpoblaciones y los efectos de la subdivisión.

Weir y Cockerham (1984) introdujeron los estimadores f , θ y F , que son equivalentes a FIS, FST y FIT, pero que tienen la ventaja de considerar la posibilidad de diferentes tamaños de muestra en términos de poblaciones observadas, individuos muestreados, loci registrados y alelos observados. El estimador θ ocasionalmente puede tomar valores negativos, los cuales se interpretan como un signo de que la estructura poblacional es demasiado pequeña para ser detectada.

Se obtuvieron los valores de las F de Wright y de los estimadores de Weir y Cockerham para cada locus y sus promedios para todos los loci. Se utilizó otro programa de computadora, originalmente propuesto por Weir (1990) y mejorado por Alvaro Chaos (sin publicar), para calcular f , θ y F . Este programa emplea un procedimiento de jackknife para obtener los promedios, con su respectiva desviación estándar, de los tres estimadores, y el método de bootstrap con 1000 remuestras para estimar los intervalos de confianza al 95% de los valores promedio (Weir, 1990).

Para determinar si los valores de FIS, FIT, f y F fueron significativamente diferentes de cero, se utilizó la fórmula $X^2 = F^2 N$ (Nei, 1977). Para los valores de FST y θ se empleó la prueba propuesta por Workman y Niswander (1970) en donde $X^2 = 2NFST(k-1)$. En ambos casos, $gl = [(k-1)(s-1)]$; k = número de alelos, s = número de subpoblaciones.

2) El grado de subdivisión entre las poblaciones también puede evaluarse midiendo la significancia de la heterogeneidad de las frecuencias alélicas entre poblaciones. Esto se hizo mediante una prueba de χ^2 para una tabla de contingencia de $M \times N$ utilizando la fórmula de Pearson, donde M es el número de poblaciones y N el número de alelos.

3) Distancias e identidades genéticas. Otros índices capaces de estimar las diferencias entre poblaciones en términos de su composición genética, son las distancias e identidades genéticas, de las cuales las más frecuentemente utilizadas son las de Nei (1972, 1978). La distancia genética estándar de Nei (1972) entre dos poblaciones se define como:

$$D = -\ln [G_{xy}/(G_x G_y)]^{1/2}$$

donde G_x , G_y y G_{xy} son las medias de $\sum p_i^2$, $\sum q_i^2$ y $\sum p_i q_i$, sobre todos los loci. $\sum p_i^2$ y $\sum q_i^2$ son iguales a la probabilidad de que dos alelos tomados al azar dentro de una misma población sean idénticos. $\sum p_i q_i$ es igual a la probabilidad de que dos alelos, tomados uno de cada población, sean idénticos.

Se obtuvo la matriz de distancia genética para todos los pares posibles de poblaciones y con estos datos se construyeron dendogramas mediante el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973).

4) Otro parámetro fundamental de la estructura poblacional es el flujo de genes promedio entre poblaciones ($N_e m$). Cabe aclarar que los modelos disponibles no estiman cuánto flujo génico está en realidad ocurriendo, sino cuánto debió haber ocurrido para que aparecieran los patrones de diferenciación observados (Slatkin,

1987). Wright (1951) demostró que existe una relación entre su estadístico F_{ST} y el flujo de genes, según: $F_{ST} = 1/(1 + 4N_e m)$, donde N_e es el tamaño efectivo promedio de las poblaciones y m la tasa promedio de inmigración. Esta relación se cumple para alelos selectivamente neutros y fue elaborada para un modelo de estructura poblacional en "islas" (Wright, 1931), en el cual todas las poblaciones (islas) tienen igual probabilidad de recibir un migrante proveniente de cualquier otra.

Slatkin (1985) propuso otro método para estimar cuantitativamente $N_e m$, el cual utiliza la frecuencia promedio ($p(1)$) de los alelos que se encuentran exclusivamente en una población (llamados alelos "privados"), ya que es una función simple de la cantidad de flujo génico entre las poblaciones. La fórmula es la siguiente:

$$N_e m^* = e^{\frac{(-\ln [p(1)] - 2.44) / 0.505}{N/25}}$$

donde N = número promedio de individuos muestreados por población

Sin embargo, según Slatkin y Barton (1989), se espera que ambos métodos den resultados similares bajo una variada cantidad de condiciones.

En este trabajo, se obtuvo $N_e m$ a partir de los valores de F_{ST} y θ para cada locus y de sus promedios por la fórmula de Wright. También se empleó la fórmula de Slatkin, la cual no proporciona un valor para cada locus, sino únicamente un valor global.

RESULTADOS

Doce de las diecinueve muestras de semillas de las diferentes especies y variedades de frijol estuvieron plagadas por brúquidos del género *Acanthoscelides* y siete por *Zabrotes*. A partir de las semillas cultivadas se obtuvieron insectos de ambos géneros, aunque en ningún caso se observaron juntos en la misma muestra, mientras que de las vainas silvestres emergieron únicamente individuos de *Acanthoscelides*. Las especies más comunes fueron *A. obtectus*, *A. obvelatus* y *Z. subfasciatus*. *Acanthoscelides* sp. estuvo presente en únicamente una muestra, y *Z. silvestris* en dos.

En el Cuadro 5 se especifican las especies de brúquidos que estuvieron presentes en cada muestra y el número de individuos de cada especie que fueron sometidos a electroforesis por muestra. Como se observa, las claves de aquellas localidades en las que *A. obtectus* y *A. obvelatus* se encontraron juntas se modificaron, añadiendo un 1 para designar a la población formada por los individuos de *A. obtectus* y un 2 para los individuos de *A. obvelatus*. Huitzilac y San Andrés de la Cal fueron las únicas localidades que se muestrearon tanto en 1996 como en 1997. En la primera, *A. obvelatus* fue el único brúquido presente durante ambos años. Puesto que las frecuencias alélicas prácticamente no cambiaron, los individuos de ambos años se manejaron como una sola población (HUI). Para San Andrés de la Cal, los 30 individuos de *A. obtectus* de 1996 mas los 4 de 1997 forman la población SAC1, y los 29 individuos de *A. obvelatus* de 1997 forman la población SAC2 (Cuadro 5).

A continuación se describen detalladamente los resultados de los análisis efectuados, por separado para cada uno de los dos géneros de brúquidos.

Cuadro 5. Especies de brúquidos presentes por muestra y número de individuos sometidos a electroforesis para todas las localidades.

Localidad	Especie y variedad de frijol	Especies presentes de brúquidos	Número de individuos de cada especie	Clave de las poblaciones
Aguaxitlán, Pue.	<i>P. c. var. coccineus</i>	<i>A. obtectus</i>	50	AGU
Cuetzalan, Pue.	<i>P. c. var. darwinianus</i>	<i>Z. subfasciatus</i>	30	CUE
Veracruz, Ver.	<i>P. c. var. coccineus</i>	<i>A. obtectus</i>	30	VER
Veracruz II, Ver.	<i>P. vulgaris</i>	<i>A. obtectus</i>	30	VERII
Jalpan, Qro.	<i>P. vulgaris</i>	<i>A. obtectus</i>	9	JAL1
		<i>A. obvelatus</i>	21	JAL2
Oaxaca, Oax.	<i>P. vulgaris</i>	<i>Z. subfasciatus</i>	30	OAX
San Luis Potosí, SLP	<i>P. vulgaris</i>	<i>Z. silvestris</i>	30	SLP
Taxco, Gro.	<i>P. vulgaris</i>	<i>Z. subfasciatus</i>	30	TAX
Tehuacán, Pue.	<i>P. vulgaris</i>	<i>Z. silvestris</i>	30	TEH
Tepoztlán I, Mor.	<i>P. vulgaris</i>	<i>Z. subfasciatus</i>	30	TEPI
Tepoztlán II, Mor.	<i>P. vulgaris</i>	<i>Z. subfasciatus</i>	30	TEPII
Tepoztlán III, Mor.	<i>P. vulgaris</i>	<i>A. obtectus</i>	53	TEPIII
Tepoztlán IV, Mor.	<i>P. vulgaris</i>	<i>A. obtectus</i>	7	TEPIV1
		<i>A. obvelatus</i>	24	TEPIV2
Tepoztlán V, Mor.	<i>P. vulgaris</i>	<i>A. obtectus</i>	13	TEPV
Bosque de Tlalpan, D.F.	<i>P. c. var. formosus</i>	<i>A. obvelatus</i>	7	TLA
Huitzilac, Mor. 1996	<i>P. c. var. formosus</i>	<i>A. obvelatus</i>	30	HUI
Huitzilac, Mor. 1997	<i>P. c. var. formosus</i>	<i>A. obvelatus</i>	30	HUI
Tierra de Gordillo, Pue.	<i>P. c. var. formosus</i>	<i>Acanthoscelides</i> sp.	26	GOR
Tepoztlán, Mor.	<i>P.v. var. mexicanus</i>	<i>A. obvelatus</i>	28	TEP
San Andrés de la Cal. Mor. 1996	<i>P.v. var. mexicanus</i>	<i>A. obtectus</i>	30	SAC1
San Andrés de la Cal. Mor. 1997	<i>P.v. var. mexicanus</i>	<i>A. obtectus</i>	4	SAC1
		<i>A. obvelatus</i>	29	SAC2

Acanthoscelides

Análisis intrapoblacionales

De las 5 enzimas estudiadas, todas excepto GPDH fueron polimórficas. IDH presentó dos loci, IDH-1 e IDH-2, lo cual nos da un total de 5 loci polimórficos. Las frecuencias alélicas en cada locus para las poblaciones de *A. obtectus* se presentan en el Cuadro 6 y para *A. obvelatus* y *Acanthoscelides* sp. en el Cuadro 7.

El número promedio de alelos por locus (tomando en cuenta a GPDH) va de 1.5 a 2.7 en las poblaciones de *A. obtectus*, de 1.3 a 2.5 en las de *A. obvelatus* y es de 2.0 en la única población muestreada de *Acanthoscelides* sp. El porcentaje de loci polimórficos va de 33.3 a 83.3, 16.7 a 33.3 y 50.0 respectivamente para las tres especies. De igual forma, las heterocigosidades promedio esperadas se sitúan entre 0.070 y 0.362, 0.023 y 0.124, y 0.209 para *Acanthoscelides* sp. (Cuadros 8 y 9).

De los 36 coeficientes de endogamia calculados para las poblaciones de *A. obtectus*, 25 fueron negativos y 11 positivos, pero el único valor significativamente diferente de cero se encontró para el locus IDH-1 en la población Veracruz II, donde se esperaban 7.051 heterócigos y se observaron 4 ($F = 0.423$; $P = 0.02$). Para *A. obvelatus*, se calcularon 20 coeficientes de endogamia, 17 negativos y 3 positivos, pero nuevamente sólo uno fue significativo; en la población TEPIV2 y el locus IDH-1 (2.867 heterocigos esperados, 1 observado; $F = 0.643$; $P = 0.002$). Para *Acanthoscelides* sp. se calcularon 4 valores, todos negativos pero ninguno significativamente diferente de cero.

Cuadro 8. Variabilidad genética en *Acanthoselides obtectus*. Los errores estándar se muestran entre paréntesis. Un locus se considera polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no excede 0.95. Las expectativas en H-W se calcularon según el método no sesgado de Levene (1949).

Población	Tamaño promedio de muestra por locus	Número promedio de alelos por locus	Porcentaje de loci polimórficos	Heterocigosidad Promedio	
				Observada	Esperada en Hardy-Weinberg
AGU	50.0 (0.0)	2.2 (0.3)	83.3	0.387 (0.086)	0.362 (0.080)
VER	29.8 (0.2)	2.3 (0.5)	66.7	0.268 (0.084)	0.261 (0.080)
VERII	30.0 (0.0)	2.2 (0.4)	83.3	0.272 (0.079)	0.298 (0.082)
JAL1	9.0 (0.0)	2.0 (0.5)	66.7	0.241 (0.105)	0.241 (0.098)
TEPIII	52.5 (0.2)	2.7 (0.5)	66.7	0.175 (0.053)	0.169 (0.051)
TEPIV1	7.0 (0.0)	1.5 (0.3)	33.3	0.071 (0.049)	0.070 (0.047)
TEPV	13.0 (0.0)	2.0 (0.3)	66.7	0.256 (0.099)	0.252 (0.080)
SAC1	33.5 (0.3)	2.7 (0.4)	66.7	0.220 (0.084)	0.214 (0.084)

Cuadro 9. Variabilidad genética en *Acanthoscelides obvelatus* y *Acanthoscelides* sp. Los errores estándar se muestran entre paréntesis. Un locus se considera polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no excede 0.95. Las expectativas en H-W se calcularon según el método no sesgado de Levene (1949)

Población	Tamaño promedio de muestra por locus	Número promedio de alelos por locus	Porcentaje de loci polimórficos	Heterocigosidad Promedio	
				Observada	Esperada en Hardy-Weinberg
JAL2	20.8 (0.2)	1.3 (0.3)	16.7	0.024 (0.024)	0.023 (0.023)
TEPIV2	23.7 (0.2)	1.8 (0.3)	33.3	0.079 (0.054)	0.122 (0.083)
TLA	7.0 (0.0)	1.5 (0.3)	33.3	0.143 (0.117)	0.117 (0.092)
HUI	55.0 (0.0)	2.5 (0.4)	16.7	0.133 (0.094)	0.124 (0.086)
TEP	27.2 (0.5)	2.0 (0.3)	16.7	0.129 (0.086)	0.121 (0.078)
SAC2	29.0 (0.0)	1.7 (0.3)	33.3	0.092 (0.066)	0.116 (0.090)
GOR	25.7 (0.3)	2.0 (0.4)	50.0	0.237 (0.107)	0.209 (0.096)

Por su parte, en las pruebas de χ^2 de bondad de ajuste, se detectaron desviaciones significativas de lo esperado en equilibrio Hardy-Weinberg únicamente en la población SAC1 de *A. obtectus*, en los loci PGI ($P = 0.019$) e IDH-2 ($P = 0.012$). Sin embargo, cuando la prueba se realiza reagrupando los genotipos en tres clases, ninguna de las desviaciones resulta significativa.

Es posible que estos pocos casos en los que los valores de F o las pruebas de χ^2 resultaron significativos se deban al error de muestreo más que a la existencia real de endogamia en estas poblaciones. Por lo tanto, puede afirmarse que los cinco loci polimórficos están cerca del equilibrio Hardy-Weinberg y pueden utilizarse para los análisis de estructura poblacional.

Análisis interpopulacionales.

Distancias genéticas

Las distancias genéticas de Nei entre todos los pares posibles de poblaciones de las tres especies se muestran en el Cuadro 10. Las poblaciones 1 a la 8 corresponden a *A. obtectus*, de la 9 a la 14 a *A. obvelatus* y la 15 a *Acanthoscelides* sp. Si consideramos únicamente las columnas de la 1 a la 14, la matriz puede dividirse en tres partes: en los dos triángulos exteriores se encuentran las distancias genéticas entre las poblaciones de cada una de ambas especies, mientras que en el rectángulo central se comparan las poblaciones de una especie contra las de la otra. La columna 15 corresponde a la comparación entre la población GOR de *Acanthoscelides* sp y el resto de las poblaciones. Obsérvese que el mayor valor de distancia genética entre dos poblaciones de una misma especie ocurre entre AGU y TEPIII y es de 0.068, mientras que entre especies los valores

oscilan entre 0.544 y 1.164. Las distancias genéticas son mayores entre las poblaciones de *A. obtectus* que entre las de *A. obvelatus*.

Cuadro 10. Valores no sesgados de distancia genética de Nei (1978) para las tres especies de *Acanthoscelides*.

Poblaciones	<i>A. obtectus</i>								<i>A. obvelatus</i>						GOR
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 AGU		.022	.039	.035	.058	.068	.048	.050	.596	.547	.573	.572	.561	.544	.879
2 VER			.013	.000	.013	.015	.019	.015	.847	.729	.759	.760	.754	.713	.945
3 VERII				.001	.030	.042	.028	.035	.928	.806	.831	.839	.832	.781	.900
4 JAL1					.021	.022	.022	.032	.886	.748	.777	.779	.775	.725	.885
5 TEPIII						.002	.005	.003	1.034	.877	.911	.904	.907	.855	1.128
6 TEPIV1							.010	.012	1.016	.853	.892	.879	.882	.831	1.164
7 TEPV								.006	.909	.796	.828	.815	.816	.780	1.079
8 SAC1									1.010	.887	.919	1.147	.914	.872	1.147
9 JAL2										.015	.012	.019	.013	.020	.844
10 TEPIV2											.000	.000	.000	.000	.801
11 TLA												.000	.000	.000	.785
12 HUI													.000	.001	.820
13 TEP														.000	.811
14 SAC2															.778
15 GOR															

Los dendrogramas construidos mediante UPGMA a partir de estas distancias genéticas se muestran en las Figs. 1, 2 y 3. En el primero se incluyen a las tres especies, mientras que el segundo corresponde a las poblaciones de *A. obtectus* y el tercero a las de *A. obvelatus*. La especie de frijol a partir de la cual se obtuvieron los insectos y su status (cultivado vs. silvestre) se señalan mediante

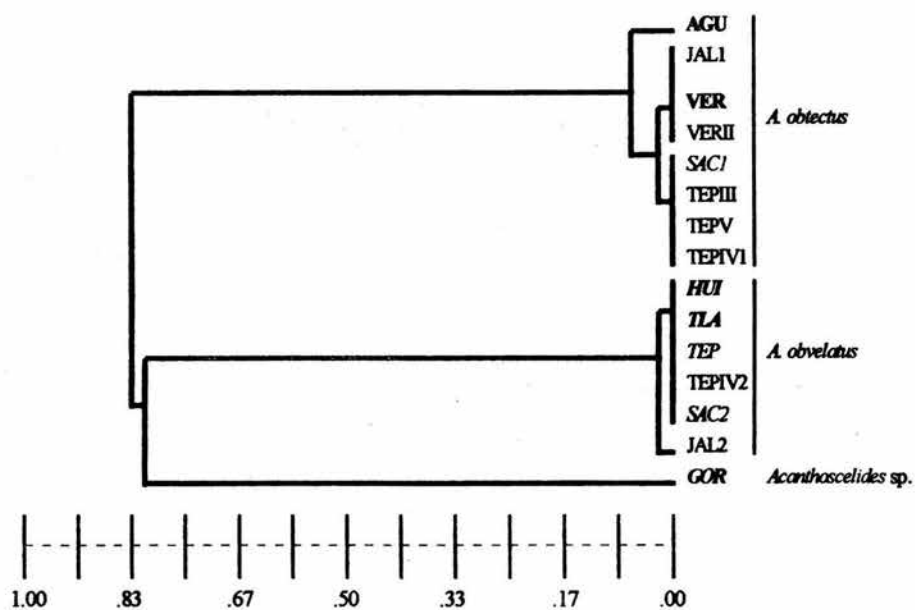


Figura 1. Dendrograma que resume las distancias genéticas de Nei (1978) agrupadas mediante el método UPGMA, para todas las poblaciones de las tres especies de *Acanthoscelides*. La especie de frijol y su status se indican mediante la combinación de tipografías: normal para *P. vulgaris*, negritas para *P. coccineus* y cursiva para las variedades silvestres de ambas especies.

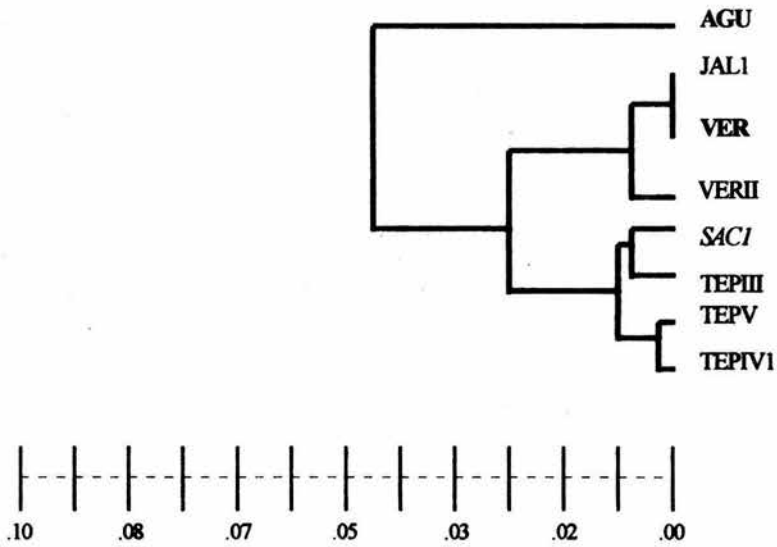


Figura 2. Dendrograma que resume las distancias genéticas de Nei (1978), agrupadas mediante el método UPGMA, para las poblaciones de *Acanthoscelides obtectus*. Los tipos de semillas se indican igual que en la figura anterior.

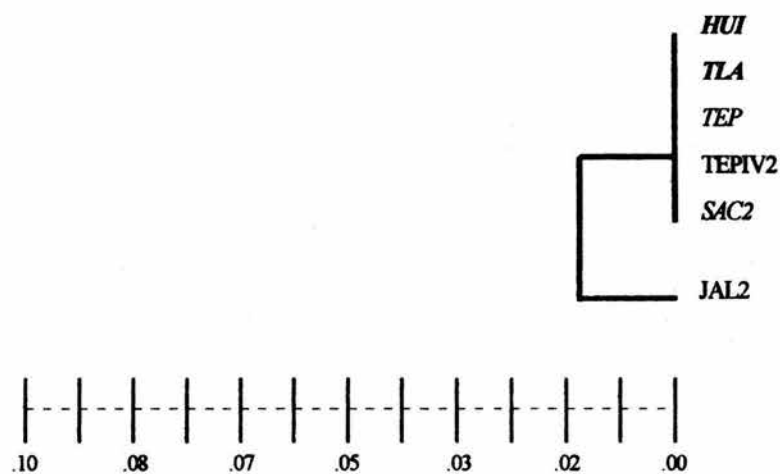


Figura 3. Dendrograma que resume las distancias genéticas de Nei (1978), agrupadas por el método UPGMA, para las poblaciones de *A. obvelatus*. Los tipos de semillas se indican igual que en la Figura 1

combinaciones de distintas tipografías. Los caracteres normales indican a *P. vulgaris*, las negritas a *P. coccineus* y en cursiva a las variedades silvestres de cualquiera de las dos especies (ver también el Cuadro 5). Como puede observarse, 7 de 8 poblaciones de *A. obtectus* fueron obtenidas de frijoles cultivados, de las cuales 5 fueron muestras de *P. vulgaris* y 2 de *P. c. var. coccineus*, mientras que 4 de 6 poblaciones de *A. obvelatus* provinieron de frijoles silvestres. Por lo tanto, de lo que alcanza a desprenderse de estos datos, parece al menos que *A. obtectus* se encuentra mas frecuentemente sobre frijoles cultivados y *A. obvelatus* sobre variedades silvestres, lo cual puede deberse a la preferencia o a la capacidad de cada especie de brúquido de hacer uso de cada uno de los dos tipos de recurso.

Dentro de cada especie, no existe un patrón definido en cuanto a la relación de las distancias genéticas entre las poblaciones y el tipo de hospedero, ya sea por especie o status. En *A. obtectus*, la distancia geográfica lineal tampoco se correlaciona por completo con la distancia genética. Las 4 poblaciones de Morelos forman un grupo bien definido, pero las poblaciones JA1 (Querétaro) y VER (Veracruz) son idénticas ($D = 0.000$), además de que una se obtuvo de *P. c. var. coccineus* y la otra de *P. vulgaris*, mientras que la otra población de Veracruz se encuentra a una distancia genética de 0.013 de ambas. La población que se separa a una mayor distancia del resto es AGU (Puebla).

En *A. obvelatus*, la población JA2 (Querétaro) se separa del resto a una distancia de aproximadamente 0.015, mientras que HUI, TLA, TEP, TEPIV2, y SAC2 (Morelos) son prácticamente idénticas a pesar de provenir de *P. c. var. formosus* (HUI y TLA), *P. v. var. mexicanus* (TEP y SAC2), y *P. vulgaris* cultivado (TEPIV2).

Estructura genética y flujo génico

Como es evidente, este tipo de análisis no se hicieron para *Acanthoscelides* sp. Cabe resaltar que los estimadores f , F y θ en la mayoría de los casos dieron resultados muy similares a los de sus equivalentes F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , aunque en general fueron un poco menores. En los Cuadros 11 y 12 se muestran sus valores para *A. obtectus* y *A. obvelatus*, respectivamente.

En el caso de *A. obtectus*, los valores de F_{ST} y θ , así como las pruebas de χ^2 para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas para cada locus, fueron altamente significativos ($P < 0.001$). El valor promedio de diferenciación entre poblaciones ($F_{ST} = 0.089$; $\theta = 0.082$) quiere decir que entre el 8.2 y el 8.9% de la varianza total en las frecuencias alélicas se debe a diferencias entre poblaciones, mientras que mas del 90% de la diversidad génica total puede encontrarse dentro de cualquier población. Ninguno de los otros estadísticos fue significativamente diferente de cero, aunque los valores de F_{IS} y f parecen indicar un ligero exceso de heterócigos dentro de las poblaciones para los loci PGI y PGM.

En *A. obvelatus*, los únicos valores de diferenciación significativos fueron los de F_{ST} y θ para PGI y el de F_{ST} para IDH-2 y los promedios fueron pequeños ($F_{ST} = 0.054$; $\theta = 0.036$). De igual forma, la prueba de heterogeneidad fue significativa para PGI ($P = 0.008$) y casi significativa para IDH-2 ($P = 0.059$). Los otros estadísticos no fueron significativos, pero en este caso parece haber una pequeña deficiencia de heterócigos en el locus IDH-1.

Cuadro 11. Estadísticos de F para las poblaciones de *Acanthoscelides obtectus*. La significancia de los valores de Fis, f, F_{IT} y F se obtuvo mediante una prueba de chi cuadrada de Nei (1977) y de Workman y Niswander (1970) para F_{ST} y theta. Los intervalos de confianza (95%) para los valores promedio se obtuvieron mediante bootstrap y se muestran entre paréntesis.

Locus	Fis	f	F _{IT}	F	F _{ST}	theta
PGI	-0.139	-0.117	-0.056	0.017	0.073***	0.089***
PGM	-0.136	-0.118	0.000	0.036	0.119***	0.140***
MDH	0.057	0.085	0.133	0.151	0.080***	0.072***
IDH-1	0.047	0.016	0.137	0.076	0.095***	0.061***
IDH-2	0.047	0.054	0.128	0.105	0.085***	0.054***
Promedio	-0.038	-0.021 (-0.1 ± 0.061)	0.055	0.063 (0.009 ± 0.118)	0.089	0.082 (0.058 ± 0.114)

* P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.001

Cuadro 12. Estadísticos de F para las poblaciones de *Acanthoscelides obvelatus*. Las especificaciones son iguales que para el Cuadro anterior.

Locus	Fis	f	F _{IT}	F	F _{ST}	theta
PGI	-0.002	0.047	-0.064	0.093	0.066***	0.049***
PGM	-0.025	-0.002	-0.010	-0.011	0.015	-0.008
MDH	-0.033	-0.010	-0.007	-0.003	0.025	0.007
IDH-1	0.179	0.132	0.196	0.127	0.021	-0.005
IDH-2	-0.052	-0.021	-0.024	-0.012	0.027*	0.009
Promedio	0.009	0.048 (-0.015 ± 0.095)	0.063	0.082 (-0.012 ± 0.099)	0.054	0.036 (-0.005 ± 0.047)

* P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.001

La aparentemente mayor diferenciación entre las poblaciones de *A. obtectus* puede deberse a que fueron colectadas a una escala geográfica más grande (4 estados del país), que las poblaciones de *A. obvelatus* (5 de 6 fueron colectadas en Morelos o en sitios cercanos). Para corroborar esta idea se repitieron los análisis, pero incluyendo únicamente las poblaciones SAC1, TEPIII, TEPIV1 y TEPV

(todas provenientes de Morelos) de *A. obtectus* y HUI, SAC2, TEP, TEPIV2 y TLA de *A. obvelatus* (se excluyó la población JAL2). Los resultados se muestran en los Cuadros 13 y 14. A pesar de que los valores de diferenciación disminuyeron apreciablemente en ambas especies, tanto que algunos dejaron de ser significativamente diferentes de cero, puede apreciarse que las poblaciones de *A. obtectus* continúan estando más diferenciadas entre sí que las de *A. obvelatus* (Los promedios de F_{ST} y θ son 0.049 y 0.024 contra 0.011 y -0.007).

Cuadro 13. Estadísticos de F para las poblaciones de *A. obtectus* provenientes del estado de Morelos. Las especificaciones son iguales que para el Cuadro 11.

Locus	F_{IS}	f	F_{IT}	F	F_{ST}	θ
PGI	-0.181	-0.122	-0.143	-0.097	0.032*	0.022
PGM	-0.092	-0.059	-0.066	-0.028	0.023	0.029
MDH	-0.052	-0.036	-0.037	0.050	0.014	-0.014
IDH-1	0.029	0.014	0.094	0.035	0.067**	0.021
IDH-2	0.077	0.057	0.150	0.091	0.079***	0.036*
Promedio	-0.054	-0.027 (-0.109 a 0.039)	-0.002	-0.003 (-0.088 a 0.069)	0.049	0.024 (0.009 a 0.033)

* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$

Cuadro 14. Estadísticos de F para las poblaciones HUI, SAC2, TEP, TEPIV2 y TLA de *A. obvelatus*. Las especificaciones son iguales que para el Cuadro 11.

Locus	F_{IS}	f	F_{IT}	F	F_{ST}	θ
PGI	-0.002	0.046	0.006	0.039	0.008	-0.008
PGM	-0.025	-0.003	-0.012	-0.013	0.013	-0.009
MDH	-0.033	-0.011	-0.008	-0.003	0.024	0.008
IDH-1	0.179	0.131	0.191	0.122	0.015	-0.010
IDH-2	-0.048	-0.010	-0.020	-0.008	0.027*	0.002
Promedio	0.012	0.050 (-0.009 a 0.098)	0.023	0.043 (-0.009 a 0.091)	0.011	-0.007 (-0.009 a 0.001)

* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$

Las estimaciones de flujo génico entre poblaciones para cada una de las especies se presentan en los Cuadros 15 y 16. Los resultados fueron comparables por todos los métodos empleados (ver valores globales). En general, el flujo génico puede considerarse alto para ambas especies, pero es bastante mayor en *A. obvelatus*, como corresponde a su menor diferenciación genética. Las estimaciones son valores promedio para todas las poblaciones, por lo que algunos subgrupos de poblaciones probablemente experimenten aún mayor flujo génico.

Cuadro 15. Estimaciones de flujo génico entre las poblaciones de *Acanthoscelides obtectus*.

Locus	$N_e m$ (FST)	$N_e m$ (theta)	$N_e m^*$
PGI	3.17	2.56	-----
PGM	1.85	1.53	-----
MDH	2.87	3.22	-----
IDH-1	2.38	3.85	-----
IDH-2	2.69	4.38	-----
Promedio	2.56	2.80	1.93

Cuadro 16. Estimaciones de flujo génico entre las poblaciones de *Acanthoscelides obvelatus*

Locus	$N_e m$ (FST)	$N_e m$ (theta)	$N_e m^*$
PGI	3.54	4.85	-----
PGM	16.42	-----	-----
MDH	9.75	35.46	-----
IDH-1	11.65	-----	-----
IDH-2	9.00	27.53	-----
Promedio	4.38	6.69	16.42

Los valores de diferenciación entre las tres especies pueden observarse en el Cuadro 17. Los promedios de F_{ST} y θ son 0.604 y 0.592, lo cual corresponde con lo reportado para otras especies dentro de un mismo género (Coyne y Orr, 1989). Sin embargo, los valores para los loci individuales difieren bastante entre sí. PGI es el menos diferenciado, pues es el que mayor número de alelos compartidos presenta. Le sigue IDH-2, en el cual el alelo B tiene la frecuencia mas alta tanto en *A. obtectus* como en *A. obvelatus*. Por último, los más diferenciados son MDH e IDH-1 en los que las especies presentan alelos alternativos o con marcadas diferencias en sus frecuencias (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 17. Estadísticos de F para las tres especies de *Acanthoscelides*. Las especificaciones son iguales que para el Cuadro 11.

Locus	F_{IS}	f	F_{IT}	F	F_{ST}	θ
PGI	-0.075	-0.042	0.246***	0.247***	0.298***	0.277***
PGM	-0.129	-0.108	0.647***	0.672***	0.687***	0.704***
MDH	0.050	0.078	0.847***	0.824***	0.839***	0.809***
IDH-1	0.035	0.014	0.785***	0.754***	0.777***	0.750***
IDH-2	0.010	0.026	0.330***	0.324***	0.323***	0.306***
Promedio	-0.037	-0.014 (-0.060 a 0.042)	0.589	0.586 (0.361 a 0.771)	0.604	0.592 (0.376 a 0.767)

* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$

Comparaciones entre especies

Las heterocigosidades promedio esperadas encontradas en *A. obtectus* y *A. obvelatus* se compararon entre sí mediante una prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney para una hipótesis nula de dos colas (Zar, 1996), con el

objeto de establecer si estas dos especies difieren significativamente en sus niveles de variación genética. Las heterocigosidades promedio esperadas de cada población (Cuadros 8 y 9) se consideraron los datos individuales y el conjunto de poblaciones la muestra para cada especie. *A. obiectus* presenta una heterocigosidad significativamente mayor ($U_{(2, N = 6, 8)} = 43$; $P < 0.05$) que su especie hermana *A. obvelatus*. Además, el número promedio de alelos por locus y el porcentaje de loci polimórficos también son mayores en *A. obiectus* (Cuadros 8 y 9), aunque en estos casos no se realizaron pruebas estadísticas para establecer la significancia de las diferencias.

Zabrotes

Análisis intrapoblacionales

En el caso de *Zabrotes subfasciatus* y *Z. silvestris*, se encontró variación únicamente en los loci PGI, IDH-1, IDH-2 y GOT. Sin embargo, los dos alelos presentes en el locus PGI se encuentran alternativamente fijos en las distintas especies (el alelo A en *Z. silvestris* y el B en *Z. subfasciatus*), por lo que para propósitos de la mayoría de los análisis sólo se pueden emplear los loci GOT, IDH-1 e IDH-2. En el Cuadro 18 se muestran las frecuencias alélicas en cada locus para cada población.

El número promedio de alelos por locus es de 1.0 y 1.2 en las dos poblaciones de *Z. silvestris* y va de 1.5 a 1.8 en *Z. subfasciatus* (Cuadro 19). El porcentaje de loci polimórficos es de 0 y 16.7 en la primera especie y de 33.3 en todas las poblaciones de la segunda excepto TEPI, en donde llega a 50. La heterocigosidad promedio esperada es de 0 en SLP (que no presenta ningún loci polimórfico), 0.058 en TEH, y va de 0.107 a 0.208 en el resto de las poblaciones.

Cuadro 19. Variabilidad genética en *Z. subfasciatus* y *Z. silvestris* (poblaciones TEH y SLP). Los errores estándar se muestran entre paréntesis. Un locus se considera polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no excede 0.95. La espectativas en H-W se calcularon mediante el método no sesgado de Levene (1949).

Población	Tamaño promedio de muestra por locus	Número promedio de alelos por locus	Porcentaje de loci polimórficos	Heterocigosidad Promedio	
				Observada	Esperada en Hardy-Weinberg
OAX	28.3 (0.8)	1.5 (0.2)	33.3	0.110 (0.077)	0.107 (0.076)
TAX	28.8 (0.5)	1.5 (0.3)	33.3	0.143 (0.101)	0.140 (0.102)
TEPI	29.5 (0.2)	1.7 (0.3)	50.0	0.213 (0.101)	0.208 (0.098)
TEPII	29.3 (0.4)	1.5 (0.3)	33.3	0.077 (0.070)	0.119 (0.100)
CUE	29.2 (0.5)	1.8 (0.5)	33.3	0.128 (0.085)	0.138 (0.092)
TEH	30.0 (0.0)	1.2 (0.2)	16.7	0.050 (0.050)	0.058 (0.058)
SLP	30.0 (0.0)	1.0 (0.0)	0.0	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)

Se encontraron desviaciones significativas con respecto al equilibrio Hardy Weinberg unicamente en los dos loci polimórficos que presenta la población Tepoztlán II, GOT ($P= 0.030$) e IDH-1 ($P= 0.038$). En este último locus se presentó el único coeficiente de endogamia significativo ($F= 0.648$), según la prueba de Li y Horovitz ($P= 0.0061$) El resto de los coeficientes de endogamia calculados (en total 13, 5 negativos y 8 positivos) fueron no significativos.

Análisis interpoblacionales

Distancias genéticas

En el Cuadro 20 se presentan las distancias genéticas entre todos los pares posibles de poblaciones. La distancia genética promedio que separa ambas especies parece ser algo menor que la que existe entre las especies de *Acanthoscelides* (compárense las Figs. 1 y 5). La distancia genética es de 0.007 entre las dos poblaciones de *Z. silvestris* y va de 0.007 a 0.169 en *Z. subfasciatus*. La población TAX es particularmente interesante porque se encuentra a una distancia menor de las poblaciones de *Z. silvestris* que el resto de las poblaciones de *Z. subfasciatus*. Como se observa en el Cuadro 18, esta población presenta el alelo B en el locus PGI, al igual que las otras poblaciones de *Z. subfasciatus*, pero en el locus IDH-1 presenta el alelo A, además de B y C. El alelo A se encuentra fijo en *Z. silvestris* y no se encuentra en ninguna otra población de *Z. subfasciatus*.

En este caso, no es posible tratar de asociar las distancias genéticas con el tipo de hospedero, pues todas las poblaciones fueron obtenidas de frijoles cultivados de la especie *P. vulgaris*, excepto CUE que provino de *P. c. var. darwinianus*. Las distancias genéticas entre las poblaciones de *Z. subfasciatus* (Fig. 6), claramente no se correlacionan con la distancia geográfica. Se forman dos

Cuadro 20. Valores no sesgados de distancia genética de Nei (1978) entre todas las poblaciones de ambas especies de *Zabrotes*.

Población	<i>Z. subfasciatus</i>					<i>Z. silvestris</i>	
	1	2	3	4	5	6	7
1 OAX		0.074	0.014	0.040	0.072	0.587	0.643
2 TAX			0.049	0.134	0.169	0.421	0.458
3 TEPI				0.065	0.094	0.584	0.636
4 TEPII					0.007	0.587	0.630
5 CUE						0.564	0.613
6 TEH							0.007
7 SLP							

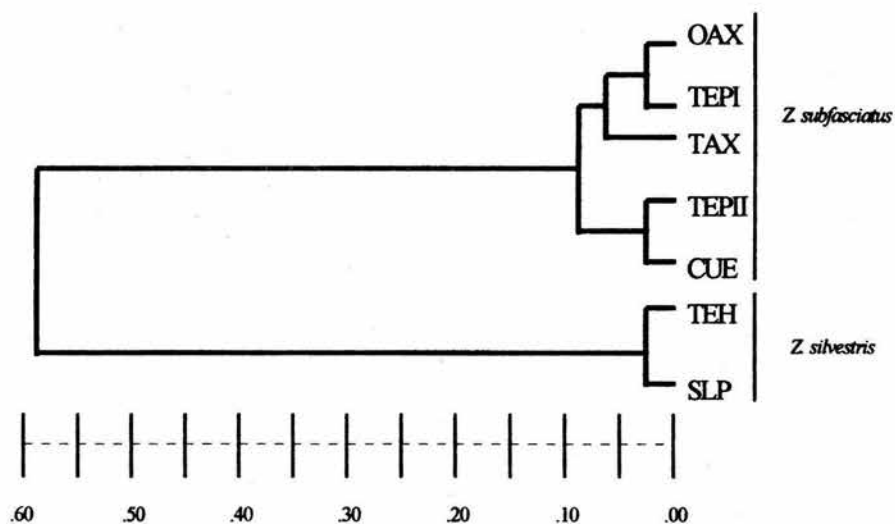


Figura 4. Dendrograma que resume las distancias genéticas de Nei (1978) construido mediante UPGMA, para todas las poblaciones de ambas especies de *Zabrotes*.

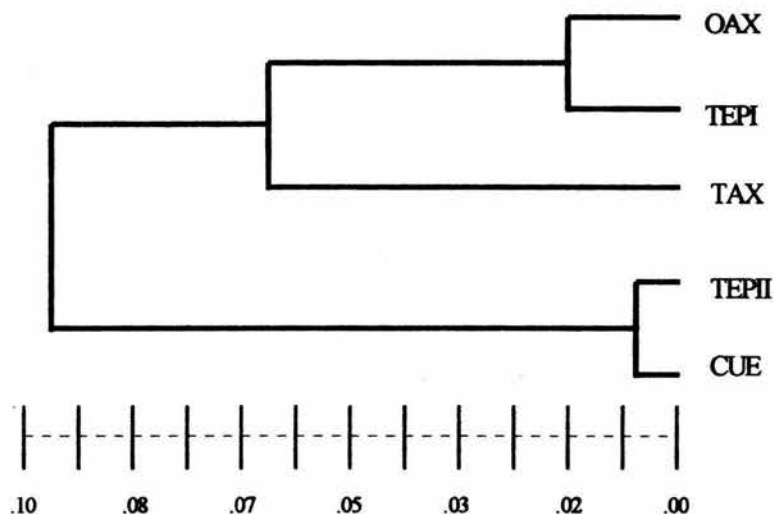


Figura 5. Dendrograma que resume las distancias genéticas de Nei (1978), construido mediante UPGMA, para las poblaciones de *Zabrotes subfasciatus*.

grupos principales, separados por una distancia genética promedio de 0.090. El primero está formado por las poblaciones OAX, TAX y TEPI y el otro por las poblaciones TEPII y CUE. Es notable que la distancia genética entre las dos poblaciones obtenidas en Tepoztlán sea de 0.065.

Estructura genética y flujo génico

Este análisis se realizó únicamente para *Z. subfasciatus*, pues se requieren tres poblaciones al menos. Ningún valor de F_{IS} y f fue estadísticamente significativo. Por el contrario, todos los valores de F_{ST} y θ son altos y muy significativos ($P < 0.001$). La prueba de heterogeneidad fue significativa para todos

los loci ($P < 0.001$). Los valores promedio ($F_{ST} = 0.260$ y $\theta = 0.292$) indican una gran subdivisión entre las poblaciones (Cuadro 21).

Cuadro 21. Estadísticos de F para las poblaciones de *Zabrotes subfasciatus*. Las especificaciones son iguales que para el Cuadro 11.

Locus	F_{IS}	f	F_{IT}	F	F_{ST}	θ
GOT	0.022	0.040	0.304***	0.351***	0.289***	0.324***
IDH-1	0.066	0.086	0.293***	0.333***	0.243***	0.270***
IDH-2	0.027	0.046	0.151	0.178*	0.127***	0.140***
Promedio	0.040	0.058 (0.040 ± 0.086)	0.290	0.333 (0.178 ± 0.351)	0.260	0.292 (0.139 ± 0.324)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

Como corresponde a estos altos valores de subdivisión, las estimaciones de flujo génico promedio indican que este es escaso entre las poblaciones muestreadas. Los valores globales muestran que las poblaciones intercambian menos de un individuo por generación, lo cual significa que se están comportando ~~como unidades evolutivas independientes~~. Sin embargo, es probable que algunos subgrupos de poblaciones experimenten mayores niveles de flujo génico (Cuadro 22).

Cuadro 22. Estimaciones de flujo génico entre las poblaciones de *Zabrotes subfasciatus*

Locus	$N_{em}(F_{ST})$	$N_{em}(\theta)$	N_{em}^*
GOT	0.615	0.522	-----
IDH-1	0.779	0.676	-----
IDH-2	1.718	1.536	-----
Promedio	0.712	0.606	0.203

Los valores promedio de diferenciación que se observan cuando se incluyen ambas especies son similares, aunque un poco mayores, a los de *Acanthoscelides* (Cuadro 23). Los valores de los loci individuales también varían ampliamente, desde IDH-2 en el que el alelo A está casi fijo en todas las poblaciones, hasta PGI, que presenta alelos fijos alternativos en cada una de las dos especies.

Cuadro 23. Estadísticos de F para las dos especies de *Zabrotes*. Las especificaciones son iguales que para el Cuadro 11.

Locus	F _{IS}	f	F _{IT}	F	F _{ST}	theta
PGI	---	---	1.000***	1.000***	1.000***	1.000***
GOT	0.035	0.053	0.518***	0.563***	0.500***	0.539***
IDH-1	0.066	0.085	0.624***	0.664***	0.597***	0.637***
IDH-2	0.027	0.045	0.160*	0.180**	0.136***	0.141***
Promedio	0.046	0.064 (0.045 ± 0.085)	0.653	0.691 (0.527 ± 0.970)	0.636	0.670 (0.502 ± 0.969)

* P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.001

En este caso no se pudo realizar una prueba estadística para comparar las heterocigosidades de ambas especies, pues sólo se dispone de dos poblaciones de *Z. silvestris*. Sin embargo, de lo que alcanza a observarse en el Cuadro 19, parece que esta especie presenta niveles de variación genética bastante menores a los de *Z. subfasciatus*. De hecho, la población SLP no presenta variación en ninguno de los loci estudiados, y en la población TEH únicamente el locus GOT es polimórfico.

DISCUSIÓN

Acanthoscelides

Especialización a diferentes hospederos

Los resultados muestran que intraespecíficamente, *Acanthoscelides obtectus* y *A. obvelatus* no están representadas por poblaciones diferencialmente especializadas en el uso de las distintas variedades y/o especies de frijol estudiadas, como es evidente por la falta de asociación entre las distancias genéticas y el tipo de hospedero. Una primera explicación podría ser que las diferencias entre especies y variedades de frijol son de hecho irrelevantes para los brúquidos, razón por la cual no habría evolucionado ninguna especialización. Sin embargo, esta idea está en contradicción con mucha de la evidencia presentada en secciones anteriores, sobre todo la que se refiere a la presencia en las semillas silvestres de factores bioquímicos de resistencia (Cardona y Posso, 1987); el número limitado de organismos que pueden desarrollarse en cada una de ellas (Leroi et al., 1990) y el pequeño tamaño de los adultos resultantes (Benrey et al., 1997; A. González, observación personal), lo cual puede tener repercusiones sobre su fecundidad, como ha sido observado en muchas especies de insectos. Por lo tanto, intuitivamente parece que las condiciones en el campo y en almacén difieren lo suficiente como para que el uso más eficiente de uno y otro recurso requiera distintas adaptaciones y estrategias.

Los datos presentados no implican que no existan "trade-offs" entre hospederos, o que en las poblaciones todos los genotipos sean igualmente

eficientes en el uso de cualquiera de los recursos, que son posibilidades que aún necesitan estudio directo. Simplemente muestran que ocurre flujo génico aparentemente irrestricto entre los grupos de individuos asociados a las variedades silvestres y aquellos que se desarrollan en almacenes. Puesto que la formación de razas asociadas a hospederos debe ir acompañada de la reducción en el flujo génico entre ambas (Futuyma y Mayer, 1980; Johnson et al., 1996), mientras tal condición no se cumpla es probable que en estos insectos el patrón de uso de recursos no pueda evolucionar en la dirección hipotetizada. De hecho, han sido propuestos pocos mecanismos capaces de producir este tipo de aislamiento reproductivo. Uno de los más factibles, es que los apareamientos pueden ocurrir con mayor frecuencia entre miembros de la "misma raza" si se llevan a cabo sobre o cerca del recurso por el que manifiestan preferencia (Johnson et al., 1996). Implícita en esta hipótesis está por supuesto la idea de que los individuos manifiestan preferencia por el recurso que les proporcionará un mejor desempeño. En *A. obiectus* y *A. obvelatus* no se conoce la relación entre preferencia y desempeño con respecto a los diferentes tipos de frijol considerados en este trabajo y no se sabe mucho acerca de su conducta de apareamiento, excepto lo mencionado para las condiciones de almacén. Sin embargo, es posible que estos factores tampoco reúnan las condiciones requeridas para la formación de razas asociadas a hospederos, como ha sido encontrado en otros brúquidos (Fox, 1993; Callejas, 1996).

Puede ser que nuestros resultados sean más bien similares a los encontrados por Bossart y Scriber (1995) para la mariposa *Papilio glaucus*, aunque por supuesto esta afirmación necesita apoyo experimental. Si este fuera el caso, los brúquidos podrían manifestar preferencia y/o el desempeño de su progenie sería mejor sobre el tipo de frijol utilizado por la población de la que provinieron, pero estas diferencias entre poblaciones estarían constantemente mantenidas por la

selección natural, que actuaría favoreciendo el uso del recurso inmediatamente más disponible y en contra de los efectos homogenizadores del flujo génico. De esta manera, las poblaciones pueden estar diferenciadas con respecto a los genes que controlan la preferencia, el desempeño y otras características ecológicamente relevantes, pero los marcadores neutros no experimentarán grandes cambios en sus frecuencias.

Lo hasta aquí dicho se refiere a los patrones intraespecíficos en cada una de estas dos especies de brúquidos. Sin embargo, al compararlas se observa entre ellas una aparente asociación diferencial con los hospederos. Siete de las 8 poblaciones de *A. obtectus* se obtuvieron a partir de semillas cultivadas y 4 de las 6 poblaciones de *A. obvelatus* a partir de vainas silvestres. Esto puede deberse a diferencias interespecíficas en la preferencia o en la capacidad para hacer uso de uno y otro tipo de recurso, aunque una explicación más trivial serían las limitaciones espaciales y temporales del muestreo realizado para este trabajo. En efecto, Leroi et al. (1990), en un muestreo mucho más amplio de poblaciones silvestres de frijol, hallaron que sí se reúnen los resultados de todas las localidades para las que obtuvieron datos, se obtienen aproximadamente igual número de *A. obtectus* y *A. obvelatus* a partir de las semillas de *P. vulgaris* var. *mexicanus*. Sin embargo, ambas especies difieren en su tiempo de emergencia: *A. obvelatus* es más numeroso que *A. obtectus* al principio del período de maduración de las vainas, mientras que al final la situación se invierte (Leroi et al., 1990). Las colectas para el presente estudio se realizaron principalmente en la primera parte de este período (diciembre-enero), lo cual explicaría la escasa presencia en ellas de *A. obtectus*.

Por el contrario, los autores del trabajo citado si encontraron diferencias para *P. coccineus* var. *formosus*, pues el 90% de los individuos emergidos correspondieron a *A. obvelatus* y los restantes a *A. obtectus*. En nuestro caso,

únicamente encontramos a *A. obvelatus* en todas las muestras provenientes de esta variedad de frijol. La razón de la desigualdad puede ser que ambos brúquidos efectivamente difieren en su preferencia y/o desempeño sobre este recurso, lo cual podría evaluarse experimentalmente en el laboratorio. Pero también debe considerarse que *P. vulgaris* var. *mexicanus* y *P. coccineus* var. *formosus* se encuentran en hábitats distintos. Este último se encuentra generalmente a mayores altitudes y cerca de bosques de *Pinus* y *Quercus*, mientras que el primero se asocia preferentemente con climas un poco más cálidos y selvas bajas caducifolias (Leroi et al., 1990). Por lo tanto, discernir el factor clave que determina este uso diferencial de los recursos puede ser bastante complicado.

En cuanto a las variedades cultivadas, es bien conocido que *A. obiectus* es una plaga casi universal de estas semillas. En cambio, una pregunta aún sin respuesta clara es qué tan frecuente es la presencia en ellas de *A. obvelatus*, sobre todo considerando que ambas especies pueden ser fácilmente confundidas. Nuestros datos implicarían que no debe ser un hecho raro. Sin embargo, una diferencia radical entre ambas especies es la presencia de una diapausa reproductiva aparentemente obligatoria en los adultos de *A. obvelatus*, que sincroniza su ciclo de vida con el período durante el cual están disponibles las vainas maduras de las variedades silvestres (Biemont y Bonet, 1981). Por lo tanto, no podrían atacar semillas cultivadas más que durante los meses que constituyen el período reproductivo de la especie. En *A. obiectus* no existe esta diapausa, y por lo tanto pueden reproducirse continuamente, pero esto es posible únicamente sobre frijoles cultivados. De hecho, podría ser que el polivoltinismo explicara en gran parte el éxito de esta especie como plaga de almacén.

Diferenciación genética de las poblaciones

Al igual que ha sido reportado para otros insectos (Baughman et al., 1990; Crouau-Roy, 1989; Smith King, 1987, 1988), los patrones de diferenciación indicados por las distancias genéticas entre las poblaciones en ambas especies no tuvieron en todos los casos correlación con las distancias geográficas lineales. La compleja topografía del país puede ser la responsable de este fenómeno, al permitir el flujo génico entre poblaciones alejadas e impedirlo entre localidades separadas por menos distancia. Otro factor probablemente muy importante es el transporte de las semillas de frijol desde los sitios en los que se cultiva hasta su lugar de comercialización, permitiendo el flujo génico a distancias que poco tienen que ver con las capacidades de dispersión propias de los brúquidos.

Al comparar los estadísticos de F obtenidos para los dos especies, se observa que las poblaciones de *A. obtectus* están aparentemente más diferenciadas que las de *A. obvelatus*, aún tomando únicamente en cuenta a las poblaciones muestreadas a una escala geográfica similar. De hecho, exceptuando a la muestra JAL2, el resto de las muestras de *A. obvelatus* pueden considerarse como pertenecientes a una sola unidad evolutiva, cuya cohesión se mantiene gracias al alto flujo génico entre localidades. Puede ser que esta especie sea más capaz o propensa a la dispersión que *A. obtectus*, aunque otra posibilidad es que las diferencias estén determinadas por el tipo de recurso del que se obtuvieron las muestras de cada especie. En otras palabras, la mayor diferenciación de las poblaciones asociadas a semillas almacenadas podría deberse a que con cierta frecuencia experimentan extinciones y recolonizaciones (Wade y McCauley, 1988; McCauley, 1991a) como consecuencia de la periódica fumigación de los almacenes, el retiro de las semillas para su venta y la introducción de nuevas semillas. Puesto que las infestaciones pueden iniciarse a partir de un pequeño

número de individuos (Ortega, 1987; A. González, observación personal) las poblaciones divergirán como consecuencia del "efecto fundador" y la deriva génica. Una vez establecidas las colonias, sus diferencias pueden disminuir como resultado del flujo génico hasta que nuevamente se extingan. Sin embargo, esta hipótesis no se puede poner realmente a prueba más que mediante comparaciones entre poblaciones conespecíficas, para controlar las posibles diferencias en las capacidades de dispersión entre ambas especies.

Comparaciones entre especies

Un problema que ha recibido considerable atención, es el de encontrar correlaciones entre los niveles de variación genética y algunos atributos de la historia de vida de los organismos y otros factores (Avisé, 1994). Esto requiere de comparaciones de la heterocigosidad promedio esperada entre poblaciones o especies que difieren en algún aspecto de interés. Sin embargo, varios autores han afirmado que este tipo de comparaciones presentan numerosos problemas conceptuales y prácticos. Los principales son los siguientes: 1) para que las comparaciones realmente tuvieran significado, se necesitarían tamaños de muestra de al menos 100 loci escogidos aleatoriamente (Lewontin, 1974; Nei, 1978), 2) los estimados de la heterocigosidad promedio esperada no se distribuyen de manera normal y sus varianzas son muy grandes (Nei y Roychoudhury, 1974; Archie, 1985) y, 3) no se sabe que tan válidas son las pruebas estadísticas generalmente usadas (Archie, 1985). Con todas estas dificultades en mente, y a pesar de ellas, la heterocigosidad promedio esperada se comparó entre *A. obtectus* y *A. obvelatus*. Se empleó una prueba estadística no paramétrica (Wilcoxon-Mann-Whitney), la cual probablemente es conservadora para este tipo de comparaciones (Archie, 1985). A pesar de ello, los resultados indicaron que *A. obtectus* tiene niveles de variación genética significativamente mayores que *A. obvelatus*, al menos en los

loci estudiados. De hecho, las diferencias parecen bastante considerables (aproximadamente 10%) y puede sugerirse que podrían estar correlacionadas con: 1) el polivoltinismo de *A. obtectus* contra el univoltinismo de *A. obvelatus*, lo cual determina que los tiempos generacionales son más cortos en la primera especie y/o, 2) la amplitud de su distribución geográfica. Como ya se ha mencionado, *A. obtectus* es prácticamente cosmopolita, mientras que *A. obvelatus* se encuentra únicamente en México y América Central (Delgado et al., 1988). Por lo tanto, *A. obtectus* experimenta mayor heterogeneidad ambiental, correlación que también ha sido propuesta para otros organismos (Soulé y Stewart, 1970; Hedrick, 1986). Sin embargo, es válido cuestionar estas interpretaciones para nuestro caso, pues están basadas en información de únicamente 5 loci.

Zabrotes

Asociación con los hospederos

Ambas especies de *Zabrotes* se encontraron únicamente sobre frijoles cultivados. Supuestamente existen ciertas diferencias en la distribución de *Zabrotes subfasciatus* y *Acanthoscelides obtectus*. La primera especie se encuentra a menores altitudes y en climas cálidos, mientras que *Acanthoscelides* prefiere lugares templados (Anónimo, 1988). Por lo tanto, el no haber encontrado individuos de ninguna especie de *Zabrotes* en nuestras colectas de vainas silvestres pudo deberse a que las localidades están fuera de la distribución altitudinal de estos insectos. En su estudio, Leroi et al. (1990) obtuvieron muy pocos individuos de *Zabrotes subfasciatus* a partir de las vainas de *P. vulgaris* var. *mexicanus* y *P. lunatus*, principalmente en las localidades ubicadas a menor altitud. Por

consigniente, no se puede afirmar que *Z. subfasciatus* no haga uso de frijoles silvestres en otras localidades.

Diferenciación genética de las poblaciones

Es notable la alta diferenciación genética que existe entre las poblaciones de *Z. subfasciatus* y la completa falta de correspondencia entre las distancias geográficas y las distancias genéticas. Los patrones de variación en las frecuencias alélicas de los tres loci polimórficos empleados son bastante consistentes entre sí, lo cual apoya la noción de que los resultados obtenidos no son sobreestimaciones.

Es posible que las poblaciones de *Z. subfasciatus* experimenten procesos semejantes a los propuestos para el caso de *A. obtectus*, sólo que con efectos más marcados. La falta de correspondencia entre las distancias geográficas y genéticas (Ver Fig. 6) puede explicarse suponiendo que la diferenciación entre poblaciones responde a factores complejos, como la topografía del país y el transporte de semillas entre localidades. Si esto es cierto, los eventos de "efecto fundador" y deriva génica como los que fueron descritos para *A. obtectus* podrían jugar también un papel en este caso, aunque la mucho mayor distancia geográfica que separa las poblaciones muestreadas de *Z. subfasciatus* habría impedido que el flujo génico hiciera disminuir sus diferencias.

Comparaciones entre especies

En este caso no se hicieron pruebas estadísticas para comparar los niveles de variación genética en *Z. subfasciatus* y *Z. silvestris*, debido a que únicamente se obtuvieron dos poblaciones de la segunda especie. Aún así, parece evidente que las poblaciones de *Z. subfasciatus* tienen en promedio una heterocigosidad esperada

dos veces mayor que la de *Z. silvestris*, en los loci estudiados. Si estos efectivamente son representativos de lo que sucede en la mayor parte del genoma, encontramos que se repite el patrón encontrado para las especies de *Acanthoscelides*. Es notable que en ambos géneros, cuando se comparan dos especies hermanas muy similares morfológicamente y en el uso de recursos, la especie más común, con la distribución geográfica más amplia y que constituye una plaga importante sea la que posee los niveles más altos de variación genética.

Por último, cabe mencionar que algunos de los resultados sugieren que valdría la pena tratar de entender los procesos de especiación que han intervenido en la historia evolutiva del género. *Z. subfasciatus* y *Z. silvestris* tienen alelos alternativos fijos en el locus PGI, lo cual indiscutiblemente quiere decir que no ocurre flujo génico entre ambas. Además, al intentar cruzarlas experimentalmente en el laboratorio, se encontró que a pesar de que la cópula aparentemente se llevó a cabo, las hembras de ambas especies no ovipositaron más que en unos cuantos casos, y en ninguno de ellos se desarrollaron adultos híbridos (A. Callejas, comunicación personal).

La población de Taxco corresponde morfológicamente a *Z. subfasciatus* y las distancias genéticas de Nei también la ubican junto a otras poblaciones de esta especie a una distancia no demasiado grande (Fig. 6). Sin embargo, en el locus IDH-1 posee los alelos B y C, que se encuentran en otras poblaciones de su especie, y también el alelo A, que no se encuentra en ninguna otra población de *Z. subfasciatus*, pero se encuentra fijo en las dos poblaciones de *Z. silvestris*. Por lo tanto, estas dos especies son parafiléticas con respecto a la genealogía de los alelos en este locus (Neigel y Avise, 1986). Este patrón probablemente se debe a un fenómeno llamado "separación estocástica de los linajes" (stochastic lineage sorting) que consiste en que las especies hermanas heredan aleatoriamente las

variantes génicas ya presentes en la especie ancestral (Avice, 1994). Aún así persiste la pregunta de por qué este alelo está únicamente presente en la población TAX y de cuáles son las relaciones evolutivas de esta población con el resto de las poblaciones de ambas especies.

Perspectivas

Este estudio deja abiertas más preguntas de las que contesta. Muchas de las hipótesis que se intentó discutir tienen una gran importancia dentro de la Ecología Evolutiva en general y el tema de las interacciones en particular. Por lo tanto yo considero que valdría la pena ponerlas a prueba de manera formal, realizando muestreos más numerosos, que abarcasen un mayor número de localidades a distintas escalas geográficas y lapsos de tiempo más prolongados. Además, los análisis de estructura genética podrían complementarse mediante experimentos ecológicos y de genética cuantitativa especialmente diseñados para responder cada una de las interrogantes. Las correlaciones sugeridas entre la diferenciación de las poblaciones y su asociación con semillas almacenadas o silvestres sólo podrá confirmarse analizando un mayor número de poblaciones, y la correlación del nivel de variación genética con la amplitud de la distribución geográfica y la importancia de las especies como plagas, mediante la comparación de un mayor número de especies. Las relaciones evolutivas entre las poblaciones y las especies podrían reconstruirse empleando otro marcador molecular, por ejemplo el ADN mitocondrial. Esto permitiría realizar estudios de filogeografía, con lo que se lograría una mayor precisión en la identificación de las causas que están determinando los patrones de diferenciación de las poblaciones, y también permitiría proponer algunos modelos de especiación para estos insectos. El sistema

frijol-brúquidos-parasitoides es en mi opinión bastante adecuado para lograr estos objetivos.

LITERATURA CITADA

- Abate, T. y J.K.O. Ampofo. 1996. Insect pests of common bean in Africa: their ecology and management. *Annual Review of Entomology* 41: 123-132.
- Anónimo. 1988. Frijoles silvestres, fuente de resistencia a los brúquidos. *CIAT* 7:6-8.
- Archie, J.W. 1985. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. *Evolution* 39: 623-637.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Baughman, J.F., P.F. Brussard, P.R. Ehrlich y D. D. Murphy. 1990. History, selection, drift, and gene flow: complex differentiation in checkerspot butterflies. *Canadian Journal of Zoology* 68: 1967-1975.
- Benrey, B., A. Callejas, L. Ríos, K. Oyama y R.F. Denno. 1997. The effects of plant domestication on the interaction between phytophagous insects and parasitoids. *Biological Control* (En prensa).
- Berenbaum, M.R. 1990. Evolution of specialization in insect-umbellifer associations. *Annual Review of Entomology* 35: 319-343.
- Bernays, E. y M. Graham. 1988. On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. *Ecology* 69: 886-892.
- Biemont, J.C. y A. Bonet. 1981. The bean weevil populations from the *Acanthoscelides obtectus* Say group living on wild or subsponaneous *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* L. and on *Phaseolus vulgaris* L. cultivated in the Tepoztlán region state of Morelos, México. Pp. 23-41 En: Labeyrie, V. de. *The ecology of bruchids attacking legumes (pulses)*. Junk Publishers, The Hague.

- Bossart, J.L. y J.M. Scriber. 1995. Maintenance of ecologically significant genetic variation in the tiger swallowtail butterfly through differential selection and gene flow. *Evolution* 49: 1163-1171.
- Brooks, D.R. 1988. Macroevolutionary comparisons of host and parasite phylogenies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 235-259.
- Bush, G y S.R. Diehl. 1982. Host shifts, genetic models of sympatric speciation, and the origin of parasitic insect species. Pp. 297-306 En: J.H. Visser y A.K. Minks, eds. *Insect-plant relationships*. Wageningen: Pudoc
- Callejas, A. 1996. Variación en la conducta y parámetros de historia de vida de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) sobre tres subespecies de *Phaseolus coccineus*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F., 74 p.
- Cardona, C. y C.E. Posso. 1987. Resistencia de variedades de frijol a los gorgojos de granos almacenados. *CIAT* 9: 1-4.
- Center, T.D. y C.D. Johnson. 1974. Coevolution of some seed beetles (Coleoptera: Bruchidae) and their hosts. *Ecology* 55: 1096-1103.
- Costa III, J.T. y K.G. Ross. 1993. Seasonal decline in intracolony genetic relatedness in eastern tent caterpillars: implications for social evolution. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 32: 47-54.
- Costa III, J.T. y K.G. Ross. 1994. Hierarchical genetic structure and gene flow in macrogeographic populations of the eastern tent caterpillar (*Malacosoma americanum*). *Evolution* 48: 1158-1167.
- Courtney, S.P. 1981. Coevolution of pierid butterflies and their cruciferous foodplants. III. *Anthocharis cardamines* (L). Survival, development and oviposition on different host plants. *Oecologia* 51: 91-96.
- Coyne, J.A. y H.A. Orr. 1989. Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution* 43: 362-381.

- Crouau-Roy, B. 1989. Population studies on an endemic troglobitic beetle: Geographical patterns of genetic variation, gene flow and genetic structure compared with morphometric data. *Genetics* 121: 571-582.
- Crow, J.F. 1986. *Basic concepts in population, quantitative and evolutionary genetics*. HW Freeman Company, New York.
- Delgado, A., A. Bonet y P. Gepts. 1988. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America. Pp. 163-185 *En*: P. Gepts, ed. *Genetic resources of Phaseolus beans*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Diehl, S.R. y G.L. Bush. 1984. An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. *Annual Review of Entomology* 29: 471-504.
- Ehrlich, P.R. y P.H. Raven. 1964. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Feder, J.L., C.A. Chilcote y G.L. Bush. 1990. Regional, local and microgeographic allele frequency variation between apple and hawthorn populations of *Rhagoletis pomonella* in western Michigan. *Evolution* 44: 595-608.
- Feder, J.L., T.A. Hunt y G.L. Bush. 1993. The effect of climate, host plant phenology, and host fidelity on the genetics of apple and hawthorn infesting races of *Rhagoletis pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 69: 117-135.
- Feder, J.L. *et al.* 1994. Host fidelity is an effective premating barrier between sympatric races of the apple maggot fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 7990-7994.
- Feeny, P. 1992. The evolution of chemical ecology: contributions from the study of herbivorous insects. Pp. 1-44 *En*: Rosenthal, A. y M.A. Berenbaum, eds. *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*, 2nd edition, Academic Press, San Diego.
- Fox, L.R. y P.A. Morrow. 1981. Specialization: Species property or local phenomenon? *Science* 211: 887-893.

- Fox, C.W. 1993. A quantitative genetic analysis of oviposition preference and larval performance on two hosts in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Evolution* 47: 166-175.
- Funk, D.J., D.J. Futuyma, G. Orti y A. Meyer. 1995. A history of host associations and evolutionary diversification for *Ophraella* (Coleoptera: Chrysomelidae): new evidence from mitochondrial DNA. *Evolution* 49: 1008-1017.
- Futuyma, D.J. 1983. Selective factors in the evolution of host choice by phytophagous insects. Pp. 227-244 En S. Ahmad, ed. *Herbivorous insects: host seeking behavior and mechanisms*. Academic Press, New York.
- Futuyma, D.J. y G.C. Mayer. 1980. Non-allopatric speciation in animals. *Systematic Zoology* 29: 254-271.
- Futuyma, D.J. y S.C. Peterson. 1985. Genetic variation in the use of resources by insects. *Annual Review of Entomology* 30: 217-238.
- Futuyma, D.J. y T.E. Philippi. 1987. Genetic variation and covariation in responses to host plants by *Alsophila pometaria* (Lepidoptera: Geometridae). *Evolution* 41: 269-279.
- Futuyma, D.J. y G. Moreno. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 207-233.
- Futuyma, D.J., R.P. Cort y I. Noordwijk. 1984. Adaptation to host plants in the fall cankerworm (*Alsophila pometaria*) and its bearing on the evolution of host affiliation in phytophagous insects. *American Naturalist* 123: 287-296.
- Futuyma, D.J., M.C. Keese y S.J. Scheffer. 1993. Genetic constraints and the phylogeny of insect-plant associations: responses of *Ophraella communis* (Coleoptera: Chrysomelidae) to host plants of its congeners. *Evolution* 47: 888-905.

- Futuyma, D.J. , J.S. Walsh, T. Morton, D.J. Funk y M.C. Keese. 1994. Genetic variation in a phylogenetic context: responses of two specialized leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) to host plants of their congeners. *Journal of Evolutionary Biology* 7: 127-146.
- Futuyma, D.J., M.C. Keese y D.J. Funk. 1995. Genetic constraints on macroevolution: the evolution of host affiliation in the leaf beetle genus *Ophraella*. *Evolution* 49: 797-809.
- Gepts, P. 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. *Economic Botany* 44: 28-38.
- Graur, D. 1985. Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution* 39: 190-199.
- Hare, J.D. y G.G. Kennedy. 1986. Genetic variation in plant-insect associations: survival of *Leptinotarsa decemlineata* populations on *Solanum carolinense*. *Evolution* 40: 1031-1043.
- Hartl, D.L. 1988. *A primer of population genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1989. *Principles of population genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hedrick, P.W. 1986. Genetic polymorphisms in heterogeneous environments: a decade later. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 535-566.
- Herbert, P. y M. Beaton. 1986. *Cellulose acetate gel electrophoresis*. Helena Laboratories, Beaumont, Texas.
- Jaenike, J. 1981. Criteria for ascertaining the existence of host races. *American Naturalist* 117: 830-834.
- Jaenike, J. 1989. Genetic population structure of *Drosophila tripunctata*: patterns of variation and covariation of traits affecting resource use. *Evolution* 43: 1467-1482.
- Jaenike, J. 1990. Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 243-273.

- Janzen, D.H. 1977. How southern cowpea weevil larvae (Bruchidae: *Callosobruchus maculatus*) die on nonhost seeds. *Ecology* 58: 921-927.
- Jermyn, T. 1984. Evolution of insect/host plant relationships. *American Naturalist* 124: 609-630.
- Johnson, C.D. 1983. Ecosystematics of *Acanthoscelides* (Coleoptera: Bruchidae) of southern Mexico and Central America. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 56, 248 pp.
- Johnson, P.A., F.C. Hoppensteadt, J.J. Smith y G.L. Bush. 1996. Conditions for sympatric speciation: a diploid model incorporating habitat fidelity and non-habitat assortative mating. *Evolutionary Ecology* 10: 187-205.
- Kingsolver, J.M. 1990. Biosystematics of the genus *Zabrotes* of America North of Mexico (Coleoptera: Bruchidae). *Transactions of the American Entomological Society* 116: 135-174.
- Leroi, B., A. Bonet, B. Pichard y J.C. Biemont. 1990. Relaciones entre Bruchidae (Coleoptera) y poblaciones silvestres de *Phaseolus* (Leguminosae: Phaseolinae) en el norte de Morelos, México. *Acta Zoológica Mexicana* 42, 28 pp.
- Levene, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *Annals of Mathematics and Statistics* 20: 91-94.
- Lewontin, R.C. 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York
- Li, C.C. y D.G. Horovitz. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics* 5: 107-117.
- Lindig, R. y F. Espinosa. 1997a. Variation in antifungal defenses in relation to domestication status in *Phaseolus vulgaris*, L. (*En prensa*).
- Lindig, R. y F. Espinosa. 1997b. Phytoalexins, resistance traits and domestication status in *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus lunatus*, L. (*En prensa*).

- McCauley, D.E. 1991a. Genetic consequences of local population extinction and recolonization. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 5-8.
- McCauley, D.E. 1991b. The effect of host plant patch size variation on the population structure of a specialist herbivore insect, *Tetraopes tetraophthalmus*. *Evolution* 45: 1675-1684.
- McPheron, B.A., D. Courtney Smith y S.H. Berlocher. 1988. Genetic differences between host races of *Rhagoletis pomonella*. *Nature* 336: 64-66.
- Michalakis, Y., A.W. Sheppard, V. Noël y I. Olivieri. 1993. Population structure of a herbivorous insect and its host plant on a microgeographic scale. *Evolution* 47: 1611-1616.
- Mitter, C. y B.D. Farrell. 1991. Macroevolutionary aspects of insect/plant interactions. Pp. 35-78 En: E. Bernays, ed. *Insect/plant interactions*, Vol 3 CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Mitter, C., B.D. Farrell y D.J. Futuyma. 1991. Phylogenetic studies of insect/plant interactions: insights into the genesis of diversity. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 290-293.
- Mopper, S. 1996. Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 235-238.
- Myers, J.H. 1985. Effect of physiological condition of the host plant on the ovipositional choice of the cabbage white butterfly, *Pieris rapae*. *Journal of Animal Ecology* 54: 193-204.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* 41: 225-233.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

- Nei, M. y A.K. Roychoudhury. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379-390.
- Neigel, J.E. y J.C. Avise. 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. Pp. 515-534 *En: Evolutionary process and theory*, E. Nevo y S. Karlin, eds. Academic Press, New York.
- Ortega, L. 1988. Tasas de supervivencia y reproducción de *Acanthoscelides obtectus* Say en diferentes variedades de frijol *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 58 p.
- Pérez, G. y A. Bonet. 1984. Himenópteros parasitoides de *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) en Tepoztlán, Morelos. *Folia Entomologica Mexicana* 59: 71-78.
- Prowell Pashley, D. 1988. Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of fall armyworm. *Evolution* 42: 93-102.
- Radtkey, R.R. y M.C. Singer. 1995. Repeated reversals of host-preference evolution in a specialist herbivore insect. *Evolution* 49: 351-359.
- Ramírez, E.R. 1991. Tablas de vida y fertilidad del gorgojo *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera: Bruchidae) en cinco materiales de frijol *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 45 p.
- Rank, N. 1992. A hierarchical analysis of genetic differentiation in a montane leaf beetle *Chrysomela aeneicollis* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Evolution* 46: 1097-1111.
- Rausher, M.D. 1984. Tradeoffs in performance on different hosts: evidence from within-and between-site variation in the beetle *Deloyola guttata*. *Evolution* 38: 582-595.
- Rausher, M.D. 1988. Is Coevolution dead? *Ecology* 69: 898-901.

- Ramaswamy, S.B. 1988. Host finding by moths: sensory modalities and behaviours. *Journal of Insect Physiology* 34: 235-249.
- Renwick, J.A.A., y C.D. Radke. 1988. Sensory cues in host selection for oviposition by the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Journal of Insect Physiology* 34: 251-257.
- Renwick, J.A.A. y F.S. Chew. 1994. Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 39: 377-400.
- Richardson, B.J., P.R. Baverstock y M. Adams. 1986. *Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematic and population studies*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
- Roderick, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology* 41: 325-352.
- Roininen, H., J. Vuorinen, J. Tahvanainen y R. Julkunen-Tiitto. 1993. Host preference and allozyme differentiation in shoot galling sawfly, *Euura atra*. *Evolution* 47: 300-308.
- Sánchez, A. 1992. Preferencia y supervivencia de *Zabrotes subfasciatus* en distintas variedades de frijol. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 73 p.
- Shade, R.E., R.C. Pratt y M.A. Pomeroy. 1987. Development and mortality of the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae), on mature seeds of tepary beans, *Phaseolus acutifolius*, and common beans, *Phaseolus vulgaris*. *Environmental Entomology* 16: 1067-1070.
- Siemens, D.H. y C.D. Johnson. 1990. Host-associated differences in fitness within and between populations of a seed beetle (Bruchidae): effects of plant variability. *Oecologia* 82: 408-413.

- Singer, M.C., C.D. Thomas, H.L. Billington y C. Parmesan. 1989. Variation among conspecific insect populations in the mechanistic basis of diet breadth. *Animal Behavior* 37: 751-759.
- Singer, M.C., D. Ng y R.A. Moore. 1991. Genetic variation in oviposition preference between butterfly populations. *Journal of Insect Behavior* 4: 531-535.
- Singer, M.C., D. Ng, D. Vasco y C.D. Thomas. 1992. Rapidly evolving associations among oviposition preferences fail to constrain evolution of insect diet. *American Naturalist* 139: 9-20.
- Singer, M.C., C.D. Thomas y C. Parmesan. 1993. Rapid human-induced evolution of insect host associations: a problem for conservation? *Nature* 366:681-683.
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- Slatkin, M. y N.H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- Smartt, J. 1988. Morphological, physiological and biochemical changes of *Phaseolus* beans under domestication. Pp. 143-162 En: P. Gepts, ed., *Genetic resources of Phaseolus beans*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Smith-King, P. 1987. Macro- and microgeographic structure of a spatially subdivided beetle species in nature. *Evolution* 41: 401-416.
- Smith King, P. 1988. Distribution and genetic structure of two allopatric beetle (Coleoptera: Melyridae) species on rock outcrops in the southeast. *Annals of the Entomological Society of America* 81: 890-898.
- Sneath, P.H.A. y R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco.

- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1969. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Soulé, M. y B.R. Stewart. 1970. The "niche variation" hypothesis: a test and alternatives. *American Naturalist* 104: 85-97.
- Southgate, B.J. 1979. Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology* 24: 449-473.
- Swofford, D.L. y R.K. Selander. 1981. BIOSYS-1 (release 1.7): a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. User's manual. Illinois Natural History Survey, Illinois.
- Thompson, J.N. 1988. Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 47: 3-14.
- Thompson, J.N. 1994. *The coevolutionary process*. The University of Chicago Press.
- Via, S. 1984a. The quantitative genetics of polyphagy in an insect herbivore. I. Genotype-environment interaction in larval performance on different host plant species. *Evolution* 38: 881-893.
- Via, S. 1984b. The quantitative genetics of polyphagy in an insect herbivore. II Genetic correlations in larval performance within and among host plants. *Evolution* 38: 896-905.
- Via, S. 1990. Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: The experimental study of evolution in natural and agricultural systems. *Annual Review of Entomology* 35: 421-446.
- Wade, M.J. y D.E. McCauley. 1988. Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution* 42: 995-1005.
- Waring, G.L., W.G. Abrahamson y D.J. Howard. 1990. Genetic differentiation among host-associated populations of the gallmaker *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution* 44: 1648-1655.

- Weir, B.S. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Whitlock, M.C. 1992. Nonequilibrium population structure in forked fungus beetles: extinction, colonization, and the genetic variance among populations. *American Naturalist* 139: 952-970.
- Workman, D.L. y J.D. Niswander. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes II. Local differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics* 22: 24-49.
- Wright, S. 1921. Systems of mating. *Genetics* 6: 111-178.
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, NJ.

APÉNDICE A

En éste apéndice se presentan algunos resultados preliminares obtenidos con el parasitoide *Eupelmus cushmani* que es uno de los varios que atacan a *A. obtectus* y *A. obvelatus* en la región de Tepoztlán, Mor. (Pérez y Bonet, 1984). Como se mencionó varias veces a lo largo del texto, ésta tesis forma parte de un proyecto más amplio cuyo objetivo es estudiar los aspectos ecológicos y genéticos de la interacción entre las plantas de frijol, los brúquidos depredadores de semillas y sus parasitoides. A partir de nuestras muestras de semillas silvestres emergieron varias especies de parasitoides pero, excepto en el caso de *E. cushmani*, el número de individuos de cada una no fue suficiente para efectuar análisis de estructura genética. Incluso los datos obtenidos a partir de *E. cushmani* son insuficientes para realizar inferencias que nos ayuden a entender mejor ésta interacción. Por ésta razón se presentan los resultados de forma puramente descriptiva, pero con la idea de que puedan servir como antecedente o punto de partida a estudios posteriores.

Materiales y Métodos

Eupelmus cushmani (Eupelmidae) es un insecto pequeño, de 1 a 1.5 mm de longitud, color verde-azul metálico cuando se observa bajo el microscopio y patas blanco-amarillentas. Aparentemente se trata de un ectoparasitoide que ataca las larvas de varias especies de depredadores de semillas (Ríos, comunicación personal).

Este insecto fue obtenido a partir de las vainas silvestres correspondientes a las siguientes muestras (ver Cuadro 1): HUI 1996 y 1997, TEP, SAC 1996 y 1997. La electroforesis se llevó a cabo del mismo modo que para los brúquidos, con la única diferencia de que, dado su pequeño tamaño, la cantidad de agua usada para macerarlos fue de 15 μ l. En el Cuadro 24 se muestran los sistemas enzimáticos que dieron buenos resultados y las condiciones para su electroforesis. Los datos fueron analizados de la misma manera que se describe en las págs. 28-35, pero no se calcularon los estadísticos de F, ni el flujo génico entre localidades.

Cuadro 24. Enzimas estudiadas y condiciones para la electroforesis en *Eupelmus cushmani*.

Enzima	Locus	Número	Amortiguador	Voltaje	Tiempo
Glutamato-oxaloacetato transferasa	GOT	E.C. 2.6.1.1	Citrato-Fosfato (A) pH = 6.4	150 V	1 hr
Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa	GPDH	E.C. 1.1.1.8	Tris-Maleato (K) pH = 7.2	120 V	1 hr
Isocitrato deshidrogenasa	IDH-1	E.C. 1.1.1.42	Citrato-Fosfato (A) pH = 6.4	120 V	1 hr
Malato deshidrogenasa	MDH	E.C. 1.1.1.37	Citrato-Fosfato (A) pH = 6.4	120 V	1 hr
Enzima málica	ME	E.C. 1.1.1.40	Tris-Maleato (C) pH = 7.8	150 V	1 hr
Fosfoglucomutasa	PGM	E.C. 2.7.5.1	Tris-Maleato (C) pH = 7.8	120 V	1 hr
Fosfoglucosa isomerasa	PGI	E.C. 5.3.1.9	Tris-Maleato (K) pH = 7.2	150 V	1 hr

Resultados

En los análisis sólo se incluyó a las hembras. Se detectó muy poca variación genética, como ha sido reportado para otras especies de himenópteros parasitoides (Graur, 1985). De los siete sistemas enzimáticos en los que se buscó polimorfismo, únicamente se encontró en PGI y PGM. En el Cuadro 25 se muestran las frecuencias alélicas para estos dos loci. Los individuos colectados en Huitzilac en 1996 y 1997 tuvieron frecuencias alélicas idénticas, por lo que se manejan como una sola población. Por el contrario, entre ambas muestras de San Andrés de la Cal sí ocurrieron cambios y se mantienen como poblaciones separadas. Los estimadores de la variación genética (tomando en cuenta a todos los loci), se proporcionan en el Cuadro 26. En ningún caso se encontraron desviaciones significativas de lo esperado en equilibrio Hardy-Weinberg.

Cuadro 25. Frecuencias alélicas en las poblaciones de *Eupelmus cushmani*

Locus	Poblaciones			
	HUI	TEP	SAC1996	SAC1997
PGI				
(N)	14	49	16	27
A	.071	.031	.000	.148
B	.857	.959	1.000	.815
C	.071	.010	.000	.037
PGM				
(N)	15	49	16	27
A	.100	.102	.063	.000
B	.900	.898	.875	.889
C	.000	.000	.063	.111

Cuadro 26. Variabilidad genética en *Eupelmus cushmani*. Los errores estándar se muestran entre paréntesis. Un locus se considera polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no excede 0.95. Las expectativas en H-W se calcularon según el método no sesgado de Levene (1949).

Población	Tamaño promedio de muestra por locus	Número promedio de alelos por locus	Porcentaje de loci polimórficos	Heterocigosidad Promedio	
				Observada	Esperada en Hardy-Weinberg
HUI	14.9 (0.1)	1.3 (0.2)	22.2	0.049 (0.033)	0.050 (0.034)
TEP	49.0 (0.0)	1.3 (0.2)	11.1	0.023 (0.014)	0.029 (0.021)
SAC1996	16.0 (0.0)	1.2 (0.2)	11.1	0.030 (0.024)	0.026 (0.026)
SAC1997	27.0	1.3	22.2	0.049 (0.033)	0.058 (0.039)

En el Cuadro 27 se muestra la matriz de distancias genéticas y en la Fig. 6 el dendograma en que se muestran las relaciones entre estas cuatro poblaciones de *E. cushmani*.

Cuadro 27. Matriz de distancia genética no sesgada de Nei (1978) entre todas las poblaciones muestreadas de *E. cushmani*.

Poblaciones	1	2	3	4
1 HUI		.000	.001	.000
2 TEP			.000	.003
3 SAC 1996				.003
4 SAC 1997				



Fig. 4. Dendrograma que resume las distancias genéticas de Nei (1978), agrupadas mediante UPGMA, para las poblaciones de *E. cushmani*.

APÉNDICE B

Fórmulas para preparar las soluciones amortiguadoras usadas en la electroforesis

Solución A
Citrato-Fosfato 0.01 M
pH 6.4

1.42 g Na_2HPO_4
0.53 g Acido Cítrico
Aforar a 1 lt

Solución K
Tris maleato 0.015 M
pH 7.2

1.82g Tris
0.81 g Acido maleico
Aforar a 1 lt

Solución C
Tris maleato 0.05 M
pH 7.8

6.06g Tris
2.32 g Acido maleico
Aforar a 1 lt

Solución J

Tris Citrato 0.1 M
pH 8.2

12.11g Tris
3.99g Acido cítrico
Aforar a 1 lt

Solución O

Tris-HCl
pH 9.0

24.6g Tris
30 ml HCl 1 N
Aforar a 1 lt

Fórmulas para la tinción de las enzimas usadas**IDH**

1.0 ml Tris HCl; pH 7.0
1.5 ml NADP
15 gotas Acido DL-Isocítrico
8 gotas MgCl₂
5 gotas MTT
5 gotas PMS
2 ml Agar

GPDH

0.6 ml Tris HCl; pH 8.0
1.5 ml NAD
22 gotas DL- α -Glicerofosfato
5 gotas MTT
5 gotas PMS
2 ml Agar

MDH

1.0 ml Tris HCl; pH 8.0
1.5 ml NAD
13 gotas substrato málico
5 gotas MTT
5 gotas PMS
2 ml Agar

PGI

1.0 ml Tris HCl; pH 8.0
1.5 ml NADP
5 gotas Fructosa-6-fosfato
5 gotas MTT
5 gotas PMS
10 μ l G6PDH
2 ml Agar

PGM

1.0 ml Tris HCl; pH 8.0
1.5 ml NADP
5 gotas Glucosa-1-fosfato
5 gotas MTT
5 gotas PMS
20 μ l G6PDH
2 ml Agar

GOT

3 ml solución GOT
10 gotas Azul Rápido sal BB (solución saturada)

ME

0.6 ml Tris HCl; pH 8.0
1.5 ml NAD
12 gotas substrato málico
2 gotas $MgCl_2$
5 gotas MTT
5 gotas PMS
2 ml Agar