



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE
Anastrepha ludens (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EN MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:
NANCY GÁLVEZ REYES**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
COMITÉ TUTOR: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
DR. MIGUEL SALVADOR FIGUEROA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA**

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2013.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE
Anastrepha ludens (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EN MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:
NANCY GÁLVEZ REYES**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DANIEL IGANCIO PIÑERO DALMAU
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
COMITÉ TUTOR: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
DR. MIGUEL SALVADOR FIGUEROA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA**

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2013.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática, en su sesión ordinaria del día 05 de agosto de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GÁLVEZ REYES NANCY** con número de cuenta 512013222 con la tesis titulada "**Variabilidad genética de poblaciones de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) en México**", bajo la dirección del **DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU**:

Presidente: DRA. LARISSA GUILLÉN CONDE
Vocal: DR. ZENÓN CANO SANTANA
Secretario: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
Suplente: DR. CARLOS CORDERO MACEDO
Suplente: DR. MIGUEL SALVADOR FIGUEROA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de octubre de 2013.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente de la interesada.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) por la beca otorgada en el en el período Agosto 2011-Julio 2013 (CVU: 263530). El programa de becas de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (DGEP) por el apoyo complementario para la asistencia a un congreso nacional. El financiamiento para realizar el proyecto se obtuvo a través del Instituto de Ecología-UNAM.

El comité tutorial quedó integrado por los siguientes miembros:

Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

Dr. Juan Servando Núñez Farfán

Dr. Miguel Salvador Figueroa

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo y el esfuerzo de muchas personas que amablemente me ayudaron en diferentes fases de la investigación. Por lo que quiero compartir mi profundo agradecimiento a:

Al **Dr. Daniel Piñero**, por haberme adoptado en su laboratorio de investigación y darme la oportunidad y sobre todo que sin conocerme me dio su confianza y formé parte de su equipo de trabajo. Que gracias a sus múltiples opiniones y sugerencias he tomado decisiones importantes tanto en mi proyecto de investigación como en el plano personal. Me siento muy afortunada de haberlo conocido. Gracias a su inmensa comprensión he evolucionado como persona y he aprendido a ver las cosas de una forma diferente. Para mí se ha vuelto un modelo a seguir. *"La ciencia moderna aun no ha producido un medicamento tranquilizador tan eficaz, como lo son unas palabras bondadosas"* (Sigmund Freud) y de ánimo a seguir.

A mi comité tutorial y revisores que contribuyeron a mejorar este trabajo: **Dr. Miguel Salvador Figueroa, Dra. Larissa Guillen Conde, Dr. Zenón Cano Santana, Dr. Juan Núñez Farfán, Dr. Carlos Cordero Macedo** por su lectura tan detallada y por haberme ayudado a mejorar mi tesis. ¡Muchas gracias!

A las instituciones que me donaron muestras de tejido para hacer los análisis moleculares y los investigadores que estuvieron en toda disposición de ayudar a proporcionar las muestras. En especial a la **Dra. Larissa Guillen Conde** del Instituto de Ecología (INECOL), Veracruz (México) y **M en C. Emilio Hernández Ortiz** del Departamento de Colonización y Cría de Moscas de la Fruta en Metapa de Domínguez, Chiapas (México).

Pero en especial, a estas personas, porque siempre estuvieron en la parte crucial de mi trabajo, que gracias a su disposición pude avanzar. Al Biólogo **Marco Suárez** por su tan noble comprensión de ayudarme a resolver muchas dudas que tuve con los análisis, sobre todo los programas *Migrate* y *Beast*. A la M. en C. **Eva Piedra**, por la enorme comprensión que tuvo conmigo en el trabajo de laboratorio y por enseñarme a hacer

redes de haplotipos. También, quiero agradecer a la M. en C. **Ariadna Morales**, por su inagotable apoyo en el laboratorio técnico en el laboratorio.

A todos los miembros de laboratorio de Genética y Ecología. A mis amigos y compañeros de laboratorio, por brindarme la confianza de compartir con ustedes enormes risas y sobre todo que siempre estuvieron allí para darme apoyo moral y mejor aún, contarme los mejores chistes para que yo me la pasara muy bien, mil gracias **Marco, Azalea, Sussete, Tania y Cony**, sin ustedes no se que hubiese sido de mi días en el cubo, ha sido un placer conocerlos y compartir experiencias académicas y de convivencia.

A **Nohelia y Paty** por las aventuras que me permitieron compartir con ustedes, sobre todo de conocerlas y saber que son personas maravillosas, ser como una familia, porque sabía que si algo pasaba podía contar con ustedes en cualquier momento.

A mis padres **Elena y Ervin** que a pesar de la distancia, siempre me han dado el apoyo moral y enseñarme a ser una persona de bien, tener amor y respeto a la vida y los seres vivos. En especial, a **Sabina, Rasec, Brawny y Nirasec** por que siempre han estado allí para celebrar cada uno de mis triunfos, sobre todo que cuando he necesitado que me escuchen siempre estuvieron. En esos momentos donde sientes que todo es difícil, me alentaron a seguir luchando, mil gracias!!! *"El autentico amigo es el que sabe todo sobre ti y sigue siendo tu amigo"* (Kurt Cobain).

PARA:

Mis abuelos Plácido y Francisca,
Por su inmenso amor y cariño.

A mi hermanita Sabina,
Mi alma gemela, juntas hemos conquistado mundos.

*"El que aprende y aprende y no practica lo que sabe, es como el que ara y ara
y no siembra" (Platón)*

*"Todos somos genios. Pero si juzgas a un pez por su capacidad de escalar
árboles, vivirá toda su vida creyendo que es inútil" (Albert Einstein)*

*"El estudio, y en general, la búsqueda de la verdad y la belleza conforman un
área donde podemos seguir siendo niños toda la vida" (Albert Einstein)*

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE CUADROS.....	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVOS.....	3
IV. ANTECEDENTES	4
4.1. Impacto del género <i>Anastrepha</i> spp. en la fruticultura en México.....	4
4.2. Variación genética del género <i>Anastrepha</i> spp	4
4.3. Variación genética de las poblaciones naturales en <i>A. ludens</i> de México.....	7
V. MATERIALES Y MÉTODOS	8
5.1. Material biológico.....	8
5.2. Extracción de ADN genómico	9
5.3. Amplificación y genotipación de microsatélites.....	9
5.4. Amplificación, secuenciación y genotipación del gen COImt.....	9
5.5. Estimación de la diversidad genética.....	10
5.6. Diferenciación y estructura de poblaciones	11
5.6.1. Microsatélites.....	11
5.6.2. El gen COImt.....	11
5.7. Método de aislamiento por distancia	12
5.7.1. Microsatélites.....	12
5.7.2. El gen COImt.....	12
5.8. Barreras genéticas con microsatélites.....	12
5.9. Flujo genético.....	12
5.9.1. Microsatélites.....	12
5.9.2. El gen COImt.....	12
5.10. Redes haplotípicas con el gen COImt	12
5.11. Filogenia molecular con el gen COImt	13
5.12. Demografía histórica con el gen COImt.....	13
5.12.1. La <i>D</i> de Tajima y <i>F_s</i> de Fu	13
5.12.2. Distribuciones <i>mismatch</i>	13
5.12.3. <i>Skyline Plot</i>	13
VI. RESULTADOS.....	14
6.1. Diversidad genética en poblaciones de <i>A. ludens</i>	14
6.1.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg con microsatélites.....	14

6.1.2. Alelos privados y polimorfismo	15
6.1.3. Número efectivo de alelos y riqueza alélica	15
6.1.4. Índice de Shannon, heterocigosidad y diversidad genética de Nei	15
6.1.5. Haplotipos, sitios segregantes, singletones y mutaciones	16
6.1.6. Diversidad haplotípica y nucleotídica, y estimador de Waterson	17
6.2. Diferenciación de las poblaciones de <i>A. ludens</i>	18
6.2.1. Diferenciación genética por F_{ST} y R_{ST} , y AMOVA con microsatélites	18
6.2.2. Diferenciación genética por N_{ST} y F_{ST} , y SAMOVA estimado con el gen COImt.....	21
6.3. Dendograma de relaciones genéticas	23
6.4. Modelo de aislamiento por distancia.....	24
6.5. Estructura genética	24
6.6. Barreras genéticas basado en microsatélites.....	25
6.7. Flujo genético.....	26
6.7.1. Microsatélites.....	26
6.7.2. El gen COImt.....	28
6.8. Filogenia molecular obtenido con el gen COImt	28
6.9. Análisis filogeográficos obtenido con el gen COImt	29
6.10. Demografía histórica a partir del gen COImt	30
6.10.1. Prueba de neutralidad	30
6.10.2. Distribución "mismatch"	31
6.10.3. Tamaño de la población	33
VII. DISCUSIÓN	35
7.1. Variación genética.....	35
7.2. Distribución geográfica de la variación genética	40
7.3. Diferenciación y estructura genética.....	41
7.4. Estimadores de migración.....	45
7.5. Filogenia molecular y redes de haplotipos	47
VII. CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS.....	50
ANEXOS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación y distribución de las localidades de colecta de <i>A. ludens</i>	8
Figura 2. Dendograma de distancia genética de Nei con microsatélites.....	24
Figura 3. Dendograma de distancia genética con el gen COImt.....	24
Figura 4. Estructura genética de poblaciones de <i>A. ludens</i>	26
Figura 5. Mapa de las tres principales barreras genéticas de <i>A. ludens</i>	27
Figura 6. Conexión genética entre poblaciones <i>A. ludens</i>	29
Figura 7. Árbol filogenético obtenidos de siete haplotipos del gen COImt.....	30
Figura 8. Redes de haplotipos construidos del gen COImt para <i>A. ludens</i>	31
Figura 9. Distribución "mismatch" de las poblaciones de <i>A. ludens</i>	33
Figura 10. "Skyline plot" bayesiano de las poblaciones de <i>A. ludens</i>	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Equilibrio de Hardy-Weinberg, Heterocigosis observada y esperada en poblaciones silvestres y cepa de laboratorio de <i>A. ludens</i>	15
Cuadro 2. Diversidad genética en poblaciones de <i>A. ludens</i> con microsatélites	16
Cuadro 3. Diversidad y diferenciación genética de poblaciones de <i>A. ludens</i> a partir del gen COImt.....	17
Cuadro 4. Estadísticos de las secuencias del gen COImt de <i>A. ludens</i>	18
Cuadro 5. Polimorfismo nucleotídico de haplotipos del gen COImt.....	19
Cuadro 6. Diferenciación genética en poblaciones de <i>A. ludens</i>	20
Cuadro 7. AMOVA e índice de diferenciación de <i>A. ludens</i> a partir de R_{ST}	21
Cuadro 8. AMOVA e índice de diferenciación de <i>A. ludens</i> a partir de F_{ST}	21
Cuadro 9. Diferenciación genética (N_{ST} y F_{ST}) con el gen COImt en <i>A. ludens</i>	22
Cuadro 10. Valores de K y Φ_{CT} obtenido con SAMOVA	22
Cuadro 11. AMOVA e índice de diferenciación genética usando todas las poblaciones silvestres de <i>A. ludens</i> y los grupos del género SAMOVA	23
Cuadro 12. Modelo de migración entre las poblaciones de <i>A. ludens</i>	28
Cuadro 13. Número efectivo de inmigrantes por generación (Nm).....	28
Cuadro 14. Prueba de neutralidad del gen COImt de <i>A. ludens</i>	32

RESUMEN

Anastrepha ludens Loew, la mosca mexicana de la fruta, es considerada una de las plagas más importantes de cítricos y mangos en diferentes regiones de México. Uno de los métodos utilizados para su control, es la Técnica del Insecto Estéril (TIE), el cual consiste en liberar moscas machos estériles producidas en laboratorio con la premisa de que hay una alta similitud genética con la población silvestre. En esta especie como en otras, la existencia de barreras naturales puede dar origen a una estructuración poblacional en loci neutrales y posiblemente conductuales o adaptativos, que produzcan varianza en los resultados de este método de control. Por esta razón, es importante entender la diversidad y estructura genética de poblaciones silvestres de *A. ludens* de distintas zonas biogeográficas en México. En este contexto, se determinó la variabilidad genética interpoblacional de *A. ludens*, mediante la caracterización genética de 120 individuos silvestres colectados en cinco zonas biogeográficas y una cepa de laboratorio. Los análisis incluyeron nueve microsatélites nucleares y la secuencia de un gen mitocondrial (COInt). Los resultados muestran que seis loci de microsatélites se desviaron significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg con exceso de homocigotos. Utilizando microsatélites, la diversidad genética y riqueza de alelos en las poblaciones silvestres fueron moderadas ($H_o = 0.229$, $H_e = 0.356$), con 35 alelos y la riqueza de alelos fue 2.796. Por otro lado, la diversidad haplotípica fue moderada y la diversidad nucleotídica baja ($H_d = 0.1594$, $\pi = 0.0008$), encontrando sólo siete haplotipos con COInt. Los individuos de laboratorio mostraron menor diversidad y riqueza alélica ($H_o = 0.211$, $H_e = 0.337$ y $A = 2.11$; $H_d = 0.1947$, $\pi = 0.0005$). El gen COInt mostró poco polimorfismo con dos grupos ligeramente estructurados ($\Phi_{ST} = 0.167$; $N_{ST} = 0.048$). Los microsatélites identificaron tres grupos genéticos, delimitados por barreras geográficas, con una estructura genética moderada ($F_{ST} = 0.019$ y $R_{ST} = 0.072$). En ambos marcadores, la población Soconusco se diferenció de las otras ($F_{ST} = 0.065$; $R_{ST} = 0.191$; $N_{ST} = 0.128$, y $\Phi_{ST} = 0.167$). Con microsatélites, la población de laboratorio mostró también diferenciación moderada respecto a la población Soconusco ($F_{ST} = 0.109$, $R_{ST} = 0.154$, $N_{ST} = 0.064$). Se encontraron barreras genéticas que formaron tres grupos 1) Planicie Costera del Noreste y Costa Golfo, 2) Soconusco y 3) Altiplanicie y Costa Pacífico. Dichas barreras coinciden con la presencia física natural

de las montañas de la Sierra Madre Occidental y Oriental, la Faja Volcánica Transmexicana, la Sierra Madre del Sur y una barrera climático-ambiental debida a los vientos alisios en el Istmo de Tehuantepec. Por otra parte, el tamaño efectivo de las poblaciones se mantuvo constante a través del tiempo, hasta aproximadamente hace 100 años cuando las poblaciones declinaron. La población de laboratorio presenta expansión demográfica debido a la cría masiva. Finalmente, el flujo genético muestra que ha existido suficiente migración entre todas las poblaciones para homogenizar la estructura genética, pero no hay flujo de genes de las poblaciones Altiplanicie y Costa Pacífico hacia las otras. Además, los elevados valores de N_e ancestral y actual sugieren que *A. ludens* es una especie con gran resistencia a los cambios climáticos probablemente por las características biológicas de la especie, así como su amplio rango de hospederos y alta capacidad de dispersión.

Palabras clave: *Anastrepha ludens*, moscas de la fruta, microsatélites, COInt, diversidad genética, estructura genética, flujo genético, tamaño efectivo poblacional, áreas biogeográficas.

ABSTRACT

Anastrepha ludens Loew, the Mexican fruit fly, is considered one of the most important pests of citrus and mangos in different regions of Mexico. One of the methods used for its control, is the Sterile Insect Technique (SIT), which consist in releasing sterile male flies produced in the laboratory with the premise that there is a high genetic similarity to the wild population. In this species as in others, the existence of natural barriers can give rise to a populational structure in neutral loci and possibly behavioral or adaptive traits that produce variance in the results of this control method. For this reason, it is important to understand the diversity and genetic structure of *A. ludens* wild populations from different biogeographical zones in Mexico. In this context, the *A. ludens* interpopulational genetic variability was determined, using the genetic characterization of 120 wild individuals collected in five biogeographic zones and a laboratory strain. The analysis included nine nuclear microsatellites and the sequence of a mitochondrial gene (COI_{mt}). The results show that six microsatellite loci deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium with homozygote excess. Genetic diversity and allelic richness in wild populations were moderate ($H_o = 0.229$, $H_e = 0.356$), with 35 alleles and allelic richness was 2.796 using microsatellites. Furthermore, haplotype diversity was moderate and nucleotide diversity was low ($hd = 0.1594$, $\pi = 0.0008$), with only seven haplotypes with COI_{mt}. Laboratory individuals showed less diversity and allelic richness ($H_o = 0.211$, $H_e = 0.337$ and $A = 2.11$; $hd = 0.1947$, $\pi = 0.0005$). The gene COI_{mt} revealed little polymorphism with two groups slightly structured ($\Phi_{ST} = 0.167$, $N_{ST} = 0.048$). The microsatellites identified three genetic groups, delimited by geographical barriers, with a moderate genetic structure ($F_{ST} = 0.019$ and $R_{ST} = 0.072$). In both markers, Soconusco population differed from the others ($F_{ST} = 0.065$, $R_{ST} = 0.191$, $N_{ST} = 0.128$, and $\Phi_{ST} = 0.167$). The laboratory population showed moderate differentiation with microsatellites, respect to the Soconusco population ($F_{ST} = 0.109$, $R_{ST} = 0.154$, $N_{ST} = 0.064$). Three genetic groups were found: 1) Northeastern Coastal Plain and Gulf Coast, 2) Soconusco, and 3) Plateau and Pacific Coast. These barriers are consistent with the natural physical presence of the mountains of the Sierra Madre Occidental and Oriental, the Transmexican Volcanic Belt, the Sierra Madre del Sur, and a climate-environmental barrier due to the trade winds in the Isthmus of Tehuantepec.

Moreover, the effective populations size remained constant over time, until about 100 years ago when wild populations declined in size. On the other hand, the laboratory population presents demographic expansion due to mass rearing. Finally, gene flow analyses showed that enough migration among all populations homogenize the genetic structure, but that no migration was detected from Plateau and Pacific Coast populations towards the others. Additionally, the high values of current and ancestral N_e suggest that *A. ludens* is a species with high resistance to climatic changes probably because the biological characteristics of the species and its wide host range and high dispersal capabilities.

Keywords: *Anastrepha ludens*, fruit flies, microsatellites, COI_{mt}, genetic diversity, genetic structure, gene flow, effective population size, biogeographic areas.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de la diversidad genética de una población implica, entre otras cosas, tratar de deducir los procesos que moldea la cantidad y distribución de la variación genética en el tiempo y en el espacio. Esta área del conocimiento ha dado lugar a la genética ecológica, la genética del paisaje y la genética de la conservación (Lewontin, 1991; Hedrick, 2001; Frankham *et al.*, 2010).

Las aplicaciones del estudio de diversidad genética van desde conocer los patrones de evolución de las especies hasta el uso y manejo de la biodiversidad en sus diferentes niveles (Griffiths *et al.*, 1996). Particularmente es importante comprender los patrones de diversidad genética en especies invasoras y patógenas para encauzar propuestas de manejo que incluyan el componente genético (Krafsur, 2005).

Las moscas de la fruta del género *Anastrepha* son de los insectos-plaga más nocivos en la fruticultura, que en México, causan pérdidas por daño directo al fruto por un monto anual de 30,000 millones de pesos (Loera-Gallardo, 2009; De Teodoro-Pardo, 2011), además de los gastos relacionados con las acciones de control (Enkerlin, 2000; Reyes *et al.*, 2000). El género *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) comprende casi 250 especies clasificadas en 18 grupos que están distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de América (Norrbom *et al.*, 1999; Norrbom y Korytkowski 2009, 2012).

En México se han descrito 37 especies del género *Anastrepha* (Hernández-Ortiz, 2007). Las especies de mayor importancia económica son: *Anastrepha ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart), *A. serpentina* (Wiedemann) y *A. striata* (Schiner) (Hernández-Ortiz y Aluja, 1993; Aluja, 1994; Pinson *et al.*, 2006). *Anastrepha ludens* es conocida comúnmente como mosca mexicana de la fruta (Aluja, 1994) y es considerada plaga de frutos en cítricos (*Citrus paradisi*, *Citrus* spp.), mango (*Mangifera indica*) y durazno (*Prunus persica*), cuando utiliza éstos frutos como substrato de oviposición y desarrollo de sus larvas (Hernández-Ortiz y Aluja, 1993; Núñez, 2000).

Actualmente, el control de la población de *A. ludens* emplea como piedra angular la técnica del insecto estéril (TIE). El proceso consiste en liberar grandes cantidades de machos esterilizados mediante radiación gamma en las zonas infestadas (Klassen y Curtis, 2005; Rull *et al.* 2007). Así, el apareamiento entre hembras silvestres y machos estériles no produce descendencia (Vreysen, 2005; Pinson *et al.*, 2006). La TIE asume que los individuos liberados tienen alta similitud genética con los silvestres. Sin embargo, el aislamiento de la colonia de laboratorio y los efectos de los factores ambientales y genéticos en los individuos silvestres están influyendo negativamente en el control poblacional. Después de varias décadas de reproducción masiva en cautiverio se ha detectado que la eficiencia del método disminuyó porque se está presentando incompatibilidad de apareamiento y baja competitividad en el comportamiento reproductivo (selección sexual y patrones de cortejo) y baja longevidad en los machos estériles, respecto a los que se registran en los silvestres (Rull *et al.*, 2005; Rull y Barreda-Landa, 2007).

Entre las posibles causas de la ineficiencia de los machos estériles se encuentra la pérdida de variación genética (Rull y Barreda-Landa, 2007), ya que en las poblaciones aisladas, como las de cría masiva, se favorece la aparición de individuos homocigotos debido a la endogamia (Alberti *et al.*, 2002). Por otro lado, es posible que exista elevada diversidad genética de las poblaciones silvestres debido a la variación en las condiciones geográficas y climáticas en el área de distribución de la especie, así como a los grandes tamaños poblacionales (Shi *et al.*, 2005).

Escasa es la información relacionada con estudios de genética de poblaciones en la especie *A. ludens* aun cuando es una herramienta que permite comprender los patrones de diversidad genética en especies invasoras y patógenas, en relación con el espacio-tiempo (Lewontin, 1991; Griffiths *et al.*, 1996), con el fin de encauzar propuestas de manejo que incluyan el componente genético (Krafsur, 2005).

II. HIPÓTESIS

La variabilidad genética presente en *Anastrepha ludens* está fuertemente influenciada por las características de las diferentes zonas biogeográficas de México. Respecto a ello, la Altiplanicie, la Planicie Costera del Noroeste, la Costa Pacífico, la Costa Golfo y el Soconusco presentan mayor aislamiento geográfico debido a la barrera natural generada por la existencia de la Faja Volcánica Transmexicana, la Sierra Madre del Sur, la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre de Chiapas.

III. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue determinar la variabilidad genética en poblaciones de *Anastrepha ludens* en cinco zonas biogeográficas de México: Planicie Costera del Noroeste, Altiplanicie, Costa Pacífico, Costa Golfo y Soconusco, así como de una cepa reproducida en laboratorio por 25 años que equivale a 152 generaciones.

Por otro lado, los objetivos particulares formulados en este estudio fueron los siguientes:

1. Conocer la variación genética de *A. ludens* en las zonas biogeográficas de México y una cepa de laboratorio con marcadores moleculares nucleares (microsatélites) y mitocondrial (COI).
2. Conocer la diferenciación, estructura y flujo genético de las poblaciones silvestres.

IV. ANTECEDENTES

4.1. Impacto del género *Anastrepha* spp. en la fruticultura en México

El área aproximada que dedica México para cultivar 32 especies de frutales es de 1'300,000 ha. De ésta superficie el 9.5% alberga varios hospederos más importantes para las moscas de la fruta, en especial las del grupo del género *Anastrepha* spp. La producción anual de frutas es de aproximadamente 10 millones ton/año, que representan el 16% de la producción agrícola total (Gutiérrez-Samperio *et al.*, 1993; Loera-Gallardo, 2009). Las moscas de la fruta ocasionan un daño directo a frutos como cítricos, mangos, durazno, guayaba y zapote, cuando las hembras los usan como substrato de oviposición y desarrollo de sus larvas provocando el deterioro y la caída del fruto, así como su contaminación por patógenos (Hernández-Ortiz, 1992; Hernández-Ortiz y Aluja, 1993). Las pérdidas en la producción de cítricos, mango y guayaba llegan hasta 2'256,849.7 pesos (Enkerlin *et al.*, 1989; Aluja, 1994; Aluja *et al.*, 1996; Loera-Gallardo, 2009). Los frutos como el mango y la naranja ocupan la mayor parte de la superficie de frutales en México y su producción anual en conjunto alcanza un valor de 7'800,232 pesos (Loera-Gallardo, 2009).

Además de las pérdidas en rendimiento ocasionados por el daño a la fruta y el incremento de los costos de producción debido a los gastos utilizados para el control de esta plaga, se añaden los daños indirectos que incluyen la restricción en la comercialización nacional e internacional debida a las barreras cuarentenarias, la construcción y mantenimiento de instalaciones para el tratamiento de frutas y la implementación de los programas de control y erradicación (Norrbon, 2004; Loera-Gallardo, 2009).

4.2. Variación genética del género *Anastrepha* spp.

El estudio de la diversidad genética incluye aquellos procesos que moldean la cantidad y distribución de la variación genética en el espacio y en el tiempo (Lewontin, 1991; Griffiths *et al.*, 1996; Hedrick, 2001; Frankahm *et al.*, 2010). Por ello, el objetivo

principal de la genética de poblaciones es la descripción y explicación de la variación genética dentro y entre poblaciones naturales (Lewontin, 1991). En este sentido, ésta es una herramienta útil para explicar la determinación de los niveles de variación genética en poblaciones naturales y de cómo esa variación cambia en el tiempo y el espacio (Griffiths *et al.* 1996). Particularmente, es necesario entender los patrones de diversidad genética en especies invasoras y patógenas, tales como los insectos-plaga para encauzar propuestas de manejo que incluyan el componente genético (Krafsur, 2005). A pesar que varias especies de moscas del género *Anastrepha* están consideradas como plagas de importancia económica, son pocos los estudios que se han realizado y, en el caso de *A. ludens*, considerada la plaga principal de frutos de cítricos y mango, y con un rango de distribución que se ha reportado desde el sur de Texas (aunque recientemente fue declarada erradicada de esta región (NAPPO, 2012) hasta Costa Rica (Hernández-Ortíz y Aluja, 1993), los estudios de variación genética y de relaciones filogenéticas en la especie *Anastrepha ludens* son escasos (Malavasi *et al.*, 1982; Pecina *et al.*, 2009; De Teodoro-Pardo, 2011).

Entre los estudios de genética de poblaciones y filogeografía que se han realizado del género *Anastrepha*, está el de las relaciones evolutivas entre las especies de *Anastrepha*, investigado por McPheron *et al.* (2000) con rRNA mitocondrial del gen 16S y el basado en caracteres morfológicos (Norrbom *et al.*, 2000). En ambos trabajos, cuatro de las especies plaga más importantes, *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. fraterculus* y *A. suspensa* fueron clasificadas dentro del grupo *fraterculus*. Dentro de los trabajos que se han realizado con el grupo *fraterculus* se encuentra el estudio realizado por Smith-Caldas *et al.* (2001) con secuencias del COI_{mt} en poblaciones de los Andes de Colombia, Venezuela y México, sugieren que el grupo *fraterculus* es parafilético, que *A. obliqua* podría provenir de un linaje genéticamente diverso, que *A. suspensa* es monofilética y que *A. ludens* forma la base del grupo *fraterculus*.

Dentro del grupo *fraterculus*, la especie más estudiada es *A. fraterculus*. Por ejemplo, en 1985, Morgante y Malavasi, usando cinco loci polimórficos de sistemas enzimáticos demostraron heterocigosidad baja de 0.031 entre poblaciones silvestres de *A. fraterculus* en Brasil. En otro estudio, Steck y Sheppard (1993), analizando mediante marcadores RFLPs los patrones de ADN mitocondrial (ADN_{mt}), entre diferentes poblaciones de Bahía y sur de Brasil y la costa Venezolana, igualmente encontraron

variaciones. Estas variaciones también se presentaron entre poblaciones de Venezuela y Brasil usando el gen 16S (McPheron *et al.*, 2000). La diferencias de poblaciones de *A. fraterculus*, provenientes de diferentes regiones, también se han demostrado conductual (*i.e.*, diferentes preferencias de hospederos) y morfológicamente (*i.e.*, variación en el ovipositor y el ala) entre poblaciones de México y Sudamérica (Aluja *et al.*, 2003, Hernández Ortíz *et al.*, 2004).

Por su parte, Selivon *et al.* (2005a; 2005b), combinando isoenzimas, cariotipos, morfometría y cruzamientos en diez poblaciones de dos entidades brasileñas del complejo de *A. fraterculus* encontraron diferencias en las frecuencias alélicas de cuatro loci que les permitieron reconocer dos grupos o *clusters* de poblaciones, que actualmente son reconocidos como dos especies crípticas (*A. spp. 1 aff. fraterculus* y *A. spp. 2 aff. fraterculus*) diferenciados ($F_{ST} = 0.043$ y 0.057 , respectivamente). Otro estudio que también encontró variaciones entre diferentes poblaciones de esta especie en Argentina, con heterocigosidades de 0.353 a 0.492 fue el realizado por Alberti *et al.* (2002). Más recientemente, Ludeña *et al.* (2010) con secuencias de COI y COII del ADNmt en poblaciones de Colombia, Venezuela, Ecuador, Argentina y Brasil, observaron la monofilia de *A. fraterculus* en poblaciones de los Andes ecuatorianos.

En el caso de *A. suspensa*, la mosca del Caribe, Heath *et al.* (2001), con información del gen ATPasa6mt, encontraron alta variación entre las poblaciones de Florida, lo que coincide con lo reportado por Fritz y Schable (2004), para la misma especie, que usando microsatélites encontraron heterocigosidades de 0.11 a 0.89 entre diferentes regiones de Florida. Éstas variaciones con microsatélites también las encontraron Boykin *et al.* (2010) quienes reportaron heterocigosidades 0.05 a 0.83 entre regiones de Florida, Puerto Rico, Islas Caimán, Republica Dominicana y Jamaica.

Por otro lado, en *Anastrepha obliqua*, la mosca del mango, Sajedul-Islam *et al.* (2011) observaron, mediante análisis de loci de microsatélites, heterocigosidades entre 0.095 y 0.783 en seis poblaciones silvestres provenientes de diferentes localidades de México (Colima, Morelos, Sinaloa, Michoacán, Nayarit y Veracruz). Esta variación también se presentó al analizar ocho loci isoenzimáticos de poblaciones colectadas en localidades de Chiapas (Comitán, Talismán, Tuxtla Chico e Izapa), con heterocigosidad

de 0.18; además, en poblaciones de *A. serpentina* y *A. striata* se presentó heterocigosidad de 0.007 y 0.15, respectivamente (De Teodoro-Pardo, 2011).

4.3. Variación genética de poblaciones naturales en *A. ludens* de México

En México, la gran variación biogeográfica ha influido en la diversidad biológica, proporcionando barreras para la dispersión de muchas especies (Rzedowski, 1991a). En el caso de *A. ludens*, con una distribución que se ha reportado desde México hasta Centroamérica (Birke *et al.*, 2013), además de las condiciones climatológicas a las que están expuestas las poblaciones en las regiones, está la diversidad de frutos hospederos que utiliza en cada región (Aluja, 1993; Aluja *et al.*, 1996; Celedonio *et al.*, 1995; Thomas, 2003; Birke y Aluja, 2011). Por ello, es posible que esas variaciones propicien que distintas poblaciones estén sujetas a presiones de selección que podrían estar dando lugar a la divergencia genética (Aluja *et al.*, 2009).

La especie mexicana de la mosca de la fruta, *A. ludens* tiene escasos reportes relacionados con variación genética poblacional, entre ellos encontramos el realizado por Malavasi *et al.* (1982) quienes encontraron baja H_e (0.046) con isoenzimas. Pecina *et al.* (2009), usando marcadores AFLPs reportan 28% de diferenciación entre poblaciones del noroeste del país (Tamaulipas, Nuevo León y San Luis Potosí), con F_{ST} de 0.058 y H_e que va desde 0.26 a 0.29. También, De Teodoro-Pardo (2011), empleando cuatro loci de sistema enzimático, encuentra diversidad en poblaciones silvestres de Michoacán, Nuevo León, Veracruz y Guatemala, con heterocigosidades de 0.19 a 0.55, y diferenciación genética desde $F_{ST} = 0.03$ a 0.67. Sin embargo, Gálvez-Reyes (2010) usando RFLPs no encontró polimorfismo en el gen COI_{mt} en seis poblaciones de México (Chiapas, Nayarit, Michoacán, Sinaloa, Nuevo León y una cepa de laboratorio).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Se obtuvieron muestras de poblaciones silvestres de *A. ludens* distribuidas en las cinco provincias reconocidas en el esquema biogeográfico de la República Mexicana (Rzedowki, 1978b): Altiplanicie, Planicie Costera del Noreste, Costa Pacífico, Costa Golfo y Soconusco, así como una cepa de cría masiva del Programa Moscafrut reproducida en el laboratorio por 25 años, lo que equivalen a 152 generaciones (Figura 1). Este último, se empleó como grupo de referencia para analizar sus niveles de variación genética y de endogamia relativos a las poblaciones silvestres. Se emplearon diez machos y diez hembras de insectos adultos, los cuales permanecieron en congelación a -32°C hasta su procesamiento (Anexo 1 cuadro 1.1). Los especímenes fueron proporcionados por el Departamento de Colonización y Cría de Moscas de la Fruta de la Subdirección de Desarrollo de Métodos del Programa Moscafrut, en Metápa de Domínguez, Chiapas (México) y el Instituto de Ecología, A. C. (INECOL), Veracruz (México).



Figura 1. Ubicación y distribución de las localidades de colecta de *A. ludens*.

5.2. Extracción de ADN genómico

La extracción y purificación del ADN se realizó empleando el kit DNeasy & Tissue (Quiagen), de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante (Anexo 3.1), modificando el tiempo de lisis celular a 2 h. Cada individuo se colocó en un microtubo (1.5 mL) y se lavó tres veces con 250 µL de etanol al 95%, se eliminaron los residuos de alcohol; posteriormente, el insecto se maceró en nitrógeno líquido, con ayuda de un micropistilo, previamente esterilizado. La integridad, calidad y concentración del ADN se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Anexo 3.2).

5.3. Amplificación y genotipación de microsatélites

Se amplificaron 120 muestras con nueve loci de microsatélites nucleares basados en el análisis de Sajedul-Islam *et al.* (2011). Un oligonucleótido de cada par fue marcado con una molécula fluorescente para estimar el tamaño de los fragmentos (Anexo 1 cuadro 1.2). La amplificación se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Sajedul-Islam *et al.* (2011). El ensayo estandarizado se describe en el anexo 3.3.

Los productos de PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Anexo 3.4). Los productos de PCR con los fragmentos de tamaño esperado se mezclaron para hacer lecturas multiplex, y se enviaron al servicio de análisis de fragmentos del Roy. J. Carver Biotechnology Center de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, EE.UU. Los análisis se realizaron en un secuenciador automático ABI Prisma 3730xl (Applied Biosystems), con un marcador de pares de bases LIZ500. Finalmente, los datos se analizaron para determinar el tamaño de los alelos y cada locus con los programas Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems) y GeneMarker 4.0.

5.4. Amplificación, secuenciación y genotipación del gen COI_{mt}

El gen citocromo oxidasa I mitocondrial (COI_{mt}) de 1300 pb fue amplificado mediante PCR empleando los siguientes oligonucleótidos CI-J-2183 (5'CAACATTTATTTTGATTTTTTGG3') (Sperling y Hickey, 1994) y TL2-N-3014 (5'TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA3') (Simón *et al.*, 1994). La amplificación se realizó de acuerdo al protocolo de Smith-Caldas *et al.* (2001). El protocolo

estandarizado se encuentra en el anexo 3.5. La integridad del gen COInt amplificado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Anexo 3.6). La calidad y presencia de errores en cada secuencia fue verificada mediante el análisis de los cromatogramas con el programa BioEdit 7.1.9 (Hall, 1999).

Las secuencias fueron limitadas en los extremos para evitar la presencia de sitios variables debido a artefactos de secuenciación por la polimerasa (aprox. 40 pb). También se utilizó éste programa para ensamblar las secuencias *forward* y *reverse* de un individuo. Las secuencias de ADN se alinearon con el programa Clustal W 1.4 (Thompson *et al.*, 1994). La construcción del alineamiento múltiple se efectuó con el método de alineamiento progresivo (Hall, 1999). Una vez terminada la alineación se corroboraron los polimorfismos de cada secuencia con el cromatograma correspondiente.

5.5. Estimación de la diversidad genética

5.5.1. Microsatélites. La estimación de la diversidad genética se realizó mediante el porcentaje de polimorfismo (%*P*), el número efectivo de alelos (*A_e*), la heterocigosidad esperada (*H_e*) y la heterocigosidad observada (*H_o*). Estos valores fueron obtenidos con los programas Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010) y GeneAlex 6.41 (Peakall y Smouse, 2006). La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg se estimó dentro de cada población usando el programa Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010) y GenePop 4.0.7 (Rousset, 2008). La estimación de las frecuencias alélicas de cada locus y cada grupo genético se obtuvo mediante el programa GenAlex 6.41 (Peakall y Smouse, 2006). Se identificaron el número total de alelos de cada grupo genético y los alelos privados con el programa GeneAlex 6.41 (Peakall y Smouse, 2006).

En los análisis se utilizaron los coeficientes de endogamia, F_{IS} (Weir y Crockerham, 1984) y pruebas de probabilidad con MCMC. El programa Population 1.2.5 (Langella, 2002) fue empleado para calcular la distancia genética de Nei de las poblaciones, usando 1000 réplicas *bootstrap*. El programa FSTAT 3.9.3 (Goudet, 1995) fue empleado para estimar la riqueza alélica (*A*), con base en el número mínimo de individuos muestreados en un grupo genético y los estadísticos *F*.

5.5.2. *El gen COI_{mt}*. La diversidad genética es una estimación de la variación genética. En este trabajo se calcularon las siguientes medidas de diversidad: número de sitios segregantes (S), número de singletons, número total de mutaciones, número de haplotipos, diversidad haplotípica (hd), diversidad nucleotídica (π) e índice de diversidad (Θ) (Nei, 1987; Watterson, 1975). Los valores de diversidad se obtuvieron con el programa DNA Sequence Polymorphism DnaSP 5.10 (Rozas, 2010), MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011), y Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010). También, se realizó una prueba de Tajima (D) para comprobar el carácter neutral de este marcador. Los estimados de diversidad genética se encuentran descritos en el anexo 4.1.

5.6. Diferenciación y estructura de poblaciones

5.6.1. *Microsatélites*. El análisis de diferenciación genética dentro y entre poblaciones se realizó con AMOVA (Análisis de Varianza Molecular) utilizando los índices de fijación R_{ST} y F_{ST} , con 10,000 permutaciones y una significancia de $p < 0.05$. El valor estimado se obtuvo con el programa Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010), descritos en el anexo 4.2.

La exploración de grupos genéticos se realizó con el método de agrupamiento genético a gran escala, usando las cinco poblaciones silvestres y la cepa de laboratorio, éste último con fines comparativos, ya que, en este análisis el programa no necesita la ubicación geográfica. La estructura de las poblaciones se efectuó con el programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), desarrollado en el anexo 4.3.

5.6.2. *El gen COI_{mt}*. La diferenciación genética es reflejada en las diferencias de la variación de diversidad genética espacial, entre las partes constituyentes dentro de una especie (Futuyma, 2009; Hedrick, 2011). Para ello, se calcularon a partir de las secuencias los índices de diferenciación poblacional como F_{ST} y N_{ST} mediante el programa DnaSP 5.10 (Rozas, 2010) que se indica en el anexo 4.4.

La asignación de grupos genético se realizó con el método de agrupamiento genético a gran escala, usando las cinco poblaciones silvestre con la ubicación geográfica de los alelos de las secuencias. La estructura de la población se asignó con el programa BAPS 6.0 (Corander *et al.*, 2008a; 2008b; Tang *et al.*, 2009).

5.7. Método de aislamiento por distancia

5.7.1. *Microsatélites*. La prueba de Mantel entre la distancia genética de *Nei* y la distancia geográfica fue efectuada con la finalidad de encontrar posible aislamiento por distancia, la cual se realizó con 10,000 permutaciones. El análisis se ejecutó en el programa GenAlex 6.41 (Peakall y Smouse, 2006).

5.7.2. *El gen COI_{mt}*. La prueba de Mantel entre la diferenciación N_{ST} y la distancia geográfica se efectuó con el programa Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010)

5.8. Barreras genéticas con microsatélites

Además, se buscaron posibles barreras genéticas empleando el programa Barrier© 2.2 (Manni *et al.*, 2004) utilizando el algoritmo de Monmonier, con base a las distancias genéticas F_{ST} linealizadas de Slatkin generadas en Arlequín 3.5.1.3.

5.9. Flujo genético entre poblaciones

5.9.1. *Microsatélites*. El grado de conexión entre las poblaciones depende de la cantidad de flujo genético existente entre ellas. La inferencia de la tasa de migración entre los grupos genéticos de *A. ludens* se realizó mediante el programa Migrate-N 3.2.6 (Beerli y Felsenstein 1999, 2001; Beerli, 2006), método desarrollado en el anexo 4.5.

5.9.2. *El gen COI_{mt}*. El análisis para conocer el flujo genético entre los grupos de *A. ludens* se realizó mediante los índices de diferenciación poblacional como F_{ST} y N_{ST} con el programa DnaSP 5.10 (Rozas, 2010).

5.10. Redes haplotípicas con el gen COI_{mt}

La red de haplotipos representan las relaciones genealógicas entre alelos o haplotipos a nivel poblacional. En este trabajo, las redes se elaboraron con los programas TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) y Network 4.6.1.1 (Bandelt *et al.*, 1999; Polzin *et al.*, 2012), que se encuentran descritos en el anexo 4.6.

5.11. Filogenia molecular con el gen COI_{mt}

En este análisis se incluyeron siete haplotipos de *A. ludens* y cinco haplotipos encontrados en el GeneBank. Los grupos externos fueron seis individuos del grupo de *Anastrepha* spp. y dos individuos de *Drosophila* spp. La filogenia del grupo se reconstruyó bajo distintos métodos de búsqueda: *Máxima Parsimonia*, *Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana*, cuyos métodos se incluyen en el anexo 4.7.

5.12. Demografía histórica con el gen COI_{mt}

5.12.1. *La D de Tajima y F_s de Fu*. Las pruebas de neutralidad ponen a prueba la hipótesis de que todas las mutaciones son selectivamente neutrales (Kimura, 1983). Para conocer eventos demográficos antiguos, como cuellos de botellas y expansiones demográficas, se calcularon la *D* de Tajima (1989) con el programa DnaSP 5.10 (Rozas, 2010), y la *F_s* de Fu (Fu, 1997) con Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010), los análisis se encuentran descritos en el anexo 4.8.

5.12.2. *Distribuciones mismatch*. La prueba de *mismatch* se hizo para comparar lo anterior, con la prueba de expansión poblacional espacial por población y tomando a las poblaciones como un sólo grupo. El análisis se basa en un modelo de estructura poblacional paso a paso (Excoffier, 2004). Los parámetros demográficos determinados fueron τ : escala de tiempo mutacional considerado en el tiempo de expansión, θ : índice de diversidad antes y después de la expansión y *M*: el número de migrantes por generación (Excoffier *et al.*, 2010), los métodos están en el anexo 4.8.

5.12.3. *Skyline Plot*. Con coalescencia es posible conocer la historia demográfica y evolutiva de las poblaciones. El tamaño poblacional se determinó considerando un modelo de crecimiento exponencial constante con un reloj molecular relajado. Se calculó el *Skyline Plot* generalizado para estimar el tamaño poblacional de *A. ludens* a lo largo del tiempo. El método convierte la tasa de eventos coalescentes de secuencias homólogas en un diagrama que gráfica el tamaño efectivo poblacional, respecto al tiempo (Pybus *et al.*, 2000). El *N_e* y el TMRCA se calcularon utilizando el programa Beast 1.6.2 (Drummond *et al.*, 2007). Las instrucciones del programa se encuentran en el anexo 4.8.

VI. RESULTADOS

6.1. Diversidad genética en poblaciones de *Anastrepha ludens*

En las poblaciones de *A. ludens* estudiadas de cinco zonas biogeográficas de México se encontraron genotipos multilocus con un total de 42 alelos con los microsatélites y siete haplotipos con el gen COInt (803pb), 35 para las poblaciones silvestres y nueve para la de laboratorio (Anexo 1 cuadro 1.9). Las poblaciones que presentaron mayor proporción de alelos fueron Soconusco (29) y Altiplanicie (27).

6.1.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg con microsatélites. La prueba global de equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) en las poblaciones silvestres de *A. ludens* mostró exceso de homocigotos en los nueve loci aunque en seis de ellos la desviación del equilibrio de H-W fue significativa (Anob-01, Anob-02, Anon-03, Anon-06, Anon-15, Anon-11; cuadro 1). Los individuos de laboratorio mostraron el mismo patrón (Cuadro 1). Desde la perspectiva de población, la Costa Pacifico mostró exceso de homocigotos aunque la mayoría de los loci no presentan desequilibrio significativo (Anexo 1 cuadro 1.5). Por su parte en la población Costa Golfo se encontró deficiencia de heterocigotos en la mayoría de los loci que los desviaron del equilibrio; sin embargo hubo dos loci monomórficos (Anexo 1 cuadro 1.6). La combinación de loci y las poblaciones que no estuvieron en equilibrio de H-W no se concentraron en un solo locus o en una sola población (Anexo 1 cuadros 1.3-1.8).

El exceso de homocigotos fue reafirmado al encontrar valores positivos y significativos del F_{IS} (desde 0.150 hasta 0.598). Además, la F_{IS} promedio de los loci sobre todas las poblaciones fue de 0.261. Las poblaciones Planicie Costera del Noreste y Altiplanicie presentaron deficiencias significativas de heterocigotos ($F_{IS} = 0.150$, $p < 0.05$; $F_{IS} = 0.598$, $p < 0.05$, respectivamente; cuadro 2).

Cuadro 1. Prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg, Heterocigosis observada y esperada en poblaciones silvestres y cepa de laboratorio de *A. ludens* de México, a partir de nueve loci de microsatélites.

Locus	Silvestre			Silvestre y laboratorio		
	Ho	He		Ho	He	
<i>Anob-01</i>	0.330	0.611	< 0.0001	0.375	0.599	< 0.0001
<i>Anob-02</i>	0.200	0.266	< 0.0001	0.233	0.288	< 0.0001
<i>Anob-03</i>	0.380	0.497	< 0.0252	0.317	0.491	< 0.0002
<i>Anob-13</i>	0.060	0.0581	1.0000	0.058	0.057	1.0000
<i>Anob-06</i>	0.290	0.532	< 0.0001	0.292	0.526	< 0.0001
<i>Anob-15</i>	0.290	0.583	< 0.0001	0.258	0.601	< 0.0001
<i>Anob-08</i>	0.050	0.049	1.0000	0.042	0.041	1.0000
<i>Anob-11</i>	0.470	0.796	< 0.0001	0.467	0.775	< 0.0001
<i>Anob-18</i>	0.020	0.019	1.0000	0.017	0.017	1.0000

6.1.2. *Alelos privados y polimorfismo.* En cada población genética se encontró cierta cantidad de alelos privados (11 alelos en total). Las poblaciones Soconusco (3) y Costa Golfo (3) fueron las que presentaron la mayor proporción de alelos privados (Anexo 1 cuadro 1.9). Estos mostraron polimorfismo entre 66.7 a 100%; mientras que el polimorfismo promedio fue 83.33% (Cuadro 2). El mayor porcentaje de polimorfismo se presentó en la población del Soconusco (100%), seguido de la Altiplanicie (88.89%) y Costa Pacífico (88.89%). La población con menor polimorfismo fue la Planicie Costera del Noreste (66.67%). Los individuos de laboratorio presentaron 77.8% de polimorfismo.

6.1.3. *Número efectivo de alelos y riqueza alélica.* El número efectivo de alelos (A_e) en la población silvestre varió de 1.79 a 2.05, mientras el valor promedio fue 1.89. El mayor número se presentó en la población Altiplanicie y menor para la Costa Golfo. La cepa de laboratorio mostró un valor de 1.67. La riqueza alélica total por población fue 2.79 y por locus 3.23 (Cuadro 2 y Anexo 1 cuadro 1.9). La población Soconusco tuvo la mayor riqueza alélica ($A = 3.22$), mientras que la menor fue en la población de la Planicie Costera del Noreste (2.56). Los individuos de laboratorio presentaron 2.11, siendo menor en comparación a las poblaciones silvestres.

6.1.4. *Índice de Shannon, heterocigosidad y diversidad genética de Nei.* El índice de diversidad de Shannon (I) tuvo una media de 0.620, siendo mayor para la población Planicie Costera del Noreste con 0.610 y menor para la Costa Golfo con 0.82; mientras que la cepa de laboratorio presentó un índice de 0.511. La heterocigosidad observada

(H_o) en la población total mostró un promedio de 0.229 (Cuadro 3). La Planicie Costera del Noreste presentó el mayor valor con 0.311, mientras que el menor valor se obtuvo en la población Altiplanicie con 0.144. Los individuos de laboratorio presentaron una H_o de 0.211. La diversidad genética de Nei (H_e) en la población total tuvo una media de 0.365. La población más diversa fue la Costa Golfo con 0.391, mientras que la que presentó menor diversidad fue la población Altiplanicie con 0.354. La población laboratorio mostró una H_e de 0.337. La población con mayor diversidad genética fue la Costa Golfo y Soconusco, y la menos diversa fue la Altiplanicie y la cepa de laboratorio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diversidad genética en poblaciones de *A. ludens* de México, a partir de nueve loci de microsatélites con $N = 20$.

Poblaciones	Ae^b	A^c	I^d	Ho^e	He^f	F_{IS}^g	%P^h
Altiplanicie	1.791	3	0.620	0.144	0.354	0.598*	88.89
EE	0.256	0.471	0.156	0.041	0.088	0.125	
Plan. Cos. Nor	1.929	2.556	0.610	0.311	0.365	0.150*	66.67
EE	0.353	0.556	0.183	0.097	0.097	0.089	
Costa Pacífico	1.987	2.889	0.637	0.256	0.363	0.300*	88.89
EE	0.423	0.696	0.191	0.063	0.095	0.109	
Costa Golfo	2.050	3.0	0.682	0.200	0.391	0.494*	77.78
EE	0.393	0.577	0.186	0.067	0.098	0.119	
Soconusco	1.906	3.222	0.657	0.250	0.381	0.350*	100.00
EE	0.298	0.683	0.170	0.057	0.089	0.080	
laboratorio	1.670	2.111	0.511	0.211	0.337	0.380*	77.78
EE	0.194	0.309	0.131	0.077	0.082	0.157	
Total	1.889	2.796	0.620	0.229	0.365	0.261	83.33
EE	0.129	0.225	0.067	0.027	0.036	0.047	4.76

^aNúmero de individuos; ^bNúmero efectivo de alelos; ^cRiqueza Alélica; ^dÍndice Informativo de Shannon; ^eHeterocigosidad observada; ^fHeterocigosidad esperada; ^gÍndice de consanguinidad; ^hPorcentaje de Polimorfismo; EE: error estándar. * $p < 0.05$.

6.1.5. *Haplotipos, sitios segregantes, singletons y mutaciones.* Se identificaron un total de siete haplotipos, con 14 sitios segregantes (S), seis singletons, y 14 mutaciones (Cuadro 3). En el alineamiento múltiple del gen COImt no se encontraron *indels*. La población Costa Golfo fue monomórfica (*i.e.*, con una diversidad haplotípica de cero), mientras que el resto fueron polimórficas. Las poblaciones con mayor número de haplotipos fueron Soconusco y laboratorio (Tres en total y uno compartido). La frecuencia y distribución de los siete haplotipos se muestra en el Cuadro 5. Se puede observar que los H1 y H6 se comparten entre poblaciones y que el H1 fue el más abundante.

6.1.6. *Diversidad haplotípica y nucleotídica, y estimador de Waterson.* El índice de diversidad haplotípica (hd) fue 0.1594. La diversidad nucleotídica y el estimador de Waterson fueron $\pi = 0.0008$ y $\theta_w = 0.0033$, respectivamente (Cuadro 3). La mayor hd se presentó en la población Soconusco (0.426) y las poblaciones de menor diversidad fueron Altiplanicie, Planicie Costera del Noreste y Costa Pacífico con hd de 0.100. La diversidad nucleotídica (π) total fue 0.0008, con un orden de magnitud menor que el estimador de Waterson (θ_w) de 0.0033 (Cuadro 3). Sin embargo, ésta no refleja la diversidad de las poblaciones, ya que, existe una población monomórfica con valor π de cero. La Planicie Costera del Noreste presentó un valor π de 0.0001 y el Soconusco de 0.0025, con un orden de magnitud mayor que el valor θ_w de 0.0008. Además, se presentaron 14 sitios variables, de los cuales los caracteres parsimoniosamente informativos fueron ocho. El promedio de la frecuencia de los nucleótidos, el número total de transiciones/transversiones y los sitios sinónimos se representan en el cuadro 4.

Cuadro 3. Diversidad y diferenciación genética de poblaciones de *A. ludens* de México del gen COImt. ALT: Altiplanicie, PCN: Planicie Costera del Noreste, CP: Costa Pacífico, CG: Costa Golfo, SOC: Soconusco, LAB: laboratorio.

	N ^a	S ^b	Mutaciones	Sg ^c	h ^d	hd ^e	π ^f	θ -W ^g
ALT	20	5	5	1	2	0.100	0.0006	0.0018
PCN	20	1	1		2	0.100	0.0001	0.0004
CP	20	7	7	4	2	0.100	0.0009	0.0025
CG	20	0	0		1	0.0	0.0	0.0
SOC	20	8	8		3	0.426	0.0025	0.0028
LAB	20	4	4	1	3	0.1947	0.0005	0.0014
Total	120	14	14	6	7	0.1594	0.0008	0.0033

^aNúmero de secuencias; ^bSitios segregantes, ^cSingletons; ^dNúmero de haplotipos; ^ediversidad haplotípica; ^fDiversidad nucleotídica; ^gEstimador teta de Waterson.

Cuadro 4. Estadísticos de las secuencias del gen COImt de las poblaciones de *A. ludens*

<i>Anastrepha ludens</i> : COImt	Valor
	T 35.9
% de composición nucleotídica	C 17.3
	A 32.9
	G 13.9
No. de sitios variables	14
No. de sitios parsimoniosamente informativos	8
Total de transiciones	13
Total de transversiones	1
Transiciones/Transversiones	13
Sitio sinónimo	0.00317
Sitio no sinónimo	0.00003

Cuadro 5. Los Polimorfismo nucleotídico en haplotipos del Gen COInt y el número de cada haplotipo observado dentro de las poblaciones de *A. ludens*. El símbolos de las poblaciones se señalan en el cuadro 3. El tamaño de la muestra fue 20

Haplotipo	Secuencia													Población						
	1	2	2	3	3	3	4	4	4	4	4	5	6	7	ALT	PCN	CP	CG	SOC	LAB
	5	5	8	0	4	7	0	5	5	8	8	0	0	5						
	0	5	9	3	2	8	5	0	6	0	6	2	6	3						
H1	A	A	C	G	G	C	C	A	C	G	C	C	G	A	19	19	19	20	15	18
H2	G	T	.	A	T	.	T	.	.	.	1					
H3	T		1				
H4	.	.	T	A	A	T	.	.	T	A	.	.	A	.			1			
H5	.	.	.	A	A	.	.	G	T	.	T	T	.	G					2	
H6	.	T	.	A	T					3	1
H7	T						1

6.2. Diferenciación de las poblaciones de *A. ludens*

6.2.1. Diferenciación genética por F_{ST} y R_{ST} , y AMOVA con microsatélites. Los valores positivos de F_{IS} son indicativos de deficiencia de heterocigotos para todos los loci. El rango de dicho parámetros fue de 0.150 a 0.598 (Cuadro 2). El intervalo de valores para F_{ST} fue de -0.001 a 0.109, lo que indica que en todos los loci las frecuencias alélicas son diferentes; sin embargo, el número negativo representa que la población es un subconjunto de otras. Los valores de R_{ST} pareados fueron de -0.0005 a 0.191; pero los valores negativos no fueron significativos (Cuadro 6). Por lo tanto, los valores de diferenciación de F_{ST} y R_{ST} estableciendo valores de estructuración genética baja ($F_{ST}<0.05$), moderada ($0.1>F_{ST}>0.05$, y $R_{ST}<0.4$) y alta ($F_{ST}>0.10$, y $R_{ST}>0.4$). De acuerdo a ésta clasificación, se observó un patrón de diferenciación de baja a moderada. La diferenciación baja se presentó en poblaciones Planicie Costera del Noreste y Costa Golfo ($F_{ST} = -0.001$; $p>0.05$), la Altiplanicie y el Soconusco ($F_{ST} = 0.047$; $p<0.05$), y también entre la población de la Planicie Costera del Noreste y Costa Pacífico ($F_{ST} = 0.048$; $p<0.05$); mientras que, entre las poblaciones de la Costa Pacífico y Soconusco hubo diferenciación moderada ($F_{ST} = 0.065$; $p<0.05$) y para la población Soconusco y laboratorio fue alta (0.109; $p<0.05$).

La mayoría de las poblaciones no coincidieron con la diferenciación de R_{ST} , éstas presentaron diferenciación desde baja a moderada. La población con

diferenciación baja fue Costa Pacífico y laboratorio ($R_{ST} = -0.0005$; $p > 0.05$), Planicie Costera del Noreste y Costa Golfo ($R_{ST} = -0.007$; $p > 0.05$), y Costa Golfo con Altiplanicie ($R_{ST} = 0.033$; $p > 0.05$). Las poblaciones que tienen diferenciación moderada fueron la Altiplanicie y Planicie Costera del Noreste ($R_{ST} = 0.104$; $p < 0.05$), Altiplanicie y Soconusco ($R_{ST} = 0.156$; $p < 0.05$), Planicie Costera del Noreste y Costa Pacífico ($R_{ST} = 0.145$; $p < 0.05$), Soconusco y laboratorio ($R_{ST} = 0.154$; $p < 0.05$), y Costa Pacífico con Soconusco ($R_{ST} = 0.191$; $p < 0.05$), aunque éstas dos últimas coincidieron con el análisis anterior de F_{ST} .

El análisis de varianza molecular (AMOVA) de las poblaciones silvestres basados en los valores de R_{ST} , indicó que la mayor proporción de variación genética total se encontró dentro de las poblaciones (71.63%). La variación genética entre individuos fue de 21.20%; sin embargo, sólo se encontró 7.18% de variación genética entre poblaciones y ésta fue significativa (Cuadro 7). El índice de diferenciación R_{ST} tuvo un valor de 0.072 ($p < 0.05$), indicando diferenciación moderada entre las poblaciones silvestres. Los índices de fijación F_{IS} y F_{IT} fueron positivos y estadísticamente significativos. Lo que indica que existe un déficit de heterocigotos de los individuos con respecto al total y a las subpoblaciones (Cuadro 7).

Los valores calculados con el AMOVA a partir de F_{ST} mostraron el mismo patrón que los valores anteriores de R_{ST} . La variación genética en los individuos fue de 60.91%; mientras que, la variación entre individuos dentro de las poblaciones fue 37.25%, y entre poblaciones de 1.85% (Cuadro 8). El índice de diferenciación F_{ST} tuvo un valor de 0.019 ($p < 0.05$), indicando diferenciación moderada entre las poblaciones silvestres (Cuadro 8). Los índices de fijación F_{IS} y F_{IT} fueron positivos, lo que indica un déficit de heterocigotos de los individuos con respecto al total y a las subpoblaciones (Cuadro 8).

El análisis de variación genética de las poblaciones silvestres y la cepa de laboratorio tuvo un índice de diferenciación R_{ST} con valor de 0.066 ($p < 0.05$), indicando diferenciación moderada entre poblaciones. Los índices de fijación F_{IS} (0.318) y F_{IT} (0.363) fueron positivos, lo que muestra que existe un exceso de homocigotos dentro de los individuos con respecto al total (Anexo 1 cuadro 1.10); sin embargo, cuando los valores de las poblaciones silvestres y de laboratorio se sometieron al análisis de

AMOVA a partir de F_{ST} , el índice de diferenciación F_{ST} tuvo un valor de 0.030 ($p < 0.05$), un poco más alto que las poblaciones silvestres ($F_{ST} = 0.019$), representando una diferenciación moderada entre las poblaciones. Los índices de fijación F_{IS} (0.380) y F_{IT} (0.398) fueron positivos, indicando déficit de heterocigotos dentro de los individuos con respecto al total (Anexo 1 cuadro 1.11). Considerando que F_{ST} supone un modelo de alelos infinitos (IAM) y puede estimar eventos más antiguos que los inferidos con R_{ST} , que supone un modelo paso a paso (SMM), el AMOVA mostró que con el paso del tiempo la migración está borrando la huella de estructuración genética entre los grupos de *A. ludens*.

Cuadro 6. Diferenciación genética *A. ludens*, a partir de nueve loci de microsatélites, mediante el método de varianza en los tamaños de los alelos (R_{ST}) bajo la diagonal y el método de número diferente de alelos (F_{ST}) sobre la diagonal con 10,000 permutaciones.

R_{ST}/F_{ST}	ALT	PCN	CP	CG	SOC	LAB
ALT	-	0.030	0.009	0.009	0.047*	0.046*
PCN	0.104*	-	0.048*	-0.001	0.009	0.044*
CP	-0.013	0.145*	-	0.028	0.065*	0.049*
CG	0.033	-0.007	0.066*	-	0.026	0.053*
SOC	0.156*	-0.005	0.191*	0.038	-	0.109*
LAB	-0.008	0.102*	-0.0005	0.035	0.154*	-

* $p < 0.05$. ALT: Altiplanicie, PCN: Planicie Costera del Noreste, CP: Costa Pacífico, CG: Costa Golfo, SOC: Soconusco, LAB: laboratorio.

Cuadro 7. AMOVA e índice de diferenciación de las poblaciones silvestres de *A. ludens* de México, a partir de nueve loci de microsatélites, mediante el método de distancia R_{ST} .

Fuente de Variación	g. l. ^a	S.C. ^b	V.E. ^c	% de variación	Índice de diferenciación	P
Entre poblaciones	4	1527.81	6.84Va	7.18	$R_{ST}^d = 0.072$	0.004
Entre individuos	95	10312.1	20.18Vb	21.20	$F_{IS}^e = 0.228$	0.001
Dentro de los individuos	100	6819.0	68.19Vc	71.63	$F_{IT}^f = 0.284$	0.002
Total	199	18658.9	95.204	100%	-	-

^aGrados de libertad; ^bSuma de cuadrados; ^cComponentes de variación estimada; ^dMedida de diferenciación genética entre poblaciones; ^eMedida de consanguinidad; ^fMedida de variación dentro de los individuos, $p < 0.05$.

Cuadro 8. AMOVA e índice de diferenciación de poblaciones silvestres de *A. ludens* en México, a partir de nueve loci de microsatélites, con el método de distancia F_{ST} .

Fuente de Variación	g.l.^a	S.C.^b	V.E.^c	% de variación	Índice de diferenciación	P
Entre poblaciones	4	14.38	0.032Va	1.85	$F_{ST}^d = 0.019$	0.006
Entre individuos	95	220.67	0.639Vb	37.24	$F_{IS}^e = 0.379$	0.000
Dentro de los individuos	100	104.5	1.045Vc	60.91	$F_{IT}^f = 0.391$	0.000
Total	199	339.55	1.716	100%	-	-

^aGrados de libertad; ^bSuma de cuadrados; ^cComponentes de variación estimada; ^dMedida de diferenciación genética entre poblaciones; ^eMedida de consanguinidad, ^fMedida de variación dentro de los individuos; $p < 0.05$.

6.2.2. *Diferenciación genética por N_{ST} y F_{ST} , y SAMOVA estimado con el gen COI_{mt}*. El análisis de diferenciación genética mostró que las poblaciones de *A. ludens* se encuentran diferenciadas entre ellas con valores que van desde baja a moderada. La estructura genética N_{ST} pareada varió desde -0.00007 a 0.128. Las poblaciones que se encuentran moderadamente diferenciadas son Soconusco y Costa Golfo (0.128), y Soconusco y Planicie Costera del Noreste (0.104), mientras que las poblaciones del Soconusco y Altiplanicie estuvieron menos diferenciadas (0.055). Sin embargo, al realizar las comparaciones pareadas de la población del laboratorio con todas las poblaciones, excepto Soconusco, se observó diferenciación negativa. Esto significa que esta población es un subconjunto de todas las demás. Dicho patrón de diferenciación se presentó con F_{ST} (Cuadro 9).

De acuerdo con el análisis de varianza molecular espacial (SAMOVA), encontramos que el valor de K que maximiza la Φ_{CT} (análogo de F_{ST}) es 2 y forma un grupo conformado por Altiplanicie, Planicie Costera del Noreste, Costa Pacífico, Costa Golfo y otro donde esta sólo Soconusco (Cuadro 10).

El primer grupo conformado por cuatro poblaciones (Altiplanicie, Planicie Costera del Noreste, Costa Pacífico y Costa Golfo) y el grupo formado por la población del Soconusco se sometieron a AMOVA. Así, se obtuvo un valor de Φ_{ST} (0.167) el cual explica muy poco la varianza molecular entre grupos de 19.24% (Cuadro 11). También, se consideró a todas las poblaciones como un sólo grupo y se encontró un valor de Φ_{ST}

de 0.058, con una variación entre poblaciones de 5.83% y dentro de las poblaciones de 94.17% (Cuadro 11).

Cuadro 9. Diferenciación genética por N_{ST} bajo la diagonal y F_{ST} sobre la diagonal calculados a partir del gen COImt en poblaciones de *A. ludens* de México.

	ALT	PCN	CP	CG	SOC	LAB
ALT	-	-0.017	-0.017	0.0	0.055	-0.035
PCN	-0.017	-	-0.013	0.0	0.104*	-0.020
CP	-0.017	-0.013	-	-0.0	0.061	-0.019
CG	0.0	0.0	0.0	-	0.128*	0.0
SOC	0.055	0.104*	0.061	0.128*	-	0.064
LAB	-0.035	-0.021	-0.019	-0.00007	0.064	-

* $p < 0.05$. ALT: Altiplanicie, PCN: Planicie Costera del Noreste, CP: Costa Pacífico, CG: Costa Golfo, SOC: Soconusco, LAB: laboratorio.

Cuadro 10. Valores de K (número de grupos) y Φ_{ST} (Medida de diferenciación genética entre poblaciones) obtenidos del gen COImt con análisis de varianza molecular espacial (SAMOVA). Simbología de los sitios están en el cuadro 9.

K	Φ_{ST}	Grupos
2	0.167	ALT/PCN/CG/CP, y SOC
3	0.095	ALT, PCN/CG, CP, y SOC
4	0.069	ALT, PCN/CG, CP, y SOC

Cuadro 11. AMOVA e Índice de diferenciación de todas las poblaciones silvestres de *A. ludens* y usando los grupos que generó SAMOVA ($K = 2$).

Fuente de Variación	g.l. ^a	S.C. ^b	V.E. ^c	% variación	Índice de diferenciación	p
Entre grupos	1	2.572	0.076Va	19.24	$\Phi_{SC}^d = -0.314$	0.771
Entre poblaciones dentro de grupos	3	0.388	-0.010Vb	-2.54	$\Phi_{ST}^e = 0.167$	0.015
Dentro de poblaciones	95	31.400	0.331Vc	83.30	$\Phi_{CT}^f = 0.192$	0.195
Total	99	34.360	0.397	100%	-	-
Entre poblaciones (total)	4	2.960	0.021Va	5.83	$\Phi_{ST}^e = 0.058$	0.016
Dentro de poblaciones	95	31.400	0.331Vb	94.17		
Total	99	34.360	0.351	100	-	-

^aGrados de libertad; ^bSuma de cuadrados; ^cComponentes de variación estimada; ^dMedida de diferenciación entre grupos; ^eMedida de diferenciación genética entre poblaciones; ^fMedida de variación dentro de los individuos.

6.3. Dendograma de relaciones genéticas

La relación genética de Nei con *Neighbor-Joining* (NJ) realizado con microsatélites reveló que se forman dos grupos, con un soporte del 100% de *bootstrap*. El primero se formó por las poblaciones Costa Golfo, Planicie Costera del Noreste y Soconusco. El segundo grupo está conformado por las poblaciones Altiplanicie y Costa Pacífico. El primer grupo estuvo muy distante del segundo (Figura 2). En este caso, el análisis demuestra que la mayor variación genética está dentro de las poblaciones y no entre las poblaciones; tal como lo revelan los resultados antes mencionados del AMOVA para microsatélites.

El dendograma elaborado con el gen COInt a partir del número de diferencias nucleotídicas. En este caso, el dendograma muestra que las poblaciones genéticamente más cercanas son Altiplanicie (*bootstrap* = 75%) con las demás (Costa Pacífico, Costa Golfo y Planicie Costera del Noreste), salvo la población del Soconusco que se situó como la más distante genéticamente (*bootstrap* = 100%; figura 3). Éste resultado concordó con lo obtenido por SAMOVA que proyectó una *K* de dos (Cuadro 10).

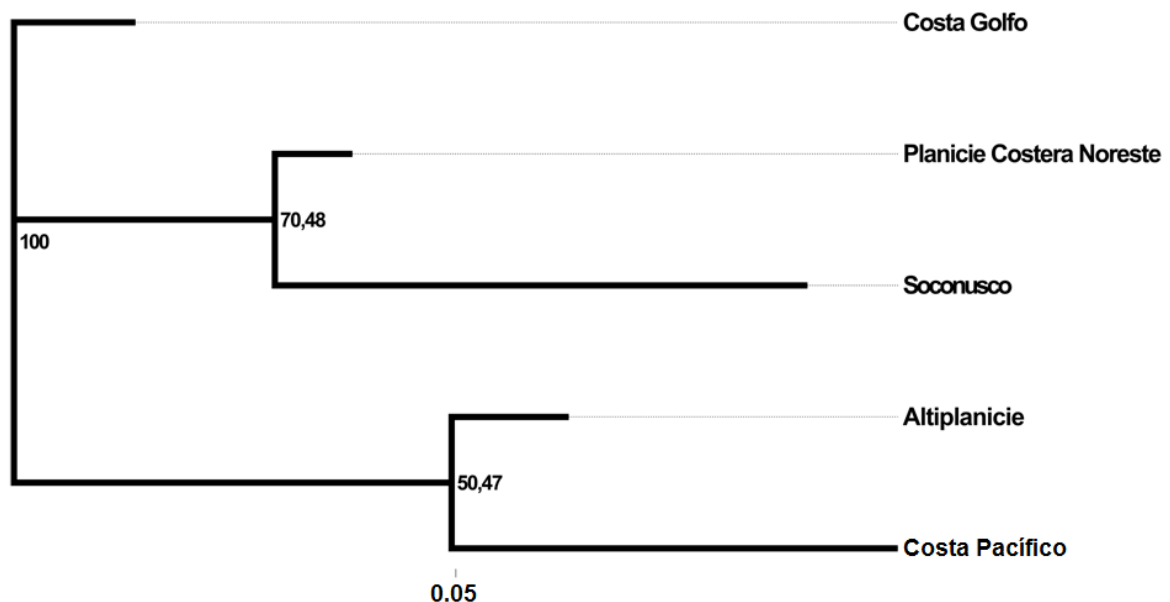


Figura 2. Dendograma de distancia genética de *Nei* con microsatélites elaborado con el algoritmo de *Neighbor-Joining* (N-J), usando el programa population 1.2.32 (Langella, 2002).

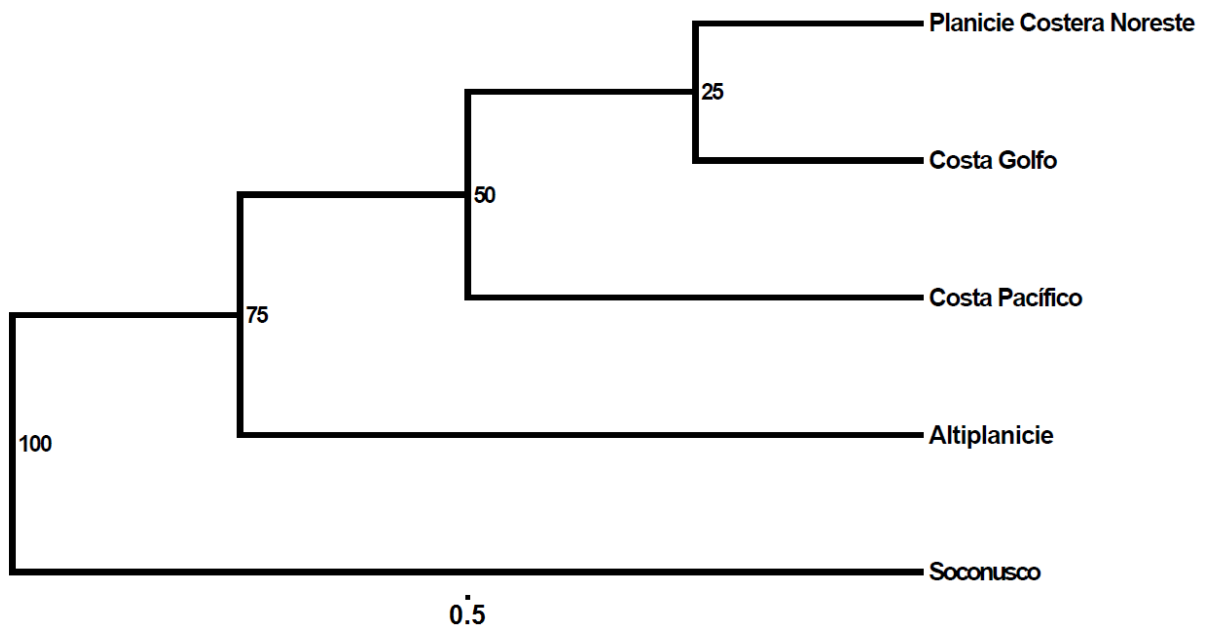


Figura 3. Dendrograma de distancia genética con N_{ST} con el gen COImt, elaborados con Neighborg-Joining (NJ), usando el programa MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011).

6.4. Modelo de aislamiento por distancia

Al encontrarse diferenciación moderada en las poblaciones, se buscó posible aislamiento por distancia con microsatélites, y el resultado de la prueba de Mantel entre la distancia genética de Nei y la distancia geográfica no mostró significancia ($r = 0.275$; $p = 0.097$; Anexo 2 figura 2.1). Del mismo modo, cuando se utilizó la distancia genética con valores de R_{ST} no se encontró significancia ($r = 0.175$; $p = 0.108$; Anexo 2 figura 2.2). La prueba de Mantel con el gen COImt de las distancias genéticas y la distancia geográfica no fue estadísticamente significativa ($r = 0.341$; $p = 0.108$; Anexo 2 figura 2.3).

6.5. Estructura genética

El estudio de estructura genética con microsatélites determinó la existencia de tres poblaciones genéticas $K = 3$ (Anexo 2 figura 2.4); sin embargo, éstas no concuerdan con las poblaciones geográficas declaradas para el estudio, ya que al inicio se propusieron seis poblaciones. La barra vertical representa un individuo con su respectiva proporción de alelos de cada población genética.

La estructura genética de COInt mostró la existencia de dos poblaciones genéticas $K = 2$ (Anexo 2 figura 2.5). Donde cada barra vertical mostrada representa un individuo con su respectiva proporción de alelos de cada población genética. Las poblaciones encontradas no concuerdan con lo hallado con los datos de microsatélites.

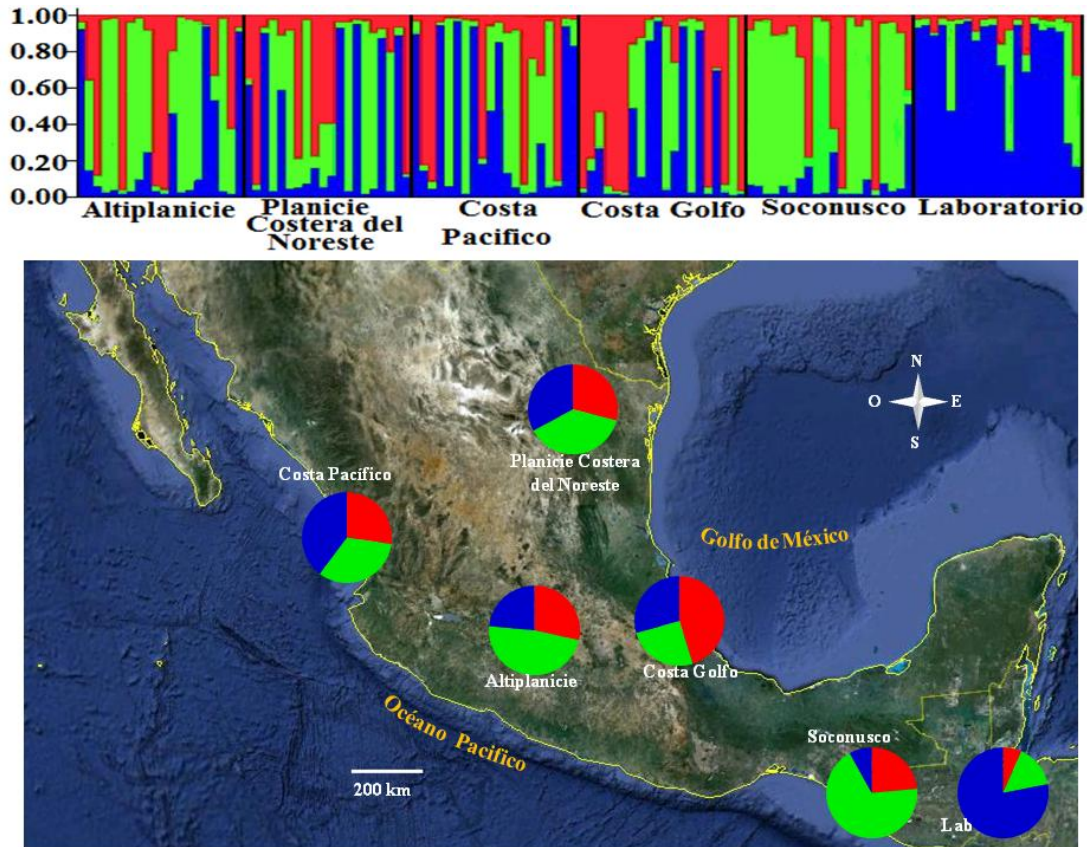


Figura 4. Estructura genética de cinco poblaciones silvestres y una cepa criada en laboratorio de *A. ludens* de México. Modelo de ancestría: *Admixture Model*. Las gráficas de *pie* indican los colores rojo, verde, azul correspondientes a los agrupamientos $K = 3$ del *bar-plot*, 150,000 *burn-in*, 250 000 MCMC, y 25 iteraciones de cada K (K 1-10).

6.6. Barreras genéticas basado en microsatélites

Los hallazgos anteriores nos llevaron a la búsqueda de posibles barreras genéticas. Ésta búsqueda dio como resultado que las poblaciones Costa Pacífico, Altiplanicie y Soconusco se encuentran aisladas del resto. Las principales barreras genéticas fueron tres que están delimitadas por la línea naranja, señaladas con la letra "a", "b" y "c" (Figura 5).



Figura 5. Mapa de cinco poblaciones de *A. ludens* de México, que muestran las tres principales barreras genéticas (a, b y c en líneas naranjas), encontradas con el algoritmo de Monmonier (Barrier© 2.2), basados en las distancias genéticas linealizadas de Slatkin obtenidas con el programa Arlequín 3.5.1.3.

6.7. Flujo genético

6.7.1. *Flujo genético basado en microsatélites.* El modelo de migración con mayor probabilidad en los microsatélites de acuerdo al criterio de AIC (Criterio de información de Akaike), empleando los estimados de Bezier fue el tercero con una $K = 13$ y probabilidad del modelo $\Delta AIC = 0$ mostrado en el cuadro 12. Este modelo incluyó los parámetro del dendrograma de *Neighbor-Joining* de la figura 2, donde se presentan dos grupos; Costa Golfo, Planicie Costera del Noreste y Soconusco y el segundo grupo formado por Altiplanicie y Costa Pacífico. La migración se presentó en ambos sentidos, pero sólo entre grupos vecinos, con un flujo mayor de sur a norte. Este flujo se observó entre las poblaciones de la Costa Golfo, Planicie Costera del Noreste y Soconusco con migración a larga distancia entre las últimas dos poblaciones. La tasa de inmigración

mayor escalada a la tasa de mutación (M) fue de la población Soconusco hacia la Costa Golfo ($M = 14$ individuos/generación), lo mismo para la población Planicie Costera del Noreste hacia la Costa Golfo ($M = 14$ individuos/generación). También se presentó migración entre las poblaciones de Altiplanicie y Costa Pacífico ($M = 10$ individuos/generación), pero no existe migración de las tres primeras poblaciones hacia las dos últimas, o viceversa, los estimados de Nm indican que, es poco factible dicho flujo (Cuadro 13). Esto ocurre posiblemente por la barrera geográfica generada por la Sierra Madre Occidental y Oriental (Cuadro 13, Figura 6). Sin embargo, en las poblaciones de *A. ludens* donde $M > 1$ es posible que la migración (y no la mutación) sea el principal factor que contribuya a la variación genética en estas poblaciones.

Cuadro 12. Modelos de migración entre las poblaciones de *A. ludens* en México y su probabilidad de AIC, usando microsátélites. AIC: Criterio de información de Akaike

Modelo de migración	Bezier LH	Media armónica HL	K	AIC	(AICmin-AICi)	Probabilidad del modelo (Bezier)
Desde y hacia todos los grupos (todos los parámetros)	-340882.47	29.52	25	681814.94	445602.22	0
Parámetros de barreras del programa <i>Barrier</i>	-149018.66	-502.75	11	298059.32	61846.6	0
Parámetros del dendograma <i>Neighbor-joining</i>	-118093.36	-727.56	13	236212.72	0	1

Cuadro 13. Número efectivo de inmigrantes por generación (Nm) para los datos de microsátélites. Los valores se calcularon para el modelo de migración más probable. En negrita cursiva, las poblaciones con Nm significativo ($Nm > 1$). En gris, las poblaciones con Nm no significativo en los modelos de mutación probados (valores no mostrados). En diagonal se encuentran los valores del N_e escalados a la tasa de mutación (θ). La tasa de inmigración está escalada a la tasa de mutación (M).

		DESTINO				
		1	2	3	4	5
O R I G E N	1. Altiplanicie	$\theta=0.90238$	0	$M=10.74$	0	0
	2. Planicie Costera del Noreste	0	$\theta=0.98350$	0	$M=14.07$	$M=6.84$
	3. Costa Pacifica	$M=9.76$	0	$\theta=0.95519$	0	0
	4. Costa Golfo	0	$M=5.87$	0	$\theta=1.07390$	$M=7.24$
	5. Soconusco	0	$M=9.93$	0	$M=13.88$	$\theta=1.07398$



Figura 6. Conexión genética entre poblaciones de *A. ludens* de México. Las flechas de color representan el flujo génico y el número efectivo de migrantes en una generación estimado con los datos de microsatélites.

6.7.2. *Flujo genético basado en el gen COImt*. El número de migrantes (Nm) entre las poblaciones de *A. ludens* es considerable, pero se encuentran moderadamente diferenciadas. Los valores de diferenciación encontrados se tradujeron en valores de número de migrantes (Nm) muy dispares siendo infinito para valores de N_{ST} o F_{ST} igual a 0 y nulo para valores cercanos 1. El valor de estructuración genética para N_{ST} fue 0.04750, con niveles de flujo genético (Nm) de 10.03. En el caso de F_{ST} fue 0.04749, con niveles de flujo genético (Nm) de 10.03.

6.8. Filogenia molecular obtenida con el gen COImt

El modelo evolutivo que mejor se ajustó a la variación de la región COImt en *A. ludens* fue el modelo *GTR+IG*, con las siguientes frecuencias, A = 3065, C=0.1605, G = 0.1607 y T = 0.3724; con $\lambda = 0.3980$. Este modelo se utilizó para la reconstrucción filogenética con el algoritmo *Neighbor-Joining*, máxima verosimilitud (*ML*) y de interferencia

Bayesiana. Todos los árboles mostraron un patrón similar (Anexo 2 figuras 2.6). En los filogramas los haplotipos se agrupan como un sólo grupo (Figura 7). Además, se puede observar que el grupo *A. ludens* parece ser monofilético del grupo hermano con un soporte de probabilidad posterior de 0.78 y que la especie más cercanamente relacionada fue *A. fraterculus*.

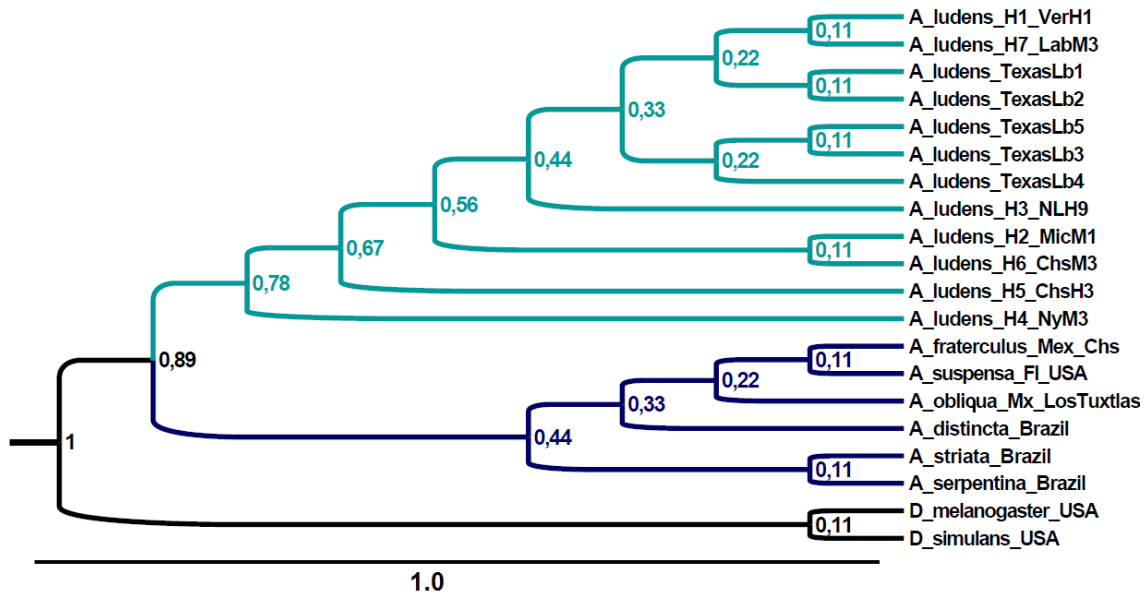


Figura 7. Árbol de interferencia Bayesiana construido a partir de siete haplotipos obtenidos del gen COI_{mt}, de cinco poblaciones silvestres y una cepa de laboratorio de *A. ludens* de México. Cada nodo muestra el valor obtenido de probabilidad posterior (*Bootstrap*).

6.9. Análisis filogeográfico obtenido con el gen COI_{mt}

Dos redes de haplotipos fueron construidas a partir del criterio de máxima verosimilitud (Figura 8A) y parsimonia (Figura 8B). El grupo externo (*A. fraterculus*) mostró mayor parentesco con la población de la Costa Pacífico. En las redes muestra una clara agrupación de haplotipos de las poblaciones de *A. ludens*. En ella se observa la presencia de un primer grupo (H1), conformados por secuencias de distintas poblaciones; y un segundo grupo (H6) que se forma de secuencias de dos poblaciones. En todas las poblaciones se encontraron haplotipos conectados en su mayoría por pasos mutacionales sencillos, aunque existen algunos que se encuentran conectados por cinco o seis pasos. Las redes haplotípicas obtenidas para las poblaciones mostraron topologías similares. La base general presenta un haplotipo común, del cual radia una serie de haplotipos intermedios y únicos (Figura 8A). El mayor número de pasos mutacionales

se presentó entre el grupo H1 y la población del Soconusco (H5) con $n = 10$ pasos; comparado con la separación de la población Costa Pacífico (H4) de $n = 9$ pasos mutacionales, y respecto a la separación de la población Altiplanicie (H2) con $n = 9$.

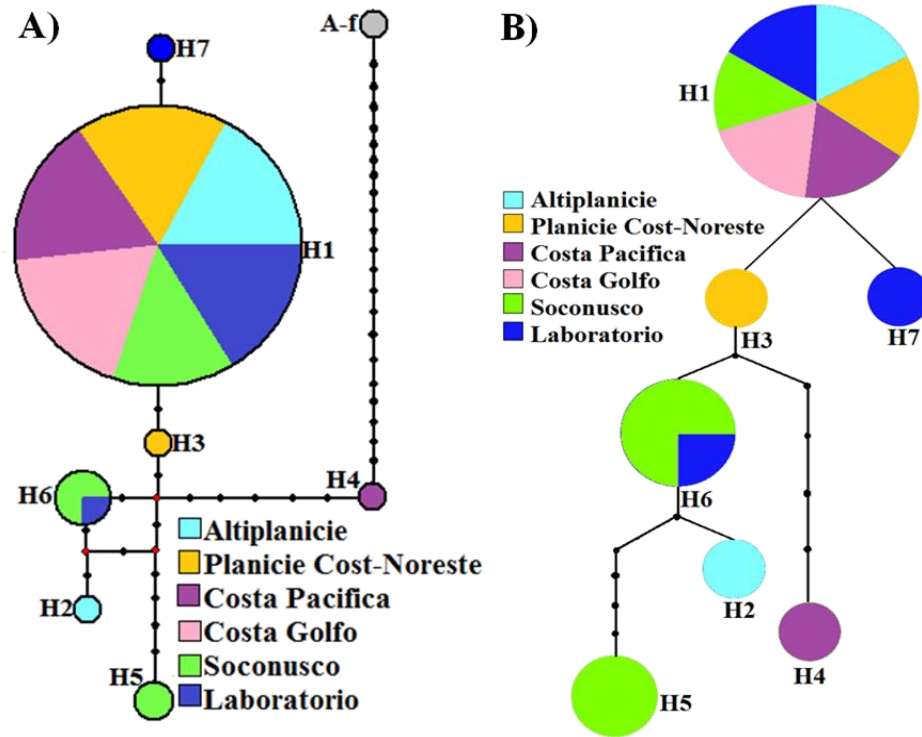


Figura 8. Redes de haplotipos construidas a partir del gen COI_{mt} para *A. ludens*. De acuerdo criterios de máxima verosimilitud (A) y parsimonia (B). El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Los colores indican las regiones donde se localizan los haplotipos. El haplotipo A-f (gris) pertenece a *A. fraterculus* (grupo externo). Los círculos rojos muestran haplotipos no muestreados o ancestrales.

6.10. Demografía histórica a partir del gen COI_{mt}

6.10.1. Prueba de neutralidad. La prueba de neutralidad D de Tajima presentó valores negativos ($p < 0.05$) para todas las poblaciones y cada una de ellas (Cuadro 14). Los valores negativos se presentan cuando han experimentado una expansión rápida en su rango de distribución (Tajima, 1989). Los valores de F_S de Fu concuerdan con los valores negativos de D de Tajima, para las mismas poblaciones ($p < 0.02$), indicando también que las poblaciones se han expandido (Excoffier *et al.*, 2005), mientras que las poblaciones de la Planicie Costera del Noreste, Costa Golfo y Soconusco presentaron valores negativos no significativos ($p > 0.02$) (Cuadro 14), sugiriendo que estas poblaciones se encuentran en equilibrio demográfico. La prueba F_S de Fu produjo un

valor positivo de 0.988 no significativo, aunque en la población Planicie Costera del Noreste se encontró un valor negativo, pero no fue significativo ($F_S = -1.648$).

Los valores de expansión poblacional espacial obtenido para el total de las poblaciones fueron: tiempo de expansión, $\tau = 4.351$; valores de diversidad por sitio antes y después de la expansión, $\theta = 0.032$; y el número de migrantes entre poblaciones, $M = 0.159$. Los valores de expansión poblacional espacial obtenido para cada una de las poblaciones que fueron significativas en la prueba D de Tajima y F de Fu son Altiplanicie: $\tau = 5.626$, $\theta = 0.001$ y $M = 0.123$; Costa Pacífica: $\tau = 7.712$, $\theta = 0.001$ y $M = 0.133$; y laboratorio: $\tau = 3.001$, $\theta = 0.103$ y $M = 0.156$ (Cuadro 14).

Cuadro 14. Prueba de neutralidad basado en el gen COImt entre poblaciones de *A. ludens*. Parámetros de expansión poblacional: tiempo de expansión (τ), valores de diversidad por sitios antes y después de expansión (θ) y número de migrantes entre poblaciones (M). ALT: Altiplanicie, PCN: Planicie Costera del Noreste, CP: Costa Pacífico, CG: Costa Golfo, SOC: Soconusco, LAB: laboratorio.

Prueba	Total	ALT	PCN	CP	CG	SOC	LAB
D Tajima ^a	-2.012*	-1.974*	-1.164	-2.121*	0.0	-0.373	-1.868*
F de Fu ^b	-2.373**	-2.974**	-1.648	-3.247**	0.0	0.988	-2.784**
D de Fu ^b	-1.975	-2.812**	-1.540	-3.081**	0.0	1.342	-2.627**
θ	0.032	0.001	0.093	0.001	0.0	0.001	0.103
M	0.159	0.123	0.425	0.122	0.0	0.758	0.156
τ	4.351	5.626	0.133	7.712	0.0	4.350	3.001

^aTajima, ^bFu y Li. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$.

6.10.2. *Distribución “mismatch”*. La distribución de “mismatch” para la población Planicie Costera del Noreste parece acercarse a una distribución unimodal, que corresponde a una diferencia pareada con cresta en cero, características de las poblaciones que han sufrido una expansión rápida y reciente. Las poblaciones Altiplanicie, Costa Pacífico y laboratorio tienen una distribución de “mismatches” bimodal. La población Soconusco y laboratorio tienen una cresta en tres, indicando que ambos sufrieron el mismo evento de expansión poblacional. De igual manera, se observa una cresta en siete entre las poblaciones del Soconusco y Costa Pacífica. Por otra parte, sólo la población Altiplanicie tiene una cresta en cinco, característico de las poblaciones que muestran tamaño poblacional constante. La población Soconusco tiene distribución “mismatch” multimodal con crestas en cero, cuatro y siete diferencias

pareadas; indicando eventos de expansión en estos puntos, y siendo esta última la única población estadísticamente significativa.

En conjunto las poblaciones de *A. ludens* mostraron una distribución multimodal con crestas en cero, tres, cinco y siete diferencias pareadas, con puntos de expansión. También se encontraron varios valles profundos en dos, cuatro y seis diferencias pareadas (Figura 9); sin embargo, la suma de los cuadrados no resultaron significativas en ninguna de las pruebas, por lo que la distribución “*mismatch*” encontrada no se ajustó al modelo de expansión poblacional sugerido por los análisis anteriores (*D* de Tajima, *F* de Fu y *D* de Fu). Por lo tanto, las poblaciones de *A. ludens* posiblemente se encuentran en equilibrio demográfico.

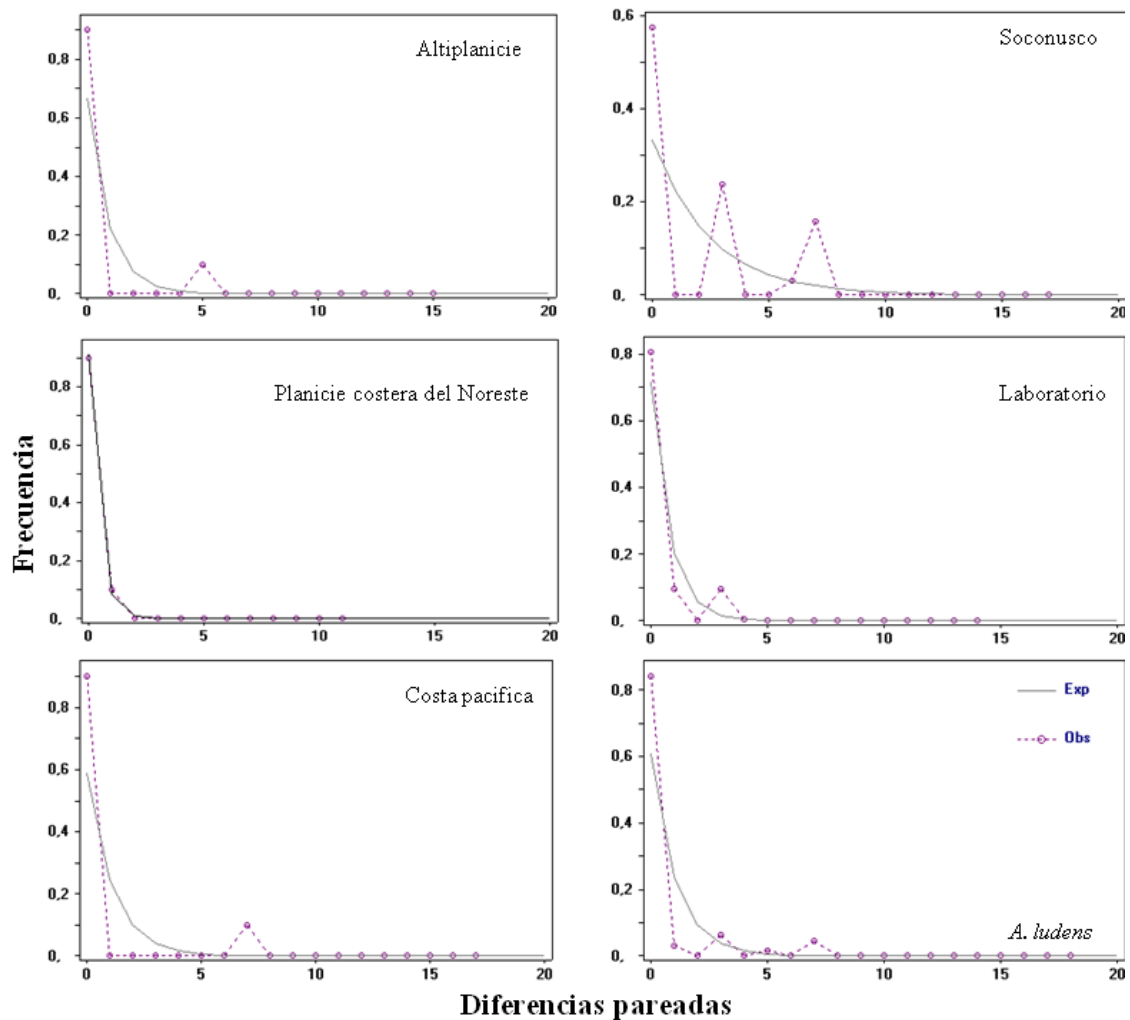


Figura 9. Distribuciones “*mismatch*” para las poblaciones de *A. ludens* obtenidas con el programa Arlequín 3.5.1.3. Exp-línea sólida: Distribuciones esperadas bajo un crecimiento demográfico exponencial; Obs-línea punteada: Distribuciones observadas.

6.10.3. *Tamaño de la población.* Se encontró que el tamaño efectivo poblacional de *A. ludens* silvestre se ha mantenido constante a lo largo del tiempo hasta hace 100 años (Figura 10 A-B). Esto respalda los análisis de las distribuciones “*mismatch*” y la prueba de neutralidad de Tajima para la mayoría de las poblaciones que muestran señal de equilibrio demográfico. Sin embargo, en los últimos 100 años ha disminuido (Figura 10A). La media estimada del TMRCA para todas las poblaciones silvestres de *A. ludens* es de casi 900 años. Bajo estos criterios se estimó un tamaño efectivo poblacional (N_e) actual de aproximadamente 2367 ± 452 individuos, con 95% de nivel de confianza (HPD límite inferior = 6.6; HPD límite superior = 15748).

En contraste, cuando se analizó considerando a la población del laboratorio los resultados revelaron que efectivamente la población ha permanecido constante durante 900 años, pero que en los últimos 100 años ha tenido una expansión poblacional. Bajo este criterio se estimó un N_e actual de más de 6567 ± 0.442 individuos, con 95% de nivel de confianza (HPD límite inferior = 30; HPD límite superior = 37131) (Figura 10B). Este resultado concuerda con la reproducción masiva de esta población en el laboratorio, donde se crían 175 millones de pupas por semana destinadas a liberación y 3 millones de pupas para reproducción. Los tiempos desde la expansión reciente calculados con la prueba “*mismatch*” (aunque no es significativo), coinciden con los eventos de expansión calculados con *BSP* para la población de laboratorio (Cuadro 17). En las poblaciones silvestres, la distribución “*mismatch*” encontrada parece no ajustarse al modelo de expansión poblacional, y sugiere que *A. ludens* se encuentra en equilibrio demográfico, coincidiendo con el análisis *BPS*; incluso, la población ha disminuido.

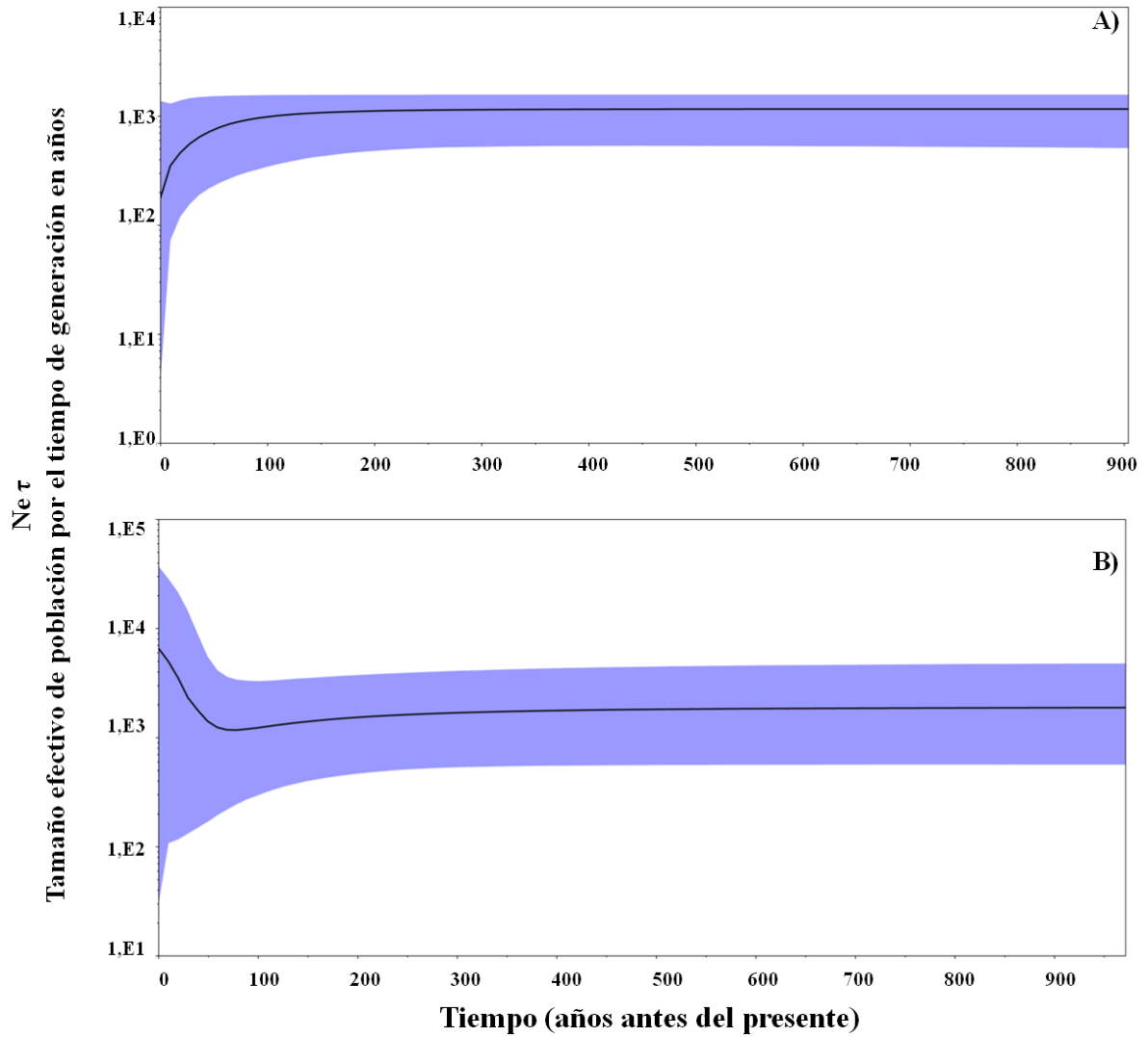


Figura 10. *Bayesian Skyline Plot* (BSP) generalizado basado en un modelo de población con crecimiento exponencial y un reloj relajado sin correlacionar. La línea negra muestra el cambio del tamaño poblacional en función del tiempo transcurrido. Las líneas azules corresponden a los intervalos de confianza. La letra A son las poblaciones silvestres y la letra B población de laboratorio.

VII. DISCUSIÓN

En este estudio las poblaciones de *A. ludens* muestran una moderada variación genética en microsatélites nucleares y una moderada diversidad haplotípica pero baja diversidad nucleotídica en el gen COInt. Por otro lado, encontramos consanguinidad significativa y una distribución de la variación genética asociada a las zonas biogeográficas de México con cierto grado de migración. Aún así no encontramos evidencia de una expansión poblacional reciente en poblaciones silvestres.

7.1 Variación genética

El número de alelos de microsatélites fue de 35 en las poblaciones silvestres. La población con un número mayor fue Soconusco (29). Hay 11 alelos privados en diferentes poblaciones, siendo las poblaciones con un mayor número, Soconusco y Costa Golfo con tres (Anexo 1 cuadro 1.9). El polimorfismo promedio hallado entre las poblaciones silvestres y de laboratorio de *A. ludens*, empleando loci de microsatélites fue alto (83 y 78%, respectivamente; cuadro 2). Estudios previos realizados por Augustinos *et al.* (2008), usando microsatélites diseñados para caracterizar a *Bactrocera oleae*, revelaron un bajo polimorfismo (24.1%) en *A. ludens*, resultado parecido (18%) fue reportado por Malavasi *et al.* (1983) empleando loci isoenzimáticos, pero solo con una población de moscas silvestres. Sin embargo, Pecina *et al.* (2009) usando marcadores nucleares (AFLPs) reportan polimorfismo moderado (67%), mientras que De Teodoro-Pardo (2011), usando de nuevo marcadores isoenzimáticos, encuentra alto polimorfismo en individuos silvestres y de laboratorio (83.3 y 75%, respectivamente). Estos resultados son muy similares a los encontrados en el presente estudio. En otras especies también se ha presentado alto polimorfismo empleando microsatélites, tal como reportan Boykin *et al.* (2010) y Fritz *et al.* (2004) en poblaciones de *A. suspensa* (88.9 y 100%, respectivamente); así como Sajedul-Islam *et al.* (2011) en *A. obliqua* (100%). El elevado polimorfismo de las poblaciones de *A. ludens* representa diferentes alelos observados dentro de los loci de microsatélites, lo que de acuerdo a De Teodoro-Pardo (2011) refleja una alta variación genética, que permite un alto grado de adaptabilidad y dispersión a las diferentes condiciones climáticas.

El número efectivo de alelos (A_e) en poblaciones silvestres de *A. ludens* varió entre 1.79 (Altiplanicie) y 2.05 (Costa Golfo), siendo menor para la cepa de laboratorio ($A_e = 1.67$; Cuadro 2). Estos valores A_e están dentro del mismo rango que el reportado por De Teodoro-Pardo (2011) con loci isoenzimáticos en poblaciones silvestres y de laboratorio de *A. ludens* ($A_e = 0$ a 3 y $A_e = 1$ a 3, respectivamente). El mismo autor obtuvo valores semejantes en las especies *A. obliqua* ($A_e = 1$ a 2 y $A_e = 1$ a 3, respectivamente), *A. serpentina* ($A_e = 0$ a 2 y $A_e = 1$ a 2, respectivamente), y *A. striata* ($A_e = 0$ a 3 ambos). Sin embargo, Boikyn *et al.* (2010) valiéndose de microsatélites encontraron en poblaciones silvestres de *A. suspensa* valores muy elevados ($A_e = 2$ a 19). No obstante, en especies del género *Bactrocera*, los valores A_e usando microsatélites también se han presentado bajos para poblaciones silvestres y de laboratorio, como tal lo reportan Augustinos *et al.* (2008) en Grecia y Dogac *et al.* (2013) en Turquía para *B. oleae* ($A_e = 1.06$ a 5.76 y $A_e = 1$ a 3.25, y $A_e = 3.91$ a 4.49, respectivamente), así como Aketarawong *et al.* (2007) en Asia y Hawaii, y Shi *et al.* (2012) en Asia para *B. dorsalis* ($A_e = 2.22$ a 5.40 y $A_e = 3.46$ a 8.71, respectivamente).

La riqueza alélica en poblaciones silvestres de *A. ludens* entre 2.56 y 3.22 fue menor en la Planicie Costera del Noreste y mayor en el Soconusco, mientras que en la población de laboratorio fue menor ($A = 2.11$; cuadro 2). En estudios con loci isoenzimáticos para poblaciones silvestres de *A. ludens*, Malavasi *et al.* (1983) reportaron una riqueza alélica muy baja ($A = 1.55$) en comparación a lo obtenido en nuestro estudio (3.22). Sin embargo, contrastando estudios realizados en especies del género *Bactrocera*, los valores de riqueza alélica observados aquí fueron menores a los encontrados con microsatélites por Jacquard *et al.* (2013) para *B. cucurbitae* ($A = 3.1$ a 8.2), Shi *et al.* (2012) para *B. dorsalis* ($A = 3.46$ a 8.71) y Dogac *et al.* (2013) para *B. oleae* ($A = 7.05$ a 8.88).

Estos bajos valores de riqueza alélica en *A. ludens* revelan que está ocurriendo una disminución de la diversidad genética, posiblemente, por deriva génica (Franks *et al.*, 2011; Jacquard *et al.*, 2013). Además, la pérdida de la riqueza alélica está influenciada por la respuesta adaptativa a cambios ambientales y demográficos e incluso puede sesgarse por el tamaño de la muestra o la variación temporal (Frankham *et al.*, 2010). En las moscas de la fruta un argumento posible que apoya la hipótesis de la variación alélica temporal es que el tamaño efectivo de la población es muy variable

durante la temporada de fructificación (Malavasi *et al.*, 1983), debido a que la población adulta es dependiente de la disponibilidad del hospedero (Malavasi y Morgante, 1982). Es importante notar que *A. ludens* es polífaga y multivoltina (Aluja, 1994; Thomas, 2003); pueden persistir por largos periodos de tiempo, aun cuando la fruta hospedera no está disponible, sin ser sometidos a diapausa. La estrategia posible es la adaptación a hospederos con largos periodos de fructificación, este es el caso de las moscas de la fruta multivoltinas, las cuales utilizan hospederos alternos (Alujan y Mangan, 2008). Esta estrategia de sobrevivencia podría estar restringiendo la diferenciación genética. Por lo tanto, un probable escenario que explicaría los resultados observados es que cuando una población de *A. ludens* cambia de hospedero sufre un cuello de botella, que se refleja en el cambio de la frecuencia de alelos, seguido por un retorno al hospedero original, puede resultar en homogenización del grupo de genes (Pecina *et al.*, 2009).

A nivel de la diversidad genética de Nei (He) en las poblaciones silvestres de *A. ludens* se encontró valores entre 0.354 y 0.391, siendo mayor en la Costa Golfo y menor en la Altiplanicie, mientras que la cepa de laboratorio presentó un valor menor ($He = 0.337$; cuadro 2). Estos datos son similares a los encontrados por De Teodoro-Pardo (2011) para moscas silvestres ($He = 0.32$) y de laboratorio ($He = 0.30$), empleando isoenzimas. Sin embargo, la diversidad genética de las poblaciones en éste estudio, es mayor que la observada en la misma especie por Malavasi *et al.* (1982) usando isoenzimas ($He = 0.046$) y Pecina *et al.* (2009) mediante análisis con AFLPs ($He = 0.26$ a 0.29).

Cuando se han comparado cepas de laboratorio con poblaciones silvestres en otras especies del género se han encontrado resultados similares. Por ejemplo, *A. fraterculus* con He entre 0.0 (laboratorio) y 0.177 (Alberti *et al.*, 2002); *A. obliqua* con una He de entre 0.28 y 0.18 (laboratorio); *A. serpentina* con He entre 0.08 y 0.007 (laboratorio) y *A. striata* con valores ente 0.18 (laboratorio) y 0.37 (De Teodoro-Pardo, 2011). También, Fritz *et al.* (2004) y Boikyn *et al.* (2010), empleando microsátélites entre las poblaciones silvestres y de laboratorio de *A. suspensa* encontraron valores de heterocigosis entre 0.35 a 0.90 y 0.05 a 0.83, respectivamente.

En este contexto, los resultados de este estudio muestran que las poblaciones de *A. ludens* tienen una moderada diversidad genética, la cual posiblemente se deba a la

amplia distribución geográfica y un moderado tamaño poblacional (Hernández-Ortiz y Aluja, 1993). Esto aparentemente se encuentra asociado con dos factores: disponibilidad de hospederos y factores climáticos, principalmente lluvias (Aluja, 1994; Celedonio *et al.*, 1995). Adicionalmente la heterogeneidad ambiental parece jugar también un papel importante ya que por ejemplo, las características fisiográficas a lo largo del país muestran cambios profundos en el tipo de vegetación y condiciones ecológicas en sitios relativamente cercanos, en donde la humedad, la temperatura promedio y la altitud desempeñan un papel fundamental en el éxito de dispersión de muchas especies, tal como son el caso de *A. ludens* y *A. obliqua* (Hernández-Ortiz, 2007). Además, la migración constante de individuos favorece la introducción de alelos nuevos que incrementan la diversidad de las poblaciones (Hedrick, 2009).

Las poblaciones silvestres y la cepa de laboratorio de *A. ludens* en México mostraron valores de F_{IS} significativos (Cuadro 1). Al respecto, De Teodoro-Pardo (2011) también reportó que las poblaciones silvestres de Michoacán, Nuevo León y Veracruz se desvían hacia un exceso de homocigotos en cuatro de cinco loci isoenzimáticos ($F_{IS} = 0.02$ a 0.18). Ésta deficiencia de heterocigosis posiblemente revela que hay un sistema de apareamiento consanguíneo y/o las poblaciones bajo deriva génica están estructuradas de manera geográfica mostrando el llamado efecto Wahlund (Hedrick, 2011).

Con el análisis del gen COI_{mt} de *A. ludens* se encontró una pequeña variación molecular. La exploración de polimorfismos muestra un número total de siete haplotipos encontrados, usando secuencias de 803 pb (Cuadro 3). Previamente, en análisis con COI_{mt}, Boykin *et al.* (2006) encontraron en la misma especie un número similar de haplotipos, lo que supone valores de diversidad de *A. ludens* relativamente bajos. También, en especies relacionadas como *A. suspensa* y *A. obliqua*, encontraron que la variación en la secuencia COI_{mt} era demasiado baja para proporcionar una resolución a nivel de subespecie; porque ha habido menos tiempo para acumular cambios genéticos; además, que la especie es invasiva, polífaga y presenta flujo genético entre las poblaciones de Florida (Boykin *et al.*, 2006). Aunque *A. fraterculus* no presentó polimorfismo con el gen COI_{mt} (Ludeña *et al.*, 2010) y *A. suspensa* exhibió 61 haplotipos con COI_{mt} y ND6 en Mesoamérica, América Central, Caribe, oeste de México y Brasil (Ruiz-Arce *et al.*, 2012). En otras especies del género *Bactrocera*, con

análisis de COImt, como *B. cucurbitae* se han observado diez haplotipos en regiones de China, Tailandia y Filipinas (Hu *et al.*, 2008). La alta uniformidad genética y baja variabilidad genética global están asociadas con procesos que han experimentado las poblacionales, tales como una expansión rápida en su rango de distribución e invasión (Meixner *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2005; Malacrida *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008). Mientras que en *B. dorsalis* se han encontrado 28 (Shi *et al.*, 2005), 43 (Liu *et al.*, 2007), 42 (Shi *et al.*, 2010) y 60 haplotipos (Schutze *et al.*, 2012) en poblaciones de Yunnan (China) con COImt. A pesar que, *B. dorsalis* se ha introducido recientemente en Yunnan (China) presenta relativamente alta diversidad de haplotipos. Esto se debe a que la antigüedad de la mosca es mayor a lo que se conoce, pero se mantuvo sin ser detectada hasta que empezó a causar daños a frutales ó que se ha introducido varias veces de diferentes ubicaciones (Shi *et al.*, 2005). Otra posible causa, la dispersión a larga distancia, aprovechando las corrientes de aire (Liu *et al.*, 2007). Finalmente los autores argumentan, que las poblaciones se originaron partir de un gran número de fundadores, lo que explica la alta diversidad genética que se encuentra a nivel local (Shi *et al.* 2010).

En éste estudio, el número de haplotipos que se encontró fue menor al número de sitios polimórficos, ya que algunos de estos difirieron entre sí por más de un nucleótido lo que significa que la muestra no incluye a todos los haplotipos existentes o muchos están extintos (Cuadro 5). Este patrón se asocia a otras especies de *Anastrepha* (Smith-Caldas *et al.*, 2002; Boykin *et al.*, 2006; Ruiz-Arce *et al.*, 2012). Además, esta misma situación se ha reportado en especies del género *Bactrocera*, como *B. cucurbitae* (Hu *et al.*, 2008). En contraste con *B. dorsalis*, en la que la cantidad de haplotipos fue suficiente para ser mayor al número de sitios polimórficos (Shi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Schutze *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2012) en donde dicha característica se asocia a especies ancestrales que han divergido lo suficiente, acumulando mutaciones entre los distintos haplotipos (Roger, 1995).

La diversidad haplotípica fue moderada ($hd = 0.159$) mientras que la diversidad nucleotídica fue baja ($\pi = 0.0008$) para las poblaciones silvestres de *A. ludens*. Una población no tiene variación (Costa Golfo) y otra (Soconusco) tiene alta diversidad haplotípica (0.426) y baja diversidad nucleotídica (0.0025). Por otro lado, la cepa de laboratorio mostró moderada diversidad haplotípica ($hd = 0.195$) y baja

diversidad nucleotídica de 0.0005 (Cuadro 3). En estudios de especies relacionadas se ha observado mayor diversidad con el gen COI y ND6 (Anexo 1 cuadro 1.12). Estos resultados demuestran que las poblaciones de *A. ludens* estudiadas tienen un rango de baja a moderada diversidad nucleotídica para el gen COInt.

7.2. Distribución geográfica de la variación genética

La diversidad genética encontrada con ambos marcadores en las poblaciones de *A. ludens*, refleja los patrones de movimiento de los organismos, y ha sido particularmente interesante para comprender las fluctuaciones ambientales en el pasado (Hewitt, 1996). Muchos estudios filogeográficos en otras especies han observado que la diversidad genética es menor en las regiones recientemente colonizadas, mientras que se mantiene elevada cerca de los centros de dispersión. Esto se confirma con el hallazgo en la distribución de los haplotipos, donde presenta un haplotipo común (H1) que puede ser ancestral, del cual derivan por mutación haplotipos intermedios y únicos. También, el haplotipo H6 es compartido por dos poblaciones el Soconusco y laboratorio (Figura 8). Esto debido a que la colonia original es una mezcla de una antigua cepa de Mission, Texas (colectas de Nuevo León y Tamaulipas), material silvestre obtenida de diferentes regiones de Chiapas (Orozco-Dávila *et al.*, 2007) y diferentes estados de México. La afinidad razonable con Soconusco es por la renovación con material silvestre de Chiapas, que han dominado en pocas generaciones sobre el material de Mission, Texas. También, esto posiblemente ocurra por eventos de colonización o migración en las poblaciones silvestres (Hewitt, 2000).

Los haplotipos privados H2, H3, H4, H5 y H7 se han encontrado en localidades recién colonizadas y corresponden a haplotipos nuevos, formados probablemente por combinación del efecto fundador, mutación y deriva genética (Hewitt, 2000). Otra posible causa de la distribución de diversidad genética es el tipo de alimentación; en este caso, *A. ludens* es polífaga, pues sus hospedantes están incluidos en varias familias de plantas (Baker *et al.*, 1944; Aluja *et al.*, 1989) y, al igual que *A. fraterculus*, experimenta cambios de plantas hospederas durante el año. Por lo tanto, como Alberti *et al.* (2002) sugieren que las frecuencias alélicas pueden cambiar de generación en generación por el efecto fundador con cada cambio de hospedero. Dicho comportamiento se espera producir exceso de homocigotos (Shi *et al.*, 2005; Liu *et al.*,

2007). Las discontinuidades de hábitat en el tiempo también pueden afectar la diversidad genética de las poblaciones (Wade y McCauley 1988; McCauley, 1991; Whitlock, 1992; Roderick, 1996; Liu *et al.*, 2007). Además, la moderada diversidad genética en poblaciones de *A. ludens* en la región Costa Golfo y Soconusco puede estar relacionada con el intenso intercambio comercial de frutos, tales como cítricos y mangos y con la diversidad de frutos hospederos nativos que presentan esas regiones.

7.3. Diferenciación y estructura genética

La diferenciación entre las poblaciones con microsatélites fue de baja a moderada para F_{ST} y R_{ST} (Cuadro 6). El AMOVA obtenido de valores de R_{ST} indicó que la mayor proporción de variación genética total se encontró dentro de las poblaciones (71.6%), y menor entre poblaciones (7.2%). La diferenciación fue moderada ($R_{ST} = 0.072$) entre poblaciones silvestres (Cuadro 7). Los índices F_{IS} y F_{IT} fueron positivos confirmando el déficit de heterocigotos. Los valores de AMOVA a partir de F_{ST} mostraron el mismo patrón anterior, de igual forma la población laboratorio. Esto posiblemente ocurre por apareamiento entre individuos relacionados, o un menor tamaño efectivo debido a un sesgo entre los sexos en el éxito reproductivo (De Teodoro-Pardo, 2011).

Previamente, Pecina *et al.* (2009) obtuvieron con AFLPs, variaciones genéticas altas (88.43%) en poblaciones de *A. ludens*, con diferenciación moderada ($F_{ST} = 0.058$). En la misma especie, pero con loci enzimáticos, De Teodoro-Pardo (2011) obtuvo en poblaciones de Guatemala y Nuevo León, valores de F_{ST} moderados (0.15), y altos (0.67) para poblaciones de Nuevo León y Veracruz. En *A. fraterculus*, Alberti *et al.* (2002) reportan que el análisis con microsatélites muestra alta variación genética entre individuos (95%) y moderada diferenciación ($F_{ST} = 0.053$). Además, los estimados de F_{IS} (0.261) y F_{IT} (0.300) indicaron exceso de homocigosis. En *A. suspensa*, Boikyn *et al.*, (2010), con microsatélites encontraron alta variación genética dentro de las poblaciones (95.82%) y diferenciación relativamente más baja ($F_{ST} = 0.04178$).

Para el gen COImt las poblaciones silvestres de *A. ludens* se encuentran poco diferenciadas (Cuadro 9). De acuerdo al análisis de SAMOVA, la máxima partición de la diversidad genética es obtenida con dos grupos ($K = 2$; $\Phi_{CT} = 0.167$). El primer grupo es formado por Altiplanicie, Planicie Costera del Noreste, Costa Pacífico y Costa Golfo,

y el segundo por Soconusco (Cuadro 10). Así, el AMOVA reveló diferenciación moderada, explicando muy poco la varianza molecular entre grupos. También, consideramos a todas las poblaciones como grupo único, encontrando un valor Φ_{ST} moderado (0.05833). En el caso de la población del Soconusco, la diferenciación moderada se debió a la presencia de alelos privados. Éste hallazgo fue respaldado por el AMOVA, donde se observa que la mayoría de la variación genética se distribuyó dentro de los individuos y entre las poblaciones. Esto sugiere que distintos haplotipos de mitocondria se han fijado por deriva genética en las poblaciones e indica que la separación es antigua y ha habido flujo genético (Hedrick, 2011).

Así, el estudio de la estructura genética con microsatélites reveló que existen tres grupos genéticos ($K = 3$) con ancestría en una fracción de alelos mezclados en la mayoría de los individuos (probablemente migrantes genéticos), excepto Soconusco y de laboratorio (Figura 4), mientras que con datos de COImt, detectamos dos grupos genéticos ($K = 2$; 2.5 Anexo 2), lo que fue confirmado por SAMOVA ($K = 2$).

Al encontrar estructura, se buscó posible aislamiento por distancia tanto para ambos marcadores, pero la correlación resultó no significativa. Por lo tanto, la existencia de barreras genéticas y una estructura metapoblacional, y no el aislamiento por distancia, puede ser la razón de la estructura encontrada en las poblaciones de *A. ludens* en México. Esto puede ocurrir posiblemente porque las poblaciones se están comportando como una metapoblación (Wegier *et al.*, 2011).

A pesar que, el gen COImt refleja la historia de los linajes de las hembras y los microsatélites expresan la historia evolutiva más reciente de ambos sexos, ambos marcadores moleculares coincidieron en que, el grupo Soconusco presenta mayor diferenciación respecto a los demás. Una posible causa de esto es que la población Soconusco se encuentra restringida por la Sierra Madre del Sur y los vientos alisios provenientes del Golfo de México. La población de laboratorio tiene diferenciación moderada (sólo con microsatélites) hacia las otras poblaciones probablemente por la consanguinidad asociada a la cría masiva. A pesar que la cepa de laboratorio le han inyectado a través del tiempo material silvestre de Chiapas (Orozco-Dávila *et al.*, 2007) y de otras partes de México, existe un grado de diferenciación, posiblemente por el

cambio en las frecuencias alélicas que provoca el efecto de la deriva genética y cuellos de botellas que sufre la cepa de laboratorio.

Con microsatélites se encontró que, las poblaciones de la Costa Pacífico y Planicie Costera del Noreste presentan una moderada diferenciación; estas poblaciones están delimitadas por la Sierra Madre Occidental y Oriental. Las poblaciones Altiplanicie y Soconusco tienen diferenciación de baja a moderada, puede que los vientos alisios y Sierra Madre del Sur proporcionen barrera física natural. La población Costa Pacífico y Soconusco tuvo diferenciación moderada. Las principales barreras naturales son la Faja Volcánica Transmexicana, la Sierra Madre del Sur y los vientos alisios (García 1973; Lugo-Hubp, 1990; Lugo-Hubp *et al.*, 1991; Santoyo, 2007). Con respecto a la poca señal encontrada con el gen COImt se le atribuye al movimiento de migrantes que ocurrió en el tiempo a distancias considerables (>30 km; Aluja, 1994; Thomas y Loera Gallardo, 1998), asociado a que los insectos son altamente móviles. Entonces tienden a tener una baja o moderada diversidad de haplotipos y poca estructuración filogeográfica (Shi *et al.*, 2005).

La existencia del exceso de homocigotos probablemente se presente por apareamiento entre individuos relacionados (Alberti *et al.*, 2002; Rull y Barreda-Landa, 2007). Alternativamente, podría ocurrir por la mezcla de los individuos de distintos orígenes que no constituyan una población mendeliana (efecto Wahlund) o selección de hábitat. En consecuencia, dentro de las poblaciones de *A. ludens* se produjo la subdivisión de subpoblaciones mezcladas. La mezcla entre individuos de distinto origen se explica por el comportamiento polífago de la especie caracterizada por la continua búsqueda de hospederos. Esta tendencia también se han encontrado en la especie *A. fraterculus* (Alberti *et al.*, 1999; Alberti *et al.*, 2002). Por lo tanto, los resultados del presente trabajo indican que al menos en algunos casos, las poblaciones de *A. ludens* incluirían en realidad grupos heterogéneos, con un grado variable de divergencia genética, dando como resultado una subestructuración mayor que la esperada por deriva genética en poblaciones uniformes, como señalan Alberti *et al.* (2002) para *A. fraterculus* y Boykin *et al.* (2010) para *A. suspensa*. También, que la especie es joven, como mencionan Barr *et al.* (2006) quienes consideran que la diversidad genética de una población (o especie) podría ser más alta en una población vieja que en una población joven. Morgante *et al.* (1980) sugieren que muchas especies de *Anastrepha*

son relativamente jóvenes y que la especiación ha sido rápida y reciente. También, como señala Hernández-Ortiz (1992), dado que es probable que el origen de *Anastrepha* sea el sur de América, es posible que en esas regiones se presente mayor variación intraespecífica que en el norte del continente.

La búsqueda de posibles barreras genéticas arrojó que las poblaciones Costa Pacífico, Altiplanicie y Soconusco se encuentran aisladas del resto. Los hallazgos anteriores fueron confirmados por la existencia de barreras genéticas (Figura 5). La principal barrera genética (letra “a”) coincide con la existencia de una barrera física provocada por la Sierra Madre Oriental y Occidental son una fuerte barrera entre las poblaciones Planicie Costera del Noreste, Costa Golfo y Costa Pacífico. La Sierra Madre Occidental probablemente mantiene la separación entre las poblaciones Costa Pacífico, Altiplanicie, y Soconusco del resto (Lugo-Hubp, 1990; Lugo-Hubp *et al.*, 1991; Santoyo, 2007). Una segunda barrera genética (letra “b”) aísla a la población Soconusco, posiblemente por la Sierra Madre del Sur y la condición climático ambiental, debido a los vientos alisios provenientes del Golfo de México hacia la zona del Istmo de Tehuantepec, el único paso interoceánico de baja altitud en México. El Istmo de Tehuantepec puede ser una barrera climática, no solo por los fuertes vientos, sino porque las condiciones ambientales y el tipo de vegetación son muy distintos en ambos lados. En este caso, no existe barrera geográfica como tal que separe estas poblaciones, pero las condiciones climáticas están cumpliendo ésta función, ya que los vientos alisios corren desde los 18 km/h hasta 90 km/h, provocando continuo impacto de vientos de gran velocidad la mayor parte del año, tan potentes que doblan pinos y palmeras (Santoyo, 2007). La tercera barrera genética (letra “c”) aísla a la población de la Altiplanicie, ubicada sobre la barrera generada por la Faja Volcánica Transmexicana (García, 1973; Lugo-Hubp, 1990; Lugo-Hubp *et al.*, 1991).

Las barreras físicas naturales diferencian a las especies, tal como ocurrió con *A. obliqua* por la falta de diversidad que presentan sus individuos en el oeste de México. Una causa atribuible a la barrera impuesta por la Sierra Madre Occidental y Oriental, y la Faja Volcánica Transmexicana (Ruiz-Arce *et al.*, 2012). También, por el cambio de hábitat, ya que probablemente se ha incrementado por el reciente cambio climático (Axelrod, 1979; Graham, 1999). Por otra parte, puede ser el resultado de una fragmentación de bosques y selvas secas que no son habitadas por especies de

hospederos de esta especie. El hábitat fragmentado limita el flujo genético entre las poblaciones reduciendo la diversidad (Ruiz-Arce *et al.*, 2012).

En general, nuestros resultados confirman la hipótesis propuesta en el trabajo, la variabilidad y estructura genética presente en *A. ludens* está fuertemente influenciada por las características de las diferentes zonas biogeográficas de México. Estas condiciones orográficas son posiblemente la principal causa de moderada diferenciación encontrada entre las poblaciones, ya que las cadenas montañosas mantienen separadas a las poblaciones, provocando aislamiento entre las poblaciones debido a las barreras naturales generadas por la existencia de las montañas de la Sierra Madre del Sur, la Sierra Madre Oriental y Occidental, la Faja Volcánica Transmexicana y la condición climática generada por los vientos alisios.

7.4. Estimadores de migración

El intercambio genético ocurre cuando existe una evidencia de flujo de genes entre las poblaciones (Crandall *et al.*, 2000). Los modelos de migración con microsatélites indicaron que las barreras físicas naturales que influyen fuertemente en la dispersión de las poblaciones son la Sierra Madre Oriental y Occidental, la Faja Volcánica Transmexicana y la Sierra Madre del Sur, así como la zona de vientos del Istmo de Tehuantepec. El flujo genético fue bidireccional entre las poblaciones de la Costa Golfo, Planicie Costera del Noreste y Soconusco. Las poblaciones de la Altiplanicie y Costa Pacífico mostraron intercambio genético entre ellas. Sin embargo, no se presentó flujo genético entre el primer grupo y el segundo. La mayoría de las poblaciones tuvieron un flujo genético considerable (Cuadro 13 y figura 6). Esto indica que, la migración es un importante factor que contribuye a la variación genética en estas poblaciones.

Los resultados sugieren que *A. ludens* ha sido una especie con una gran capacidad de adaptación de clima, ya que el tamaño efectivo de la población (N_e) se ha mantenido (Cuadro 13). El flujo genético puede estar influenciado por la alta capacidad de dispersión (Peterson y Denno, 1998; Shi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007) de las poblaciones de *A. ludens* (más de 30 km) (Loera-Gallardo, 2009). Entre los factores más importantes encontramos la dispersión por el viento (Aluja, 1993b; Aluja *et al.*, 2000). Algunos estudios sugieren que las corrientes de aire ayudan a la expansión territorial de

las poblaciones de plagas, influyendo en el intercambio de genes entre poblaciones (Liu *et al.*, 2007). En sitios donde existe abundante vegetación, alimentos, agua y substratos para oviposición, *A. ludens* muestra reducida movilidad (Enkerlin, 1987). Cuando las condiciones son adversas se elevan a las partes altas de los árboles, para desplazarse aprovechando los vientos dominantes (Aluja, 1993), dispersándose a otros lugares a través de las corrientes de aire (Shi *et al.*, 2005). Otra causa que contribuye a su diseminación es la actividad comercial, tanto nacional como internacional, a través del transporte de fruta (cítricos, mangos y, en menor grado, duraznos) infestada con larvas vivas hacia áreas no invadidas por este insecto (Fletcher, 1989), tal como ocurre en *A. fraterculus* (4.5 migrantes/generación) debido a la migración pasiva del comercio de frutas (Alberti *et al.*, 2002; Alberti, *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2005). Las condiciones climáticas y altitudinales son otros factores que facilitan el flujo genético de *A. ludens* (15.19 migrantes/generación), si en el área al que migran hay disponibilidad de hospederos (De Teodoro-Pardo, 2011). También, hay un riesgo mínimo de que pupas de *A. ludens* sean llevadas hacia otras áreas, en suelo empacado con plantas (CABI, 2000).

Lo anterior sugiere que la estructuración genética y la tendencia de *A. ludens* a migrar o permanecer en el mismo sitio podría estar promovida por la disponibilidad de hospederos, refugios, reproducción, clima (vientos) y actividad antropogénica (comercio de frutas). La poca señal de estructuración filogeográfica se puede explicar por la movilidad de la especie, debido a que la huella de divergencia entre poblaciones es borrada por la migración. Estas distribuciones generalizadas de los linajes genéticos son comunes en insectos de gran movilidad, adaptándose a una amplia gama de condiciones ambientales (Freeland *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007).

La prueba de neutralidad (D de Tajima) fue negativa indicando expansión significativa para las poblaciones Altiplanicie, Costa Pacífico y laboratorio (Cuadro 14). Sin embargo, de acuerdo con la prueba de “mismatch” y *skylineplot* (Figuras 9 y 10), las poblaciones silvestres de *A. ludens* no se encuentran en expansión poblacional, por el contrario, sugieren un equilibrio poblacional o en todo caso una reducción muy reciente de las poblaciones debido al control fitosanitario con la TIE, incluso por la fragmentación de bosques y selvas realizado hace más de 100 años. El tamaño efectivo poblacional de *A. ludens* silvestre, se ha mantenido constante a lo largo del tiempo (TMRCA = 900 años) hasta hace 100 años, con una disminución ($N_e = 2367$

individuos). No obstante, cuando se analizó considerando la población del laboratorio reveló que la población ha permanecido constante durante 900 años, pero en los últimos 100 años ha tenido una expansión poblacional ($N_e = 6567$ individuos). Esto se debe probablemente a la cría masiva de la especie en laboratorio; alrededor de 175 millones de pupas por semana que son destinadas para liberación y aproximadamente 3 millones de pupas para su reproducción (Domínguez *et al.*, 2010; SAGARPA, 2012;).

Al respecto, tal como Ruiz-Arce *et al.* (2012) sugieren para las poblaciones de *A. obliqua*, posiblemente *A. ludens* ha tenido reciente expansión demográfica en algunas poblaciones. Esta reciente y rápida expansión, se propició durante el siglo XX, después de la introducción de mango, uno de los hospederos preferidos de esta especie y de la expansión del área de cultivo de cítricos como naranja y toronja, otros de los hospederos preferidos, infestando amplias regiones y expandiéndose a nuevos hospederos como el chile manzano (Thomas, 2004). Además, como proponen Shi *et al.* (2012) para poblaciones de *B. dorsalis* en Asia y China; estos insectos no experimentan expansión demográfica reciente, debido a que esta región corresponde al área nativa de la especie.

En general, nuestros resultados sugieren que, el rango de expansión en las poblaciones de *A. ludens* puede ocurrir en el futuro, esto debido a las características biológicas de la especie, y a su amplia gama de hospederos, alta tolerancia al cambio climático, alto potencial reproductivo (a diferencia de otras especies, *A. ludens* puede poner más de 30 huevos por puesta) y alta capacidad de dispersión, facilitando su rango de expansión en los próximos años (Aluja y Mangan, 2008; Aluja *et al.*, 2011); así como, algunos autores consideran para *B. dorsalis* (Liu *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2012).

7.5 Filogenia molecular y redes de haplotipos

La filogenia molecular muestra que las poblaciones de *A. ludens* son probablemente monofiléticas al grupo de *Anastrepha*, y que la especie hermana más relacionada es *A. fraterculus* (Figura 7). Este mismo resultado fue obtenido por Smith-Caldas *et al.* (2002) y Boykin *et al.* (2006). Los grupos monofiléticos ocurren cuando los haplotipos no tienen polimorfismos ancestrales; debido a que los haplotipos mitocondriales alcanzan la monofilia recíproca más rápidamente que los genes nucleares, dado que su

tamaño efectivo es menor alrededor de cuatro veces (Avise 2000). Por otro lado, Ludeña *et al.* (2010) menciona que con el gen COInt se observa politomía en el árbol, porque refleja la falta de variación dentro de los clados. En éste trabajo, los agrupamientos del árbol no siguieron un patrón acorde a la distribución geográfica.

Por otra parte, la teoría de coalescencia predice que el haplotipo ancestral debe ser el más común y el más distribuido entre las poblaciones, así como el haplotipo central. Estas inferencias están sujetas a la estocasticidad del proceso de coalescencia. Con este argumento, los haplotipos derivados serían menos frecuentes, y en muchos casos privados; estos se localizarían en regiones recién colonizadas (Crandall y Templeton, 1993). Esto revela que un haplotipo compartido en todas las poblaciones (H1), indica flujo genético en el pasado de las poblaciones de *A. ludens*. En poblaciones introducidas recientemente, expandidas en tamaño a partir de un pequeño número de fundadores, tendría un haplotipo común compartido por la mayoría de los individuos, y muchos haplotipos raros conectados a la principal, por unas pocas mutaciones independientes (Slatkin y Hudson, 1991; Avise, 2000; Shi *et al.*, 2005). En el presente estudio, la red mostró que muchos haplotipos intermedios están extintos ó no se muestrearon (rojo). Esto podría explicarse de dos maneras, por un lado, si el muestreo es incompleto y por el otro si no existieran. También, la presencia de un haplotipo común y una serie de haplotipos intermedios y únicos, arreglados en una red en *estrella*, indican un evento de cuello de botella fuerte, seguido de una expansión poblacional (Avise, 2000). Estos eventos asociados a procesos demográficos, posiblemente tuvieron un fuerte impacto sobre los niveles de variación observados en secuencias de ADNmt, lo cual explica la moderada diferenciación observada. Esto sugiere que las poblaciones sufrieron una serie de reducciones demográficas hasta ajustarse a uno o dos haplotipos, de los cuales fueron surgiendo nuevos haplotipos por mutación. Este escenario se apoya en los niveles de diversidad nucleotídica y haplotípica de las poblaciones de *A. ludens*. La presencia de moderados niveles de diversidad haplotípica (0.159) y bajos niveles de diversidad nucleotídica (0.0008) sugieren una rápida expansión, a partir de un tamaño efectivo poblacional pequeño (Avise, 2000). Además, la migración a grandes distancias contribuyó a la colonización de nuevas regiones; esto podría implicar que las poblaciones de *A. ludens* han sido fundadas por pocos individuos, estableciéndose distintos alelos por mutación y deriva genética.

VIII. CONCLUSIONES

- Las poblaciones silvestres de *A. ludens* presentan diversidad genética moderada. La cepa de laboratorio presenta baja diversidad genética. Pero en las poblaciones silvestres existe también un exceso de homocigotos.
- La diferenciación genética en poblaciones silvestres va desde baja (COInt) hasta moderada (microsatélites). La estructura genética determinada con los microsatélites reveló tres poblaciones genéticas, mientras que con el COInt sólo pudo discernir dos. La población Soconusco fue la más diferenciada para ambos marcadores, y la cepa de laboratorio se encuentra con diferenciación moderada respecto al Soconusco.
- El flujo genético es bidireccional y elevado entre las Planicie Costera del Noreste, Costa Golfo y Soconusco; mientras que ocurrió lo mismo para Altiplanicie y Costa Pacífico. No existe flujo entre estos dos grupos debido a las barreras naturales generadas por la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre del Sur, la Faja Volcánica Transmexicana y los vientos alisios.
- La demografía histórica muestra que no existe expansión poblacional en las poblaciones silvestres a lo largo de 900 años, pero sí un declive en los últimos 100 años. En contraste, la población de laboratorio se encuentra en expansión probablemente por la cría masiva.

REFERENCIAS

- Aketarawong, N., Bonizzoni, M., Thanaphum, S. Gomulski, L. M., Gasperi, G., Malacrida, A. R. y C. R. Gugliemino. (2007). Inferences on the population structure and colonization process of the invasive oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Molecular Ecology*, 16: 3522–3532.
- Alberti, C. A., Calcagno, G., Saidman, B. O. y J. C. Vilardi. (1999). Analysis of the genetic structure of a natural population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 92: 731-736.
- Alberti, C. A., Confalonieri, V. A., Zandomeni, R. O. y J. C. Vilardi. (2008). Phylogeographic studies on natural populations of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Genética*, 132: 1-8.
- Alberti, C. A., Rodruigero, M. S., Gómez, C. P., Saidman, B. O. y J. C. Vilardi. (2002). Evidence indicating that argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) belong to a single biological species. *Annals of the Entomological Society of America*, 95(4): 505-512.
- Aluja, M. (1993). *Manejo integrado de la mosca de la fruta*. Editorial Trillas. México D.F. 251 pp.
- Aluja, M. (1993b). The study of movement in tephritid flies: Review of concepts and recent advances. En: Aluja M. y P. Liedo (eds.), *Fruit Flies: Biology and Management*. Springer-Verlag, Nueva York, Inc., pp 105-113.
- Aluja, M. (1994). Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology*, 39: 155-178.
- Aluja, M. y R. L. Mangan. (2008). Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: Critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. *Annual Review of Entomology*, 53: 473-502.
- Aluja, M., Birke, A., Guillen, L., Díaz-Fleischer, F. y D. Nestel. (2011). Coping with an unpredictable and stressful environment: The life history and metabolic response to variable food and host availability in a polyphagous tephritid fly. *Journal of Insect Physiology*, 57: 1592-1601.
- Aluja, M., Cabrera, M., Guillén, J., Celedonio, H. y F. Ayora. (1989). Behavior of *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, and *A. serpentina* (Diptera: Tephritidae) on a wild mango tree (*Mangifera indica*) harbouring three McPhail traps. *Insect Science and its Application*, 10: 309-318.
- Aluja, M., Celedonio-Hurtado, H., Liedo, P., Cabrera, M., Castillo, F., Guillén, J. y E. Ríos. (1996). Seasonal population fluctuations and ecological implications for management of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) in commercial mango orchards in southern México. *Journal of Economic Entomology*, 89: 654-667.
- Aluja, M., Pérez-Staples, D., Macías-Ordóñez, R., Piñero, J., McPherson, B. y V. Hernández-Ortíz. (2003). Nonhost status of *Citrus sinensis* cultivar Valencia and *C. paradisi* cultivar ruby red to Mexican *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) *Journal of Economic Entomology*, 96: 1693-1703.

- Aluja, M., Piñero, J., Jácome, I., Díaz-Fleischer, F. y J. Sivinski. (2000). Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). En: Aluja M. y A. Norrbom (eds.), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. (pp. 375-406, Capítulo 15). CRC Press, Boca Ratón, Florida, EE: UU., 944 p.
- Aluja, M., Rull, J., Pérez-Staples, D., Díaz-Fleischer, F. y J. Sivinski. (2009). Random mating among *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) adults of geographically distant and ecologically distinct populations in Mexico. *Bulletin of Entomological Research*, 99: 207-214.
- Arnedo, M. A. (1999). Cladismo: la reconstrucción filogenética basada en parsimonia. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 26: 57-84.
- Augustinos, A. A., Stratikopoulos, E. E, Drosopoulou, E., Kakani, E. G., Mavragani-Tsipidou, P., Zacharopoulou, A. y K. D. Mathiopoulos. (2008). Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BioMedCentral Genomics*, 9(618): 1-14.
- Avice, C. J. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, Londres, Inglaterra, 228 pp.
- Axelrod, D. I. (1979). Age and origin of Sonoran desert vegetation. *Occasional papers of the California Academy of Sciences*, 132: 1-74.
- Baker, A. C., Stone, W. E., Plummer, C. C. y M. McPhail. (1944). A review of studies on the Mexican fruit fly and related Mexican species. U.S.D.A. *Miscellaneous Publications*, 53: 155.
- Bandelt, H. J., Forster, P. y A. Röhl. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Barr, N. B., Copeland, R. S., Meyer, M., Masiga, D., Kibogo, H. G., Billah, M. K., Osir, E., Wharton, R. A. y B. A. McPhero. (2006). Molecular diagnostics of economically important *Ceratitis* fruit fly species (Diptera: Tephritidae) in Africa using PCR and RFLP analyses. *Bulletin of Entomological Research*, 96: 505-521.
- Berli, P. (2006). Comparison of bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics*, 22: 341-345.
- Berli, P. y J. Felsenstein. (1999). Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152: 763-773.
- Berli, P. y J. Felsenstein. (2001). Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 4563-4568.
- Birke, A. y M. Aluja. (2011). *Anastrepha ludens* and *A. serpentina* (Diptera: Tephritidae) do not infest *Psidium guajava* (Myrtaceae), but *A. obliqua* occasionally shares this resource with *A. striata* in nature. *Journal of Economic Entomology*, 104: 1204-1211.
- Birke, A., Guillén, L., Midgarden, D. y M. Aluja. (2013). Fruit flies, *Anastrepha ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart) and *A. grandis* (Macquart) (Diptera: Tephritidae): Three pestiferous tropical fruit flies that could potentially expand their range to temperate

- areas. En: Peña J. M. y Wysoki (eds.), *Emerging invasive pests of agricultural crops*. Editorial CABI.
- Boykin, M. L., Shatters Jr, R. G., Hall, D. G., Burns, R. E. y R. A. Franqui. (2006). Analysis of host preference and geographical distribution of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) using phylogenetic analyses of mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence data. *Bulletin of Entomological Research*, 96: 457-469.
- Boykin, M. L., Shatters Jr, R. G., Hall, D. G., David, D. y P. Bearli. (2010). Genetic Variation of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) in Florida and the Caribbean using Microsatellite DNA Markers. *Journal of Economic Entomology*, 103(6): 2214-2222.
- Brower, A. V. Z. (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(14): 6491-6495.
- CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International). (2000). *Crop protection compendium, global module*, 2nd Edition. CAB International, Wallingford, Gran Bretaña.
- Celedonio-Hurtado, H., Aluja, M. y P. Liedo. (1995). Adult population fluctuations of *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) in tropical orchard habitats of Chiapas, Mexico. *Environmental Entomology*, 24: 861-869.
- Clement, M., Posada, D. y K. Crandall. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10): 1657-1660.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J. y J. Tang. (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 9: 539.
- Corander, J., Sirén, J. y E. Arjas. (2008a). Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Computational Statistics*, 23: 111-129.
- Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R., Mace, G. M., y R. K. Wayne. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15: 290-295.
- Crandall, K. A. y A. R. Templeton. (1993). Empirical test of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134(3): 959-969.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. y D. Posada. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.
- De Teodoro-Pardo, C. V. (2011). Evolución genética de cuatro especies de *Anastrepha* spp. (Díptera: Tephritidae). Tesis de Doctorado en Ciencias, especialista en Genética, Posgrado de recursos genéticos y productividad genética. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, 105 pp.
- Dogac, E., Kandemir, I. y V. Taskin. (2013). The genetic polymorphisms and colonization process of olive fly populations in Turkey. *PLoS ONE*, 8(2): e56067.
- Domínguez, J., Artiaga-López, T., Solís, E. y E. Hernández. (2010). Métodos de colonización y cría masiva. En: Montoya, P., Toledo, J. y E. Hernández (eds.), *Mosca de la fruta: fundamentos y procedimientos para su manejo*, S y G editores, México, D. F: pp 259-276.

- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. y O. G. Pybus. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1185-1192.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Suchar M. A. y W Xie. (2013). BEAUti (Bayesian Evolutionary Analysis Utility Ver. 1.7.5). Department of Computer Science, University of Auckland. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles.
- Drummond, A. J., y A. Rambaut. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- Dupanloup, I., Schneider, S. y L. Excoffier. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571-2581.
- Enkerlin D., R. L. García, and M. F. López. (1989). Mexico, Central and South America. fruit flies: their biology, natural enemies and control. En: Robinson, A. S. y G. Hooper (Eds.), *World Crop Pests Vol. 3A*. Elsevier, Ámsterdam, Holanda, pp. 83-90.
- Enkerlin W. R. (1987). Orientación y dispersión de poblaciones de la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*), estériles y silvestres, en el municipio de Allende Nuevo León, en el periodo de septiembre de 1985 a agosto de 1986. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, 76 pp.
- Enkerlin, H. W. (2000). Factibilidad técnica y económica de programas regionales de control y/o erradicación de moscas de la fruta: Procedimientos para la elaboración de estudios. En memorias de XIII Curso Internacional sobre Mosca de la Fruta. Centro Internacional de Capacitación de Moscas de la Fruta. Complejos Bioindustrial MOSCAMED-MOSCAFRUT SAGARPA CONASAG-DGSV. Metapa de Domínguez, Chiapas, México, pp 35-62.
- Evanno, G., Regnaut, S. y J. Goudet. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software *Structure*: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier, L. G. (2004). Special issue: analytical methods in phylogeography and genetic structure. *Molecular Ecology*, 13: 727
- Excoffier, L. G. y S. Schneider. (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Excoffier, L. G., Smouse, P. E. y J. M. Quattro. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier, L. y H. Lischer (2010). Arlequin suite ver. 3.5.13: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- Fletcher, B. S. (1989). Ecology: movements of Tephritidae fruit flies. En: Robinson, A. S. y G. Hooper (eds.), *Fruit flies: their biology, natural enemies and control. world crop pests, 3(B)*. Elsevier, Ámsterdam, Holanda, pp. 209-219.
- Frankahm, R., Balloul, J. D. y D. A. Briscoe. (2010). *Introduction to conservation genetics*. 2nd Edition. Cambridge University Press. Reino Unido, 642 pp.

- Franks, S. J., Pratt, P. D. y N. D. Tsutsui. (2011). The genetic consequences of a demographic bottleneck in an introduced biological control insect. *Conservation Genetic*, 12(1): 201-211.
- Freeland, H. J., Gatien, G., Huyer, A. y R. L. Smith. (2003). Cold halocline in the northern California current: an invasion of subarctic water. *Geophysical Research Letters*, 30: 1141.
- Freeman S. y J. C. Herron. (2007). *Evolutionary analysis*. Prentice Hall. Nueva Jersey.
- Fritz, H. A. y N. Schable. (2004). Microsatellite loci from the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology Notes*, 4: 443-445.
- Fu, Y. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Fu, Y. y W. H. Li (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693-709.
- Futuyma, D. (2009). *Evolution*. 2a. Edición, Sinauer Associates, INC. Publishers Subderkan, Massachusetts EE. UU. 663 pp.
- Gálvez-Reyes, N. (2010). Variabilidad genética de poblaciones de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) en México. Tesis de licenciatura, Centro de Biociencias, UNACH, Tapachula, Chiapas, 23 pp.
- García, E. (1973). Modificaciones al sistema de clasificación climatic de Koeppen para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F., 246 pp.
- Goudet, J. (1995). FSTAT ver. 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485.
- Graham, A. (1999). The tertiary history of the northern temperate element in the northern Latin American biota. *American Journal of Botany*, 86: 32-38.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. y W. M. Gelbart. (1996). *An introduction to genetic analysis*. 7a. edición, W. H. Freeman and Company, Nueva York, EE. UU., 915 pp.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. y O. Gascuel. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307-321.
- Gutiérrez-Samperio, J., Reyes, J. y A. Villaseñor. (1993). National plan against fruit flies in Mexico. En: Aluja, M y P. Liedo (eds.), *Fruit flies: biology and management*, Springer Verlag, Nueva York, Inc., 492 pp.
- Hall, A. T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symposium*, 41: 95-99.
- Heath, M., Kuhn, D., Schnell, R. y C. Olano. (2001). Mitochondrial DNA restriction map for the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, and occurrence of mitochondrial DNA diversity within highly inbred colonies. *Biochemical Genetics*, 40: 7-8.
- Hedrick, P. W. (2001). Conservation genetics: where are we now?. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 629-636.

- Hedrick, P. W. (2009). Conservation genetics and North American bison (*Bison bison*). *Journal of Heredity*, 100: 411-20.
- Hedrick, P. W. (2011). *Genetics of Populations*. 4a. edición, Jones and Bartlett Publishers. Sudbury Massachusetts, EE.UU.
- Hernández-Ortiz, V. (1992). El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae): taxonomía, distribución y plantas hospederas. Instituto de Ecología, Sociedad mexicana de entomología, Xalapa México, 162 pp.
- Hernández-Ortiz, V. (2007). Diversidad y biogeografía del género *Anastrepha* en México. En: Hernández-Ortiz V. (Ed.), *Moscas de la fruta en Latinoamérica* (Diptera: Tephritidae): *diversidad, biología y manejo*. S y G editores, México D.F., pp: 53-76.
- Hernández-Ortiz, V. y M. Aluja. (1993). Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomológica Mexicana*, 88: 89-105.
- Hernández-Ortiz, V., Gómez-Anaya, J. A., Sánchez, A., McPheron, B. A. y M. Aluja. (2004). Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bulletin of entomological research*, 94(6): 487-499.
- Hewitt, G. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247-276.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907-913.
- Hu, J., Zhang, J. L., Nardi, F. y R. J. Zhang. (2008). Population genetic structure of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), from China and Southeast Asia. *Genética*, 134: 319-324.
- Hudson, R. R. (1990). Gene genealogies and the coalescent process, pp. 1-44 En: Futuyma, D. y J. D. Antonovics (eds.), *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, Oxford University Press, Nueva York.
- Hudson, R. R., Slatkin, M. y W. P. Maddison. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583-589.
- Jacquard, C., Virgilio, M., David, P., Quilici, S., Meyer, M. y H. Delatte. (2013). Population structure of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Reunion Island. *Biological Invasions*, 15: 759-773.
- Jukes, T. H. y C. R. Cantor. (1969). *Evolution of protein molecules*. Nueva York: Academic Press. pp. 21-132.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Klassen, W. y C. F. Curtis. (2005). History of the sterile insect technique. Chapter 1.1. En: Dyck, V. A., Hendrichs J. y A. S. Robinson (eds.), *Sterile Insect Technique: principles*

and practice in area-wide integrated pest management. IAEA. Springer. Printed in the Holanda, pp 3-38.

- Krafsur, E. S. (2005). Role of population genetics in the sterile insect technique. Chapter 4.1. En: Dyck, V. A., Hendrichs J. y A. S. Robinson (eds.), *Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management*. IAEA. Springer. Printed in the Holanda, pp 389-406.
- Langella, O. (2002). Populations 1.2.30. Copyright (C) 1999, Olivier Langella, *Centre national de la recherche scientifique* UPR9034. Available at <http://bioinformatics.org/tryphon/populations/>
- Lewontin, R. C. (1991). Twenty-five years ago in genetics: electrophoresis in the development of evolutionary genetics: milestone or millstone? *Genetics*, 128: 657-662.
- Liu, J. H., Shi, W. y H. Ye. (2007). Population genetics analysis of the origin of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae), in Northern Yunnan Province, China. *Entomological Science*, 10: 11-19.
- Loera-Gallardo, J. J. (2009). Ficha técnica *Anastrepha ludens* (Loew) mosca mexicana de la fruta. Senasica-Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA, pp 28. <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=19753&IdUrl=31548>
- Ludeña, B., Baya, R. y J. C. Pintaud. (2010). Phylogenetic relationships of Andean-Ecuadorian populations of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann 1830) (Diptera: Tephritidae) inferred from COI and COII gene sequences. *Annales de la Société Entomologique de France*, 46(3): 344-35).
- Lugo-Hubp, J. y C. Córdova. (1991). Regionalización geomorfológica de la Republica Mexicana. Instituto de Geografía, UNAM 1991.
- Lugo-Hubp, J. (1990). El relieve de la republica mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología. *Revista*, 9(1): 82-111.
- Lynch, M. y T. J. Crease. (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution*, 7: 377-394.
- Malacrida, A. R., Gomulski, L. M., Bonizzoni, M., Bertin, S., Gasperi, G. y C. R. Guglielmino. (2007). Globalization and fruit fly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genética*, 131: 1-9.
- Malavasi, A. y J. S. Morgante. (1982). Genetic variation in natural populations of *Anastrepha* (Diptera:Tephritidae). *Revista Brasileira de Genética*, 2: 263-278.
- Malavasi, A. y J. S. Morgante. (1983). Population genetics of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) in different hosts: Genetic differentiation and heterozygosity. *Genética*, 60: 207-211.
- Manni, F., Guérard, E. y E. Heyer. (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm”. *Human Biology*, 76(2): 173-190.
- McCauley, D. E. (1991). Genetic consequences of local population extinction and recolonization. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 5-8.

- McPheron, B. A., Han, H. Y., Silva, J. G. y A. L. Norrbom. (2000). Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rRNA mitochondrial DNA sequences, pp. 505-533. En: Aluja M. y A. L. Norrbom [Eds.], *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. CRC, Boca Ratón, FL.
- McPheron, B. A., Ho-Yeon. H., Silva. J. G. y A. L. Norrbom. (1999). Phylogeny of the genus *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rRNA mitochondrial DNA sequences, p. 343-361. In Aluja, M y A. L. Norrbom (eds.), *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. Boca Ratón, Florida, CRC. Press. 944 pp.
- Meixner, M. D., McPheron, B. A., Silva, J. G., Gasparich, G. E. y W. S. Sheppard. (2002). The Mediterranean fruit fly in California: evidence for multiple introductions and persistent populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. *Molecular Ecology*, 11: 891-899.
- Morales-García, A. E. (2012). Filogeografía y genética de poblaciones de *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) en México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Biología ambiental, Instituto de Ecología, UNAM, México, D.F. 157 pp.
- Morgante, J. S. y A. Malavasi. (1985). Genetic variability in populations of the South American fruits fly *Anastrepha fraterculus* (Tephritidae). *Revista. Brasileira de Genética*, 8: 241-247.
- Morgante, J. S., Malavasi, A. y G. L. Bush. (1980). Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. *Annals of the Entomological Society of America*, 73: 622-630.
- NAPPO, (2012). Organización norteamericana de protección a las plantas. <http://www.nappo.org>
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G. K. y F. Frati. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly. *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology*, 14: 2729-2738.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, Nueva York, pp 512.
- Norrbom A. L., Zucchi, R. A, y V. Hernandez-Ortiz. (1999). Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology, En: Aluja, M. y A. L. Norrbom (Eds.), *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*, Boca Ratón, Florida, CRC Press. pp 299-342.
- Norrbom, A. L. (2004). Fruit fly (Diptera: Tephritidae) Economic Importance. The Diptera Site, Systematic Entomology Laboratory. ARS-United States Department of Agriculture.
- Norrbom, A. L. y C. A. Korytkowski. (2009). A revision of the *Anastrepha robusta* species group (Diptera: Tephritidae). *Zootaxa*. 2182: 1-91.
- Norrbom, A. L., y C. A. Korytkowski. (2012). New species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae), with a key for the species of the megacantha clade. *Zootaxa*. 3478: 510-552.
- Norrbom, A. L., Zucchi, R. A. y V. Hernández-Ortiz. (2000). Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology. En:

- Aluja, M. y A. L. Norrbom (Eds.), *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 299–342.
- Núñez, B. L. (2000). Las moscas de las frutas: importancia económica, aspectos taxonómicos, distribución mundial de los géneros de importancia económica. En: Primer seminario taller sobre el manejo de las moscas de las frutas en el departamento de Arauca. http://webapp.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/mosca_fruta.pdf.
- Orozco-Dávila, D., Hernández, R., Meza, S. y J. Domínguez. (2007). Sexual competitiveness and compatibility between mass-reared sterile flies and wild populations of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) from different regions in Mexico. *Florida Entomologist*, 90(1): 19-26.
- Peakall, R. O. D y P. E. Smouse. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pecina, Q. V., López, A. J. I., Loera, G. J., Rull, J., Rosales, R. E., Cortez, M. E., Hernández, S. D., Mayek, P. N y M. S. Aluja. (2009). Genetic differences between *Anastrepha ludens* (Loew) population stemming from a native and exotic host in NE México. *Agricultura Técnica en México*, 35(3): 323-331.
- Peterson, M. A., y R. R. Denno. (1998). The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in phytophagous insects. *American Naturalist*, 152: 428-446.
- Pinson, E. P., Tejada, L. O., Toledo, J., Enkerlin, W., Hurtado, H. C., Valle, J., Pérez, J. N. y P. Liedo. (2006). Caracterización de la adaptación de *Anastrepha serpentina*, a condiciones de cría masiva. *Folia entomológica mexicana*, 45: 002.
- Polzin, T. y S. V. Daneshmand. (2012). NETWORK 4.6.1.1 Fluxus Technology Ltd. All rights reserved. Steiner (MP) algorithm.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. y P. Donnelly. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Pybus, O. G., Charleston, M. A., Gupta, S., Rambutan, A., Holmes, E. C. y P. H. Harvey. (2000). The epidemic behaviour of the Hepatitis C virus. *Science*, 292: 2323-2325.
- Rambaut, A. (2012). Tree Figure Drawing Tool, ver. 1.4.0. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Rambaut, A. y A. J. Drummond. (2009). MCMC Trace analysis tools Ver. 1.5.0. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Department of Computer Science, University of Auckland.
- Rambaut, A. y A. J. Drummond. (2013). TreeAnnotator version 1.7.5 Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Department of Computer Science, University of Auckland.
- Ray, N., Currat, M. y L. Excoffier. (2003). Intra-deme molecular diversity in apatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution*, 20(1): 76-86.
- Reyes, J., Santiago, G. y P. Hernández. (2000). The mexican fruit fly eradication programme, p. 377-380. En Tan, K. H. (ed.). *Area-wide control of fruit flies and other insect pests*. University Sains Malaysia, Penang, Malasia.

- Roderick, G. K. (1996). Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41: 325-352.
- Roger, R. A. (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49(4): 608-615.
- Rogers y Harpending. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-568.
- Ronquist, F. y J. P. Huelsenbeck. (2003). MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572.
- Rousset, F. (2008). Genepop 007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- Rozas, J., Librado P., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. y R. Rozas. (2010). DNA Sequence Polymorphism, Ver. 5.10.1. Universidad de Barcelona. <http://www.ub.edu/dnasp/>
- Ruiz-Arce. R., Barr, N. B., Owen, C. L., Thomas, D. B. y B. A. McPheron. (2012). Phylogeography of *Anastrepha obliqua* inferred with mtDNA sequencing. *Journal of Economic Entomology*, 105(6): 2147-2160.
- Rull, J. y A. Barreda-Landa. (2007). Colonization of an hybrid strain to restore male *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) mating competitiveness for sterile insect technique programs. *Journal of Economic Entomology*, 100(3): 752-758.
- Rull, J., Brunel, O. y M. E. Méndez. (2005). Mass rearing history negatively affects mating success of male *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) reared for sterile insect technique programs. *Journal of Economic Entomology* 98(5): 1510-1516.
- Rull, J., Diaz-Fleisher, F. y J. Arredondo. (2007). Irradiation of *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) revisited: *Optimizing sterility induction*. *Journal of Economic Entomology* 100(4): 1153-1159.
- Rzedowki, J. (1978b). *La vegetación de México*. Editorial Limusa, México, D.F., 432p.
- Rzedowski, J. (1991a). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*, 14: 3-21.
- SAGARPA (2012) Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?iddocumento=12289&idurl=17377>
- Sajedul-Islam, M., Ruiz-Arce, R. y B. A. McPheron. (2011). Microsatellite markers for the West Indian fruit fly (*Anastrepha obliqua*) and cross species amplification in related pest species. *Conservation Genet Resour, Technical Note*,3: 549-551.
- Santoyo, G. I. (2007). Lo que el viento nos trajo, proyectos de generación de energía eólica en Tehuantepec, Oaxaca. *Revista de la Procuraduría Agraria*. México D.F.
- Schneider, S. y L. Excoffier. (1999). Estimation of demographic parameters from the distribution of pair wise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079-1089.
- Schutze, M. K., Krosch, M. N., Armstrong, K. F., Chapman, T. A., Englezou, A., Chomič, A., Cameron, S. L., Hailstones, D. y A. R. Clarke. (2012). Population structure of

- Bactrocera dorsalis* s.s., *B. papayae* and *B. philippinensis* (Diptera: Tephritidae) in southeast Asia: evidence for a single species hypothesis using mitochondrial DNA and wing-shape data. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 130.
- Selivon D., Perondini A. L. P. y J. S. Morgante. (2005a). A genetic-morphological characterization of two cryptic of *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 98: 367-381.
- Selivon, D., Perondini, A. L. P. y L. S. Rocha. (2005b). The mitotic chromosomes of eighth species of *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 34: 273-279.
- Shi, W., Kerdelhue, C. y H. Ye. (2005). Population genetics of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), in Yunnan (China) based on mitochondrial DNA sequences. *Environmental Entomology*, 34(4): 977-983.
- Shi, W., Kerdelhue, C. y H. Ye. (2010). Population genetic structure of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) from Yunnan province (China) and nearby sites across the border. *Genética*, 138: 377-385.
- Shi, W., Kerdelhue, C. y H. Ye. (2012). Genetic structure and inferences on potential source areas for *Bactrocera dorsalis* (Hendel) based on mitochondrial and microsatellite markers. *PLoS ONE*, 7(5): e37083.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. y P. Flook. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction “primers”. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Slatkin, M. y R. R. Hudson. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555-562.
- Smith-Caldas, R. B. M., McPherson, A. B., Silva, G. J. y R. A. Zucchi. (2001). Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. *Neotropical Entomology*, 30(4): 565-573.
- Sperling, F. A. H. y D. A. Hickey. (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in the Spruce Budworm species complex (Choristoneura: Lepidoptera). *Molecular Biology and Evolution*, 11: 656-665.
- Steck, G. J. y W. S. Sheppard. (1993). Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*, En: Aluja, M. y P. Liedo (eds.), *Fruit flies: biology and management*. Springer-Verlag, Nueva York, EE. UU, pp. 9-14.
- Strimmer, K. y O. G. Pybus. (2001). Exploring the demographic history of DNA sequences using the generalized skyline plot. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 2298-2305.
- Tajima, F. (1989). Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y S. Kumar. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

- distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10): 2731-2739.
- Tang, J., Hanage, W. P., Fraser, C. y J. Corander. (2009). Identifying currents in the gene pool for bacterial populations using an integrative approach. *PLoS Computational Biology*, 5(8): e1000455.
- Thomas, D. B. (2003). Reproductive phenology of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) in the Sierra Madre Oriental, Northern Mexico. *Neotropical Entomology*, 32: 385-397.
- Thomas, D. B. (2004). Hot peppers as a host for the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 87(4): 603-608.
- Thomas, D. B., y J. Loera-Gallardo. (1998). Dispersal and longevity of mass-released, sterilized Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*. 27: 1045-1052.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y T. J. Gibson. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Vreysen, M. J. B. (2005). Monitoring sterile and wild insects in area-wide integrated pest management programmes. Capítulo 3.6. En: Dyck, V. A., Hendrichs, J. y A. S. Robinson (eds.), *Sterile insect technique. principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer, Dordrecht, Holanda, pp. 325-362.
- Wade, M. J. y D. E. McCauley. (1988). Extinction and colonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution*, 42: 995-1005.
- Wan, X., Nardi, F., Zhang, B. y Y. Liu. (2011). The oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in China: origin and gradual inland range expansion associated with population growth. *PLoS ONE* 6(10): e25238.
- Watterson, G. A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*. 7: 256-276.
- Wegier, A., Piñeyro-Nelson, A., Alarcon, J., Galvez-Mariscal, A., Alvarez-Buy, E. R. A. y D. Piñero. (2011). Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin. *Molecular Ecology*, 20: 4182-4194.
- 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.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

ANEXOS

ANEXO 1. Serie de cuadros que describen las localidades colectadas, oligonucleótidos utilizados y resultados de análisis estadísticos.

Cuadro 1.1. Características de las poblaciones de *A. ludens*.

Zona Biogeográficas ^a	Estado: Localidad	Latitud Norte	Longitud Oeste	msnm	Número de individuos
Altiplanicie (ALT)	Michoacán: Zinapécuaro	19°51' 39.94	100°45' 16.98	2052	20
Planicie costera del Noreste (PCN)	Nuevo León: Montemorelos	25°10' 43.08	99°51' 01.35	435	20
Costa pacífico (CP)	Sinaloa: Escuinapa	22°50' 44.22	105°54' 04.68	6	10
	Nayarit: Ruiz	21°57' 41.23	105°08' 30.42	31	10
Costa Golfo (CG)	Veracruz: Martínez de la Torre	20°00' 33.18	97°10' 51.20	291	20
Soconusco (SOC)	Chiapas: Tuxtla Chico	14°55' 12.28	92°10' 52.81	262	20
Laboratorio (LAB)	-	-	-	-	20

^a Según Rzedowki (1978b).

Cuadro 1.2. Microsatélites y oligonucleótidos empleados en las poblaciones de *A. ludens* en México.

Locus No. de accesión Gene Bank	Repeticiones	Ta (°C)	Tamaño (pb)		Secuencia de los iniciadores (5'-3') tinta fluorescente ^a
			Esperado	Encontrado	
Anob-01 JF292994	(ACAT) ₃ (AT) ₂ (GT) ₄ ...A ₁₀	56	213-237	229-234	F:CCGCATACAATGTCTTATTGC ^{NED} R:CCGAGTCGATTACAGCAAGTC
Anob-02 JF292995	(AC) ₆ (ATAC) ₂ ...(CT) ₂	56	156-160	151-159	F:CTCCCACTAGCAATTAGCACC ^{HEX} R:TTTATGGTCGCACGATTTCC
Anob-03 JF292996	(CT) ₅	56	156-172	157-174	F:CCATTGTGGTACCACCTGAGTA ^{6FAM} R:CCTGGGATGAAAACATCAAGT
Anob-13 JF293003	(CT) ₆ (GT) ₃	56	176-182	175-185	F:GCGGTCCATTCTTCATCGAT ^{PET} R:GCTGGCACAGTATCAAGATAG
Anob-06 JF292998	(CT) ₅	64	168-188	182-185	F:GGTGAACCAACTCTTGACACGTAA ^{NED} R:GCGTGCATAAGACTAGGGTTG
Anob-15 JF293004	(AG) ₈	64	158-182	124-130	F:GCGATGAACGTTTCGTAATTGG ^{6FAM} R:GGACAGTCTGACACTGAGTTACTG
Anob-08 JF292999	(CT) ₆ (GT) ₂ ...(GT) ₄	64	154-156	146-154	F:CCTTGCAAAACCTAGCAGCAG ^{NED} R:GGCAGGATTCCTGTACTTT
Anob-11 JF293001	(GC) ₄ ...(AC) ₈	64	158-174	159-183	R:GCTTTTCGGATGAACTGCCGCTA ^{HEX} F:GCGGGTGACCAGTCATCAACA
Anob-18 JF293006	(AT) ₃ ...(AT) ₃ ...(AC) ₅	54	167-189	183-189	F:GCGAACCATGAAAAGCTTCAGC ^{PET} R:CTCATTA AAAACTGACA ACTGTATT

^a Basado en el estudio de Sajedul-Islam *et al.* (2011) para *A. obliqua*.

Cuadro 1.3. Equilibrio de H-W de la población Altiplanicie

Locus	# Genotipo	Ho	He	Valor P
Anob-01	20	0.20000	0.54359	0.00033
Anob-02	20	0.10000	0.18974	0.05141
Anob-03	20	0.40000	0.43077	1.00000
Anob-13	20		Monomórfico	
Anob-06	20	0.15000	0.53718	0.00007
Anob-15	20	0.05000	0.64231	0.00000
Anob-08	20	0.10000	0.09744	1.00000
Anob-11	20	0.25000	0.69615	0.00000
Anob-18	20	0.05000	0.05000	1.00000

Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada.

Cuadro 1.4. Equilibrio de H-W de Planicie Costera del Noreste

Locus	# Genotipo	Ho	He	Valor P
Anob-01	20	0.30000	0.64231	0.00315
Anob-02	20	0.30000	0.34359	0.03272
Anob-03	20	0.45000	0.50128	0.67328
Anob-13	20		Monomórfico	
Anob-06	20	0.35000	0.51410	0.15150
Anob-15	20	0.60000	0.49231	0.38525
Anob-08	20		Monomórfico	
Anob-11	20	0.80000	0.78718	0.00141
Anob-18	20		Monomórfico	

Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada.

Cuadro 1.5. Equilibrio de H-W de Costa Pacífico

Locus	# Genotipo	Ho	He	Valor P
Anob-01	20	0.20000	0.62564	0.00002
Anob-02	20	0.05000	0.05000	1.00000
Anob-03	20	0.50000	0.38462	0.27664
Anob-13	20	0.20000	0.18462	1.00000
Anob-06	20	0.35000	0.51154	0.19698
Anob-15	20	0.45000	0.58846	0.07399
Anob-08	20	0.10000	0.09744	1.00000
Anob-11	20	0.45000	0.82051	0.00000
Anob-18	20		Monomórfico	

Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada.

Cuadro 1.6. Equilibrio de H-W de Costa Golfo

Locus	# Genotipo	Ho	He	Valor P
Anob-01	20	0.60000	0.55513	0.03046
Anob-02	20	0.20000	0.38333	0.00254
Anob-03	20	0.25000	0.51154	0.02943
Anob-13	20	0.05000	0.05000	1.00000
Anob-06	20	0.35000	0.57821	0.01053
Anob-15	20	0.05000	0.62692	0.00000
Anob-08	20	Monomórfico		
Anob-11	20	0.30000	0.81026	0.00000
Anob-18	20	Monomórfico		

Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada.

Cuadro 1.7. Equilibrio de H-W de Soconusco

Locus	# Genotipo	Ho	He	Valor P
Anob-01	20	0.35000	0.67308	0.00100
Anob-02	20	0.35000	0.33718	0.23953
Anob-03	20	0.30000	0.46667	0.14938
Anob-13	20	0.05000	0.05000	1.00000
Anob-06	20	0.25000	0.51154	0.02998
Anob-15	20	0.30000	0.54872	0.00987
Anob-08	20	0.05000	0.05000	1.00000
Anob-11	20	0.55000	0.74231	0.00075
Anob-18	20	0.05000	0.05000	1.00000

Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada.

Cuadro 1.8. Equilibrio de H-W de laboratorio

Locus	# Genotipo	Ho	He	Valor P
Anob-01	20	0.60000	0.50769	0.64999
Anob-02	20	0.40000	0.38462	1.00000
Anob-03	20	0.00000	0.43077	0.00001
Anob-13	20	0.05000	0.05000	1.00000
Anob-06	20	0.30000	0.49744	0.00904
Anob-15	20	0.10000	0.65128	0.00000
Anob-08	20	Monomórfico		
Anob-11	20	0.45000	0.51154	0.66994
Anob-18	20	Monomórfico		

Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada.

Cuadro 1.9. Número total de alelos y número de alelos privados por locus y por grupo genético con los datos de microsatélites. *N*: número de individuos, *Na*: número total de alelos, *Ap*: alelos privados., *A*: riqueza alélica (estimada para 20 individuos, el número mínimo de muestra en un grupo genético).

	120		ALT		PCN		CP		CG		SOC		LAB		
	Na	Ap	A	Na	Ap	Na	Ap	Na	Ap	Na	Ap	Na	Ap	Na	Ap
Anob-01	6		4.32	5		4		4		3		5		2	
Anob-02	5	2	3.07	3		3	1	2		4	1	3		2	
Anob-03	2		2.0	2		2		2		2		2		2	
Anob-06	2		1.73	1		1		2		2		2		2	
Anob-08	4	1	3.18	3		3		2		3		2		3	1
Anob-11	7	3	4.69	4		2		3		5	2	3		4	1
Anob-13	3	1	1.73	2		1		2	1	1		2		1	
Anob-15	10	2	7.05	5		6		8		6		8	2	2	
Anob-18	3	2	1.33	2	1	1		1		1		2	1	1	
Total	42	11	3.23	27	1	22	1	26	1	26	3	29	3	19	2

Cuadro 1.10. AMOVA e índice de diferenciación genética de las poblaciones silvestres y cepa de laboratorio de *A. ludens*, con el método de distancia R_{ST} .

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	V.E.	% de variación	Índice de diferenciación	<i>P</i>
Entre poblaciones	5	1796.35	6.114Va	6.56	$R_{ST} = 0.066$	0.016
Entre individuos	114	13079.5	27.679Vb	29.71	$F_{IS} = 0.318$	0.000
Dentro de los individuos	120	7125.00	59.375Vc	63.73	$F_{IT} = 0.363$	0.000
Total	239	22000.8	93.16696	100%	-	-

g.l.: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; V. E.: componentes de variación estimada; F_{IS} : medida de consanguinidad, F_{ST} : medida de diferenciación genética entre poblaciones; F_{IT} : medida de variación dentro de los individuos.

Cuadro 1.11. AMOVA e índice de diferenciación de las poblaciones silvestres y cepa de laboratorio de *A. ludens*, con el método de distancia F_{ST} .

Fuente de Variación	g.l.	S.C.	V.E.	% de variación	Índice de diferenciación	<i>P</i>
Entre poblaciones	5	21.542	0.0505Va	2.96	$F_{ST} = 0.030$	0.048
Entre individuos	114	26.8250	0.6294Vb	36.83	$F_{IS} = 0.379$	0.000
Dentro de los individuos	120	123.500	1.0291Vc	60.22	$F_{IT} = 0.398$	0.000
Total	239	405.867	1.7091	100%	-	-

g.l.: grados de libertad; S.C.: suma de cuadrados; V.E.: componentes de variación estimada; F_{IS} : medida de consanguinidad, F_{ST} : medida de diferenciación genética entre poblaciones; F_{IT} : medida de variación dentro de los individuos.

Cuadro 1.12. Análisis de los estimadores de diversidad haplotípica (*hd*) y nucleotídica (π) de diferentes especies de mosca de la fruta.

Especie	Referencia	Marcador	Estimadores genéticos	
			Hd	Π
<i>A. obliqua</i>	Ruiz-Arce <i>et al.</i> 2012	COI y ND ₆	0.4820 a 0.814	0.00038 a 0.01045
<i>B. dorsalis</i>	Liu <i>et al.</i> 2007	COI	0.7880 a 1.000	0.00714 a 0.01640
<i>B. dorsalis</i>	Wan <i>et al.</i> 2011	COI	0.8889 a 1.000	0.00770 a 0.01470
<i>B. dorsalis</i>	Shi <i>et al.</i> 2012	COI	8.9200 a 9.110	0.00700 a 0.02000

ANEXO 2. Serie de figuras que señalan los resultados de análisis estadísticos.

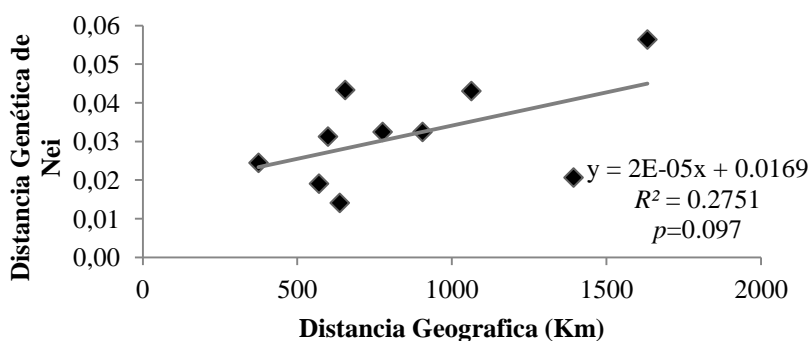


Figura 2.1. Correlación entre las distancias genéticas y geográfica para todos los pares de poblaciones de *A. ludens* muestreadas en este estudio (seis poblaciones). La distancia geográfica se midió en kilómetros a partir de las coordenadas geográficas de cada localidad. La distancia genética usada fue distancia genética de Nei = $-1 * \ln$ (Identidad de Nei). Valor de $p = 0.097$.

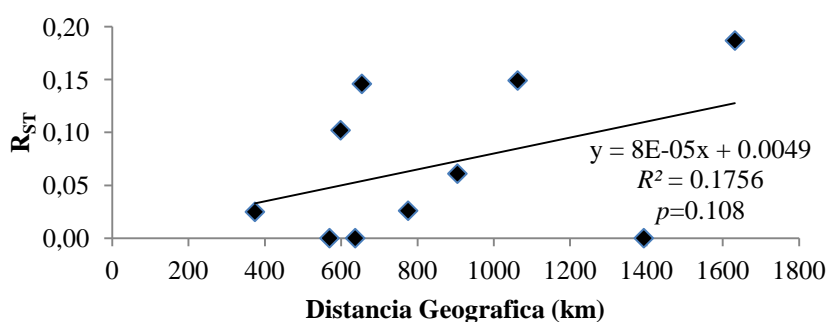


Figura 2.2. Correlación entre las distancias genéticas y geográfica para todos los pares de poblaciones de *A. ludens* muestreadas en este estudio (seis poblaciones). La distancia geográfica se midió en kilómetros a partir de las coordenadas geográficas de cada localidad. La distancia genética usada fue R_{ST} . Valor de $p = 0.108$.

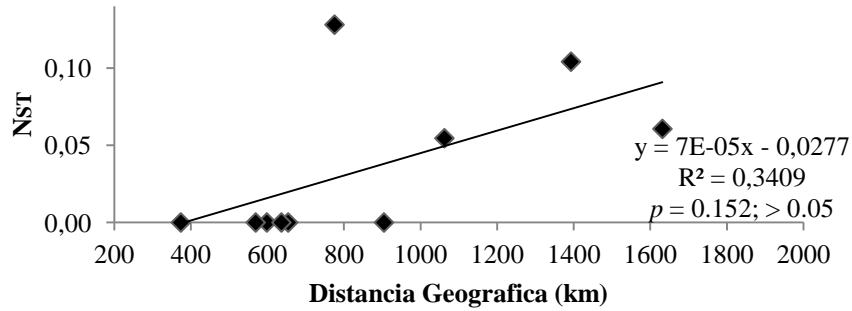


Figura 2.3. Correlación entre las distancias genética y geográfica para todos los pares de poblaciones de *A. ludens* muestreados en este estudio (cinco poblaciones en total). La distancia geográfica se midió en kilómetros a partir de las coordenadas geográficas de cada localidad. La distancia genética usada fue N_{ST} . Valor de $p = 0.252$.

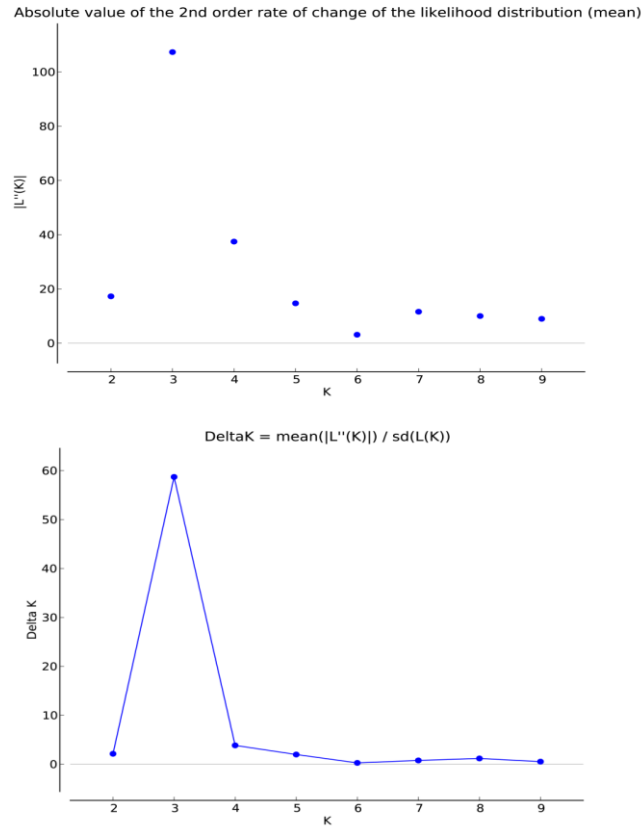


Figura 2.4. Media y desviación estándar de logaritmo natural de la probabilidad posterior de los datos sobre diez corridas independientes de STRUCTURE para cada valor de K (arriba) y variación del estadístico ΔK para cada valor de K (abajo).

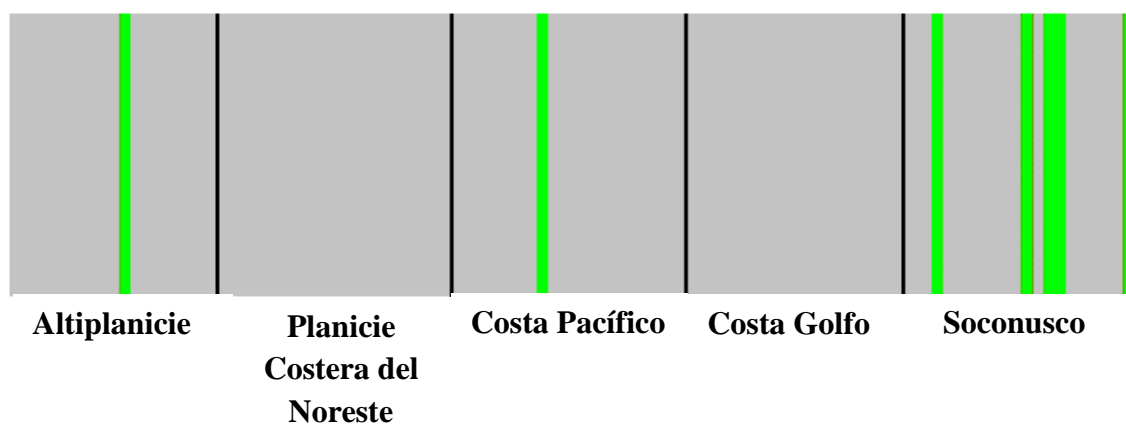


Figura 2.5. Estructura genética de cinco poblaciones silvestres y una cepa criada en laboratorio de *A. ludens* de México. Las graficas de *pie* indican los colores rojo, verde correspondientes a los agrupamientos $K = 2$ del bar-plot, *iteraciones* de cada K (K 1-5).

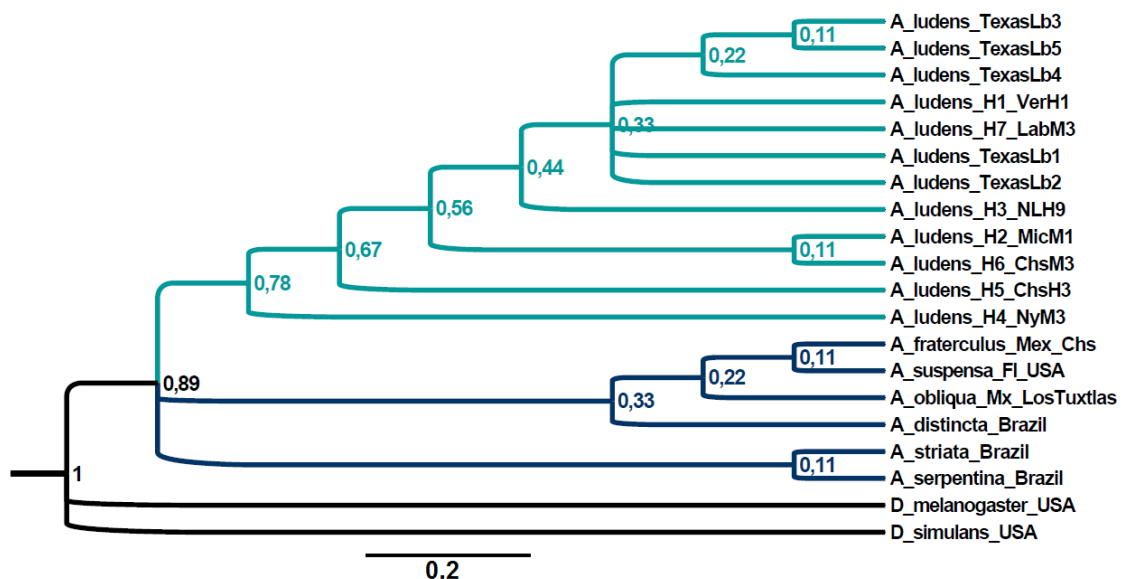


Figura 2.6. Árbol de haplotipos, gen COImt, obtenido mediante interferencia Bayesiana. Se elaboró tomando en cuenta los siguientes parámetros: número de generaciones 30,000,000, frecuencia del muestreo 15,000,000 y cuatro cadenas. Los colores representa los grupos identificados: Celeste son los siete haplotipos de *A. ludens*, Azul-especies hermanas y negro el grupo externo con que se enraizó el árbol. Programa MrBayes.

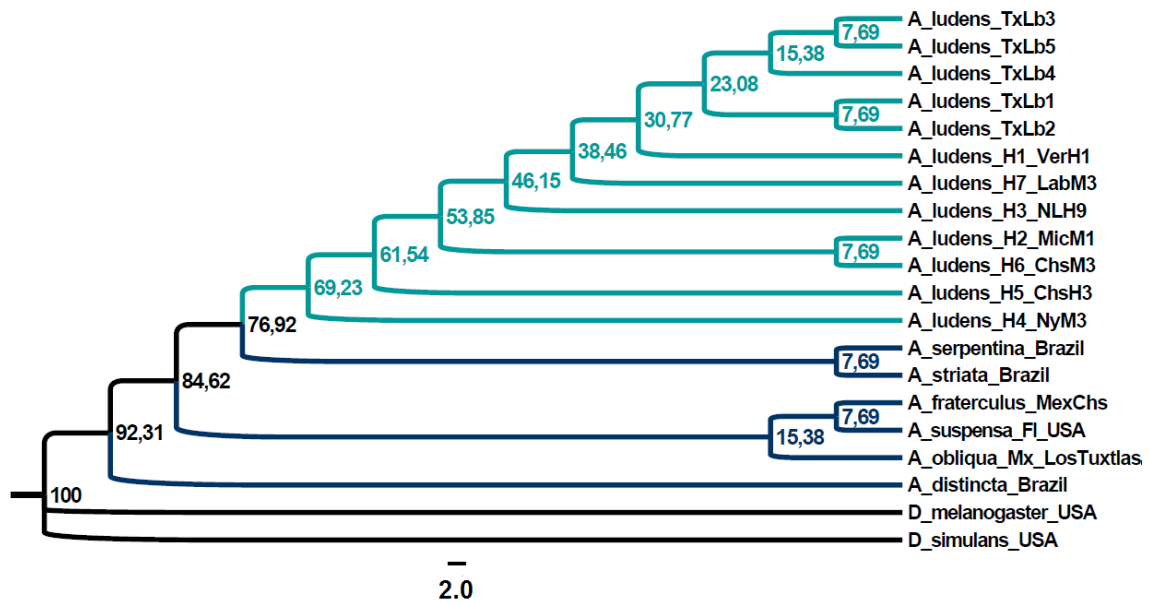


Figura 2.7. Árbol de haplotipos, gen COI_{mt}, obtenido mediante Máxima verosimilitud. Los colores representa los grupos identificados con 1000 bootstrap: Celeste son los siete haplotipos de *A. ludens*, azul-especies hermanas y negro el grupo externo con que se enraizó el árbol. Programa PhyML.

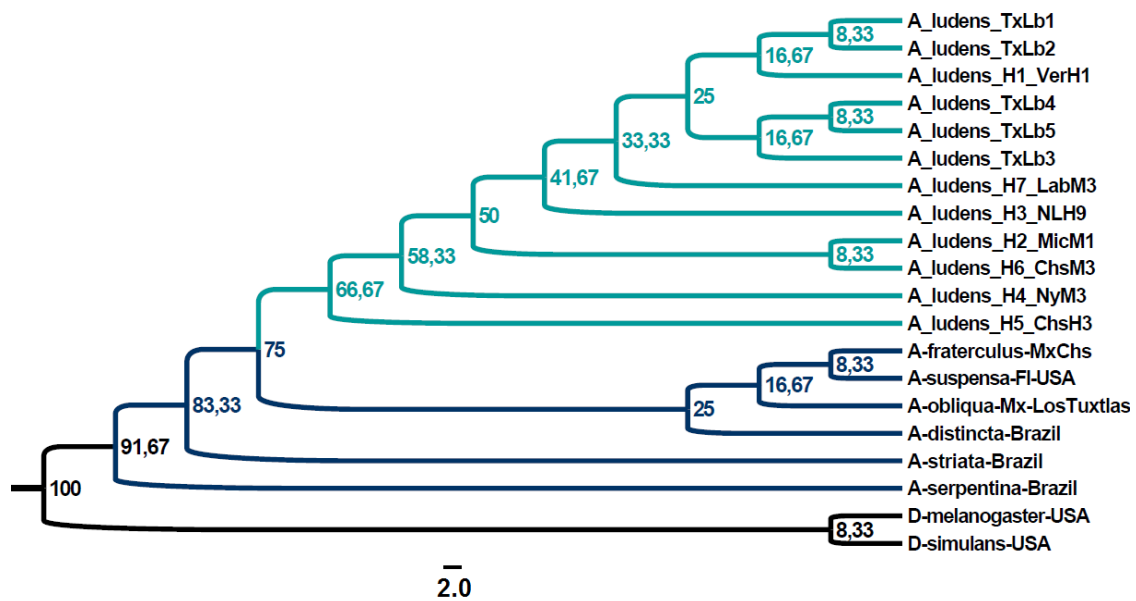


Figura 2.8. Árbol de haplotipos, gen COI_{mt}, obtenido mediante el método de distancia *Neighbor-Joining*. Los colores representa los grupos identificados con 1000 bootstrap: Celeste son los siete haplotipos de *A. ludens*, azul las especies hermanas y negro el grupo externo con que se enraizó el árbol con el programa MEGA.

ANEXO 3. Métodos de laboratorio

3.1. Extracción y purificación de ADN genómico

Para la extracción de ADN se agregó 180 μL de buffer ATL, 20 μL de proteinasa K, y se incubó a 56°C por 2 h. Después, se adicionaron 200 μL de buffer AL y 200 μL de etanol (95%), mezclando con un “vortex”, se centrifugó por 20 s a 5000 rpm. La fase acuosa fue transferida a una columna ADN mini spin y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. A continuación, la columna se colocó en un tubo colector nuevo, añadiendo 500 μL de buffer AW2, y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. Después, la columna fue colocada en un microtubo de 1.5 mL, al cual se agregó 30 μL de buffer de elución AE, se incubó a temperatura ambiente por 1 min, y finalmente, fue centrifugado a 8,000 rpm por 1 min, repitiendo este último paso.

3.2. Gel de agarosa para ADN genómico

El gel de agarosa fue al 1% (0.016 ng/mL de bromuro de etidio) en solución reguladora TBE 0.5X a 80 V durante 30 min, y visualizado con luz ultravioleta (UV). La cuantificación mediante la comparación de intensidad de banda con un marcador de peso molecular de 100 pb (Nucleic Acid Markers, 100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

3.3. Mezcla de reacción PCR para microsatélites

El ensayo consistió en mezclar 1.2 μL de solución reguladora Taq 5X, 0.72 μL de MgCl_2 (25 mM), 0.48 μL de dNTPs (10 mM), 1 μL de ADN genómico (100 ng/ μL), 0.12 μL (10mM) de cada uno de los iniciadores, 1U de Taq Polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Pol, Promega, 5 U/ μL), y se aforó a 12 μL con agua miliQ® estéril. Posteriormente, la PCR se realizó en un Termociclador ABI®. Además, se hicieron múltiplex de dos *primers* en una reacción de PCR. Las condiciones de amplificación fueron 94°C por 3 min, seguido por 39 ciclos de 1 min a 94°C , 1 min a (56°C y 64°C), 1 min a 72°C , y finalmente, 10 min a 72°C , seguido de enfriamiento a 4°C .

3.4. Gel de agarosa para fragmentos de microsatélites

El gel de agarosa fue al 1.5% (0.016 ng/mL de bromuro de etidio) en solución reguladora TBE 0.5X a 100 V durante 30 min, se visualizaron con luz UV y fotografiaron con un fotodocumentador (UVP ® Haigh performance ultraviolet transiluminador, modelo TFM-20).

3.5. Proceso de amplificación del gen COI_{mt}

La amplificación del citocromo oxidasa I mitocondrial (COI_{mt}) consistió en mezclar 5 μ L de solución reguladora Taq 5 X, 1 μ L de MgCl₂ (25 mM), 1 μ L de dNTPs (10 mM), 1 μ L de ADN genómico (100 ng/ μ L), 100 pmoles/ μ L de cada uno de los primers, 1 U de Taq Polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Pol, Promega, 5 U/ μ L), y se aforó a 25 μ L con agua miliQ® estéril. La PCR se llevó a cabo en un Termociclador ABI®. Las condiciones fueron 95°C por 7 min, seguida por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min. a 60°C, 3.5 min a 72°C, y finalmente, 10 min a 72°C, seguido de enfriamiento a 4°C.

3.6. Gel de agarosa para productos de PCR del gen COI_{mt}

El gel de agarosa fue al 1% (0.016 ng/mL de bromuro de etidio) en solución reguladora TBE 0.5X a 100 V durante 30 min, visualizados con luz UV y fotografiados con un fotodocumentador (UVP® Haigh performance ultraviolet transiluminador, modelo TFM-20). Los productos de PCR con un solo fragmento de tamaño esperado fueron enviados en ambos sentidos (*i.e.*, primers *forward* y *reverse*) al servicio de secuenciación del High-Throughput Genomics Unit de Seattle (Washington, EE.UU.), donde se analizaron con un secuenciador automático ABI Prisma 3730xl (Applied Biosystems).

ANEXO 4. Métodos de los análisis genéticos

4.1. Estimación de la diversidad genética con COI_{mt}

Los sitios segregantes son las posiciones en las secuencias de los nucleótidos donde se ha sustituido una base por otra, cuando se comparan dos secuencias, y representan el total de mutaciones. De éstos podemos distinguir los singletons, que nos indican autoapomorfías y los sitios parsimoniosamente informativos. Una autoapomorfía es el carácter derivado único no compartido en uno o más taxones (Arnedo, 1999).

La diversidad nucleotídica (π), indica el grado de diferencia que existe entre dos secuencias de una población proporcional a las secuencias de las mismas, π fue calculada con la siguiente ecuación (Nei, 1987).

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum x_i x_j \pi_{ij}$$

donde x_i representa la frecuencia de la secuencia i , y π_{ij} la proporción de diferencias nucleotídicas entre la secuencia i y j .

La *diversidad haplotípica* (hd), es la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes en una muestra. Este valor se calcula con la ecuación propuesta por Nei (1987).

$$hd = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_i^k p_i^2 \right)$$

donde n es número de muestra, k el número de haplotipo, p_i frecuencia del haplotipo i .

El *estimador de la theta de Waterson* (θ -W) es el número de diferencias esperadas entre alelos cuando se presupone un modelo de sitios infinitos. Se utiliza como estimador de la variación genética global en una población. Este valor se calcula con la ecuación (Nei, 1987):

$$\theta_w = 2N\mu$$

donde N es el tamaño efectivo poblacional y μ es la tasa de mutación (Watterson, 1975).

4.2. Diferenciación de poblaciones con microsatélites

El AMOVA (Análisis de Varianza Molecular) utilizando los índices de fijación R_{ST} y F_{ST} , con 10,000 permutaciones y una significancia de $p < 0.05$. El valor estimado se obtuvo con el programa Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010). El cual evalúa la estructura genética en un grupo y determina si la fuente de variación está dentro o entre poblaciones (Excoffier *et al.*, 1992). La comparación de los estimados de R_{ST} y F_{ST} puede ser útil para conocer los cambios en la diferenciación genética entre poblaciones a diferentes escalas de tiempo (Slatkin, 1995). Debido a que R_{ST} se basa en el método de varianza en los tamaños de los alelos y F_{ST} se basa en el método de número de diferente de alelos. El índice de F_{ST} propuesto por Wright (1951) supone un modelo de alelos infinitos y se calcula con base en el número de diferencias pareadas. El estimado de R_{ST} propuesto por Slatkin (1995) se ajusta al modelo generalizado de mutación por pasos (SMM), contempla la memoria en el proceso de mutación de los alelos y se calculan con

base en la proporción de diferencias, haciéndolo adecuado para estimaciones con datos de microsatélites. Los valores de diferenciación de F_{ST} y R_{ST} observados se analizaron a partir de la correlación que realizó Morales-García (2012), estableciendo rangos de estructuración genética baja ($F_{ST}<0.05$), moderada ($0.1>F_{ST}>0.05$, y $R_{ST}<0.4$) y alta ($F_{ST}>0.10$, y $R_{ST}>0.4$).

4.3. Estructura genética con microsatélites

El programa corrió con 100,000 y 250,000 iteraciones después del *burn-in* de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC). El modelo de *Admixture* y 10 repeticiones de cada número de poblaciones genéticas ($K1-K10$) con 25 iteraciones de cada serie de poblaciones genéticas fue usado para el análisis. El valor de K se estimó mediante el método de Evanno *et al.* (2005). El análisis se realizó mediante el programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000).

4.4. Diferenciación y estructuración con COInt

Los valores de diferenciación genética varían dependiendo del método de estimación y del modelo de mutación supuesto. Lo que no es posible fijar un valor de estructuración para todos los métodos. La información de flujo genético puede ser obtenida con el cálculo de la medida F_{ST} propuesta por Hudson *et al.* (1992b) o N_{ST} de Lynch y Crease (1990). El índice de F_{ST} propuesto por Wright (1951) supone un modelo de alelos infinitos y se calcula con base en el número de diferencias apareadas.

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_w}{H_b} \quad N_{ST} = \frac{\hat{V}_b}{\hat{V}_w + \hat{V}_b}$$

El estimador N_{ST} es el análogo del F_{ST} (Hudson *et al.*, 1992b). La diferencia es que el N_{ST} utiliza la corrección de Jukes y Cantor (1969).

Diferenciación de poblaciones. El análisis de varianza molecular espacial (SAMOVA) simula K grupos de n localidades, identifica barreras genéticas y calcula el valor de Φ_{CT} , que es la proporción total de variación genética debida a las diferencias entre los grupos. El valor más alto de Φ_{CT} en K grupos genéticos indica la máxima diferencia entre grupos y la mayor similitud dentro de las localidades de cada grupo (Dupanloup *et al.*, 2002). La prueba se realizó con el programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002),

para lo cual se usaron 100 condiciones iniciales, se exploraron valores desde $K = 2$ hasta $K = 10$ y se eligió el caso que reportó el valor más alto de Φ_{CT} .

A partir de los resultados anteriores se realizó un AMOVA con los grupos asignados y analizando a las poblaciones como un solo grupo. Este método estadístico permite determinar el grado de diferenciación poblacional a partir de datos moleculares, procesando los datos como una matriz de presencia-ausencia (base nucleotídica, fragmento de restricción, eventos mutacionales). Luego se calcula una matriz de distancias euclidianas entre pares de haplotipos, la cual es dividida en submatrices que representan las subdivisiones en la población. Éstas se arreglan de manera que las submatrices en la diagonal de la matriz total sean pares de individuos en la misma población; mientras que aquéllas por afuera de la diagonal representan los pares de individuos de diferentes poblaciones. De la suma de diagonales en las matrices y submatrices se obtienen las sumas de cuadrados para varios niveles jerárquicos (Excoffier *et al.*, 1992), y se usan para realizar un análisis anidado de varianza.

Los componentes de la varianza se usan para calcular una serie de estadísticos F , que resumen el grado de diferenciación entre subdivisiones jerárquicas. Estos estadísticos son análogos a los estadísticos F de Wright. La diferencia entre ambos índices es que al no poder utilizar la heterocigosis en marcadores mitocondriales, se emplean la diversidad nucleotídica de los haplotipos. El programa Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010) se usó para realizar la prueba de AMOVA, y se calcularon los índices de fijación, Φ_{ST} . La prueba se realizó con 50,000 permutaciones y una significancia de $p < 0.05$. También se calcularon los índices de Φ_{ST} entre pares de grupos genéticos, utilizando 10,000 permutaciones.

4.5. Flujo genético entre poblaciones de *A. ludens* con microsatélites

El grado de conexión entre las poblaciones depende de la cantidad de flujo genético existente entre ellas. La medición más empleada es el número efectivo de migrantes por generación (Nm), el cual se estima en función de F_{ST} (Wright, 1943). También, se ha propuesto un modelo basado en la teoría de la coalescencia para calcular las tasas de migración asimétricas en poblaciones con diferentes tamaños efectivos de población.

La inferencia de la tasa de migración entre los grupos genéticos de *A. ludens* se realizó mediante el programa Migrate-N 3.2.6 (Beerli y Felsenstein 1999, 2001; Beerli, 2006). El método utiliza MCMC y las frecuencias alélicas para analizar genealogías probables con diferentes longitudes de rama, y estimar eventos de migración. Los parámetros empleados fueron un modelo de mutación browniana para microsatélites, estrategia de análisis con inferencia bayesiana, calentamiento de 10,000 iteraciones y cadena de 1.0×10^7 iteraciones muestreada cada 1000. Se utilizaron cuatro cadenas con temperaturas $T_1 = 1.0$, $T_2 = 1.5$, $T_3 = 3.0$ y $T_4 = 1.0 \times 10^6$. Los demás parámetros fueron los establecidos automáticamente por el programa. La importancia de la migración sobre la mutación, para traer nuevas variantes a cada grupo, está dado por el valor de M ; si $M > 1$ indica que la migración contribuye más que la mutación en el aporte de variación genética dentro de las poblaciones (Beerli y Felsestein 1999, 2001).

El método utiliza MCMC y las frecuencias alélicas para analizar genealogías probables con diferentes longitudes de rama y estimar eventos de migración. Los parámetros empleados fueron un modelo de mutación browniana para microsatélites, estrategia de análisis con inferencia bayesiana, calentamiento de 10,000 iteraciones y cadena de 1.0×10^7 iteraciones muestreada cada 1000. Se utilizaron cuatro cadenas calientes con temperaturas $T_1 = 1.0$, $T_2 = 1.5$, $T_3 = 3.0$ y $T_4 = 1.0 \times 10^6$. Los demás parámetros fueron los establecidos automáticamente por el programa. La importancia de la migración sobre la mutación, para traer nuevas variantes a cada grupo, está dado por el valor de M ; si $M > 1$ indica que la migración contribuye más que la mutación en el aporte de variación genética dentro de las poblaciones (Beerli y Felsestein 1999, 2001).

4.6. Redes haplotípicas con COImt

Las redes se elaboraron con los programas TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) y Network 4.6.1.1 (Bandelt *et al.*, 1999; Polzin *et al.*, 2012). En el primer caso con la opción de *indels*, como quinto estado de carácter. El programa utiliza parsimonia estadística que estima el número máximo de diferencias entre haplotipos, justificadas por un límite de probabilidad de parsimonia (0.95). El algoritmo calcula la probabilidad de parsimonia para los haplotipos diferenciados por un paso, y si es mayor al límite establecido, conecta y forma redes con estos haplotipos. Posteriormente, el algoritmo calcula la probabilidad para los haplotipos diferenciados por dos pasos, y si es mayor al límite, conecta las redes de un paso por medio de estos haplotipos. El algoritmo continúa

evaluando la probabilidad para haplotipos diferenciados por más pasos hasta que, el límite establecido de parsimonia es superado (Clement *et al.*, 2000); mientras que la red elaborada con Network (Bandelt *et al.*, 1999; Polzin *et al.*, 2012) utiliza el método basado en probabilidades con el algoritmo “median joining”. Éste programa fue usado para reconstruir redes, para inferir tipos ancestrales, ramificaciones evolutivas y variantes, y estimar dataciones. Los algoritmos están diseñados para el ADN mitocondrial.

4.7. Filogenia molecular con COI_{mt} bajo máxima parsimonia, máxima verosimilitud e interferencia bayesiana.

El modelo evolutivo de las secuencias se determinó con el programa jModel Test 2.1.3 (Darriba *et al.*, 2012). Este modelo es utilizado para encontrar las probabilidades con las que suceden los eventos de sustituciones nucleotídicas, y se determina mediante una prueba estadística de proporción de verosimilitud. La filogenia del grupo se reconstruyó bajo distintos métodos de búsqueda: *Máxima Parsimonia*, *Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana*, cuyos métodos específicos se incluyen más adelante. Adicionalmente, se realizó una reconstrucción filogenética con el algoritmo *Neighbor-joining*, el cual es un método de distancia que agrupa las secuencias más cercanas entre sí, minimizando la longitud total del árbol. Las distancias son una estimación del número total de cambios que ocurre entre las secuencias. Este método se realizó con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011), usando 1,000 réplicas de *bootstrap* con el modelo de sustitución de dos parámetros de Kimura (1980).

La búsqueda del árbol más parsimonioso se hizo con dos modelos heurísticos: *Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana*. El primero, es el método más general para la obtención de estimaciones estadísticas, a partir de la adopción de cierto modelo evolutivo. La verosimilitud de un árbol es la probabilidad de que las diferencias entre observaciones (caracteres) puedan ser explicadas por un árbol determinado suponiendo un modelo de evolución específico (Arnedo, 1999); es decir, estima probable es que las secuencias dadas puedan haber evolucionado en un árbol particular, dado un modelo de probabilidades de sustitución nucleotídica. El árbol óptimo es aquél que tienen la probabilidad de haber producido los datos observados (Freeman, 2007). Para éste

modelo se utilizó el programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), obteniendo 1000 réplicas de soporte *bootstrap* no paramétricos.

El segundo método es un procedimiento relacionado con los métodos de máxima verosimilitud, que busca inferir la probabilidad de los árboles en sí mismos, y no solo la probabilidad de que un árbol pueda producir los clados observados (Freeman, 2007). El árbol consenso de inferencia bayesiana, se elaboró tomando en cuenta 30,000 como número de generaciones, con 100 en frecuencia del muestreo, y cuatro cadenas. Se corrieron dos cadenas independientes, cada una con 1.0×10^7 generaciones muestreadas cada 100 iteraciones. Se usaron cuatro cadenas calientes con un factor escalar $T = 0.18$. El modelo de mutación fue GTR con cuatro categorías gamma. Se descartaron el 50% de los árboles, y con los árboles restantes se construyó un árbol de consenso con mayoría del 50%. El programa fue Mr. Bayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). El árbol que resultó se editó con FigTree 1.4.0 (Rambaut, 2012).

Por otra parte, se construyó un árbol usando los haplotipos con el programa Beast 1.6.2 (Drummond *et al.*, 2007). Éste programa construye un árbol con el algoritmo de inferencia Bayesiana (MCMC) para lo cual se usó de un reloj molecular data la divergencia de los taxones. En seguida, el programa BEAUTi 1.5 (Drummond *et al.*, 2013) se usó para construir el archivo de entrada, en el cual se indicó el grupo externo (*Anastrepha* spp.) y el modelo evolutivo de las secuencias (GTR). El número de cadenas fue de 100 millones. Los resultados se analizaron con Tracer 1.5.0 (Rambaut *et al.*, 2009), y se resumió la información con el programa TreeAnnotator 1.7.5 (Rambaut *et al.*, 2013), luego de haber eliminado los primero 1000 árboles con *burn-in*. El resultado fue un árbol consenso y finalmente, el árbol se editó con el programa FigTree 1.3.1 (Roderick, 1996). Los haplotipos se mapearon de forma individual. En la reconstrucción se consideraron como grupos externos secuencias del gen COI_{mt} de *A. striata* (Manaus, Brazil; JN002434.1), *A. distincta* (Santa Ines, Brazil; AF420635.1), *A. fraterculus* (Chiapas, México; AF420637.1), *A. obliqua* (Los Tuxtlas, Veracruz, México, AF420643), *A. suspensa* (Florida, EUA, AY944997.1), *Drosophila melanogaster* (Massachusetts, EUA, HQ979010.1) y *Drosophila simulans* (Massachusetts, EUA, HQ979110.1).

4.8. Demografía histórica con COImt

Para conocer eventos demográficos antiguos, como cuellos de botellas y expansiones demográficas, se calcularon la D de Tajima (1989) con el programa DnaSP 5.10 (Rozas, 2010), y la F_S de Fu (Fu, 1997) con Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2010), que se basan en un modelo de sitios infinitos no recombinantes. La prueba estadística se basa en distinguir entre una secuencia de ADN que evoluciona únicamente por efecto de la mutación (neutra), de una que evoluciona dentro de un proceso no aleatorio, incluyendo selección direccional o balanceadora, o por eventos demográficos, como la expansión o contracción.

La prueba de neutralidad D de Tajima. La prueba de Tajima compara entre el número de sitios segregantes (θ_w) y el número promedio de nucleótidos diferentes (π), los cuales bajo neutralidad deberían ser iguales (o bastante cercanos), pero sensibles a distintos escenarios selectivos (Hedrick, 2011). En particular, la π es poco sensible a la presencia de alelos raros, mientras que la θ_w sí lo es. De esta forma, poblaciones bajo selección direccional (o purificadora) se caracterizan por presentar valores de $\theta_w > \pi$, generando valores de D negativos cuando la estructura genética ha sido influenciada por una expansión poblacional rápida; mientras que poblaciones bajo selección balanceadora se caracterizan por presentar valores de $\pi > \theta_w$, generando valores de D positivos cuando la población ha experimentado un "cuello de botella" reciente. Cuando sea igual a cero, la mutación y la deriva están en equilibrio (Tajima, 1989).

La prueba de F_S de Fu. El cálculo la F_S de Fu (1993) evalúa la probabilidad de observar una muestra aleatoria neutral con un número similar o menor a la muestra observada, dada el número de diferencias pareadas observadas. La prueba se basa en la frecuencia haplotípica y el valor condicional de θ , que es igual a $4N\mu$ para individuos diploides y $2N\mu$ para individuos haploides, N es el tamaño poblacional efectivo, y μ la tasa mutacional por secuencia por generación. Para obtener la significancia del estadístico F_S , se generan, mediante simulaciones coalescentes (Hudson, 1990), muestras aleatorias bajo la hipótesis de neutralidad y de equilibrio demográfico. Finalmente, el valor de p del estadístico F_S se obtiene analizando la proporción de los valores aleatorios F_S simulados iguales o menores a los valores observados. Fu (1997) encontró que este estadístico es significativo a partir de un valor $p < 0.02$ y corresponde al umbral $p < 0.05$ de la D de Tajima. Se ha encontrado que estas pruebas de neutralidad, y principalmente

la prueba F_S de Fu (1997), son muy sensibles a los cambios demográficos de las poblaciones, por lo que se han utilizado ampliamente para probar expansiones poblacionales, y cuellos de botella. Si los efectos afectan a muchos loci independientes hay una interpretación demográfica y si sólo afecta a unos pocos loci no ligados entonces hay selección a nivel local dentro de esas partes del genoma. Los valores negativos elevados de F_S , generalmente indican que la población se ha expandido (Excoffier *et al.*, 2010).

Distribución de mismatch. Una distribución *mismatch* es la distribución del número observado de diferencias entre pares de haplotipos. La distribución produce relaciones pareadas entre las secuencias hacia atrás en el tiempo. Dado que la cantidad de diferencia entre alelos de un mismo gen depende del tiempo de divergencia podemos inferir que el tiempo donde confluyen varios pares de secuencias es aquél en el cual la población experimentó un cambio de tamaño. La distribución de estas diferencias usualmente es multimodal en muestras de poblaciones en equilibrio demográfico, pero generalmente son unimodales en poblaciones que pasaron por una expansión demográfica reciente (Slatkin y Hudson, 1991; Rogers y Harpending, 1992; Schneider y Excoffier, 1999; Excoffier *et al.* 2010) o por una expansión de rango con altos niveles de migración (Ray *et al.*, 2003). De esta manera, es posible obtener información sobre los tamaños poblacionales pasados de una especie (Rogers, 1995). Los datos genéticos permiten conocer los cambios demográficos de las poblaciones y el tiempo transcurrido durante este proceso (Rogers, 1995). Esto es posible ya que 1) la distancia genética entre organismos mide la distancia genealógica que hay entre ellos y 2) la distancia genealógica tiende a crecer con el tamaño de muestra (Rogers, 1995).

Skyline plot. La base de la interferencia bayesiana considera la estocasticidad de los procesos que reflejan las genealogías actuales y permiten hacer estimaciones más puntuales de la variación del tamaño efectivo de las poblaciones (N_e) a través del tiempo y calculan en el tiempo al ancestro común más reciente (TMRCA por sus siglas en inglés; Drummond y Rambaut, 2007). El programa Beast utiliza un modelos Bayesiano con el método de MCMC, que estima la distribución posterior de los parámetros mencionados a partir de las secuencias de ADN. El Bayesian Skyline Plot (BPS) es un método para estimar dinámicas poblacionales del pasado a través del tiempo y es independiente de un modelo demográfico predefinido. Es más sensible en la

estimación de parámetros demográficos en comparación con métodos paramétricos y métodos demográficos basados en coalescencia, porque calcula el N_e en diferentes eventos de coalescencia y resuelve un intervalo de credibilidad que provee escenarios más realistas de las fluctuaciones del N_e a través del tiempo (Drummond *et al.*, 2005). Utilizando modelos no paramétricos y herramientas de selección de modelos es posible conocer el modelo paramétrico $N(t)$, que estima el tamaño efectivo poblacional a lo largo del tiempo (Strimmer y Pybus, 2001). En este trabajo se calculó el *Skyline Plot* generalizado para estimar el tamaño poblacional de las muestras de *A. ludens* a lo largo del tiempo. Este método convierte la tasa de eventos coalescentes de secuencias homólogas en un diagrama que gráfica el tamaño efectivo poblacional, respecto al tiempo (Pybus *et al.*, 2000). El N_e y el TMRCA se calcularon utilizando el programa Beast 1.6.2 (Drummond *et al.*, 2007). En este análisis incluyeron los 120 individuos de *A. ludens*, se consideraron las secuencias como un sólo haplotipo (ya que son de mitocondrias), se escogió el modelo de sustitución general de tiempo reversible (HKY) con cuatro categorías gamma, sin heterogeneidad entre los sitios de las secuencias, se escogió el reloj relajado *log* normal (recomendación de los autores), se utilizó una tasa de sustitución estándar para mitocondria en insectos por sitio por millón de años de 1.5×10^{-6} (Brower, 1994) y se escogió como *prior* de los árboles el *Skyline Plot* que, estima el tamaño efectivo poblacional a lo largo del tiempo. En una sola corrida se realizaron 150 millones de generaciones de cadenas de Markov de Monte Carlo para alcanzar distribuciones de probabilidad con una distribución normal. Los parámetros se guardaron cada 10 mil generaciones, y se utilizaron para generar la gráfica de cambio demográfico a lo largo del tiempo, y estimar la distribución de probabilidad, de los parámetros calculados.