

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



**ANÁLISIS POBLACIONAL Y EVOLUTIVO EN
“BACTROCERA OLEAE” (GMELIN) MEDIANTE EL USO
DE MARCADORES MOLECULARES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Dolores Segura Buitrago

Bajo la dirección de la doctora
María Dolores Ochando González

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1721-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ANÁLISIS POBLACIONAL Y EVOLUTIVO EN *Bactrocera oleae* (Gmelin)
MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES.

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presenta
M^a Dolores Segura Buitrago

V^oB^o

DIRECTORA DE LA TESIS

M^a Dolores Ochando González

MADRID, 2002

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que, de una forma u otra, me ayudaron en la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. Lacadena, Director del Departamento de Genética, por las facilidades concedidas en la realización de este trabajo en dicho Departamento.

A la Dra. M^a Dolores Ochando, mi directora de Tesis, por concederme la oportunidad de realizar este trabajo y por su ayuda en la realización del mismo.

Al Dr. Lucas Sánchez y la Dra. M^a Fernanda Ruiz, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), por permitirme trabajar con ellos en la elaboración de la genoteca de la especie *Bactrocera oleae*.

A los Dres. Francisco Peña y Ana Alemany, por proporcionarme información acerca del cultivo del olivo en nuestro país y el control biológico de los insectos-plaga.

A F.A. El Haadi, A. Alemany, F. Alonso, A. Burnell, J.A. Cortés, C. Fleming, A. García-Ortiz, T. Grové, A. Hanler, D.S. Haymer, E. Hernández-Ortiz, E. Jag, J.M. Llorent, S. Olmedo, N. Papadopoulos, S. Qulici, M. Robson, T. Rodríguez, M. Sala, S. Sibbett y N. Zenz por colaborar en la recolección del material biológico utilizado en el presente estudio.

A José Barrios, autor de algunas de las fotografías presentes en este trabajo.

A Mari Carmen, porque todo lo ha tenido siempre a punto y siempre con una sonrisa.

A la Dra. Ana Margarita Figueiras, por sus consejos e indicaciones acerca de este trabajo, que me han sido muy útiles.

A los profesores del Departamento, por los cafés, las cañas y porque siempre he podido acudir a ellos en busca de ayuda.

A mis compañeros, porque sin ellos todo hubiera sido más aburrido, y especialmente a Paz y Beatriz, que son las que me han sufrido más de cerca y han compartido más “cosas” (y alguna que otra comida) conmigo. A Carmencita, que merece estar aparte por todo lo que me ha enseñado y porque es una estupenda amiga. Y, claro, a Isabel y Andrés, por tantos ratos agradables y porque nunca he dudado de que podía contar con ellos.

Por último, a todos mis amigos “de fuera”, porque siempre me han apoyado y han hecho más fáciles los momentos difíciles.

Y a mi familia, por todo, si no fuera por ellos no habría Tesis que defender.

“Estudio poblacional y evolutivo de la especie *Bactrocera oleae* (Gmelin) mediante el uso de marcadores moleculares”

La familia Tephritidae, integrada por las moscas conocidas como “moscas de la fruta”, constituye probablemente la familia de dípteros más importante desde el punto de vista económico. La especie *Bactrocera oleae* forma parte de esta familia y es una importante plaga del olivo. La presente Tesis se puede resumir en tres puntos principales. En primer lugar se trata de esclarecer las relaciones filogenéticas entre los miembros de la familia a la que pertenece la especie *Bactrocera oleae* (familia Tephritidae) mediante el análisis de una secuencia de DNA mitocondrial. El segundo punto consiste en el análisis de la estructura poblacional de la especie *Bactrocera oleae* por medio del empleo de la técnica RAPD-PCR. Por último, se construyó una genoteca de la especie *Bactrocera oleae*.

Palabras clave: Filogenias, mtDNA, RAPD-PCR, genoteca

“Population genetics and evolutionary study in *Bactrocera oleae* (Gmelin) with molecular markers”

Family Tephritidae, called “true fruit flies”, is probably the most economically important family of flies. *Bactrocera oleae* species, which belongs to this family, is an important plague of olive. This Thesis can be summarized in three main points. First of all, we wanted to clarify phylogeny of the family Tephritidae. Second, we analysed population structure of the species *Bactrocera oleae* by using RAPD-PCR technique. Third, we made a genomic gene library of *Bactrocera oleae* species.

Key words: Phylogeny, mtDNA, RAPD-PCR, gene library.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Relaciones filogenéticas en la familia Tephritidae	2
I.2. Estructura poblacional de la especie <i>Bactrocera oleae</i>	9
I.3. Genoteca genómica de la especie <i>Bactrocera oleae</i>	14
II. MATERIAL Y MÉTODOS	15
II.1. Material	16
II.1.1. Material para el estudio de las relaciones filogenéticas en la familia Tephritidae	16
II.1.2. Material para el estudio de la estructura poblacional de la especie <i>Bactrocera oleae</i>	18
II.2. Métodos	19
II.2.1. Extracción de DNA	19
II.2.2. Amplificación de un fragmento de DNA mitocondrial	20
II.2.3. Secuenciación automática	22
II.2.4. RAPD-PCR	23
II.2.5. Construcción de una genoteca de la especie <i>Bactrocera oleae</i>	24
II.2.5.1. Digestiones parciales de DNA genómico de la especie <i>Bactrocera oleae</i>	24
II.2.5.2. Fraccionamiento por tamaño en gradiente de sacarosa	25
II.2.5.3. Ligamiento de los fragmentos de DNA a los brazos del bacteriófago	25
II.2.5.4. Empaquetamiento del DNA recombinante	26
II.2.5.5. Titulación	26
II.2.5.6. Amplificación de la genoteca	26

II.3. Análisis estadístico	27
II.3.1. Análisis de las secuencias de DNA mitocondrial	27
II.3.1.1. Alineamiento y análisis de las secuencias	27
II.3.1.2. Métodos de construcción de árboles filogenéticos	28
II.3.1.3. Construcción de árboles filogenéticos	30
II.3.2. Análisis de RAPDs	31
II.3.2.1. Índice de diversidad	33
II.3.2.2. Índice de similitud	33
II.3.2.3. Distancias genéticas	33
II.3.2.4. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)	34
II.3.2.5. Test de Mantel	35
II.3.2.6. Cálculo de F_{ST} y Nm	36
II.3.2.7. Construcción de dendrogramas	37
II.3.2.8. Análisis de coordenadas principales	38
III. RESULTADOS	39
III.1. Relaciones filogenéticas	40
III.1.1. Análisis de las secuencias	40
III.1.2. Distancias genéticas	44
III.1.3. Árboles filogenéticos	45
III.2. Estructura poblacional de la especie <i>Bactrocera oleae</i>	47
III.2.1. Índice de diversidad de Shannon	48
III.2.2. Índice de similitud	49
III.2.3. Distancias genéticas	49
III.2.4. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)	49
III.2.5. Test de Mantel	51
III.2.6. Valores de F_{ST} y Nm	51
III.2.7. Dendrogramas	52
III.2.8. Análisis de coordenadas principales	53

III.3. Genoteca de la especie <i>Bactrocera oleae</i>	55
IV. DISCUSIÓN	56
IV.1. Relaciones filogenéticas en la familia Tephritidae	57
IV.1.1. Análisis de las secuencias	58
IV.1.2. Identificación taxonómica	60
IV.1.3. Distancias genéticas	62
IV.1.4. Árboles filogenéticos	64
IV.2. Estructura poblacional de <i>Bactrocera oleae</i>	71
IV.2.1. Cantidad de variabilidad genética	71
IV.2.2. Distribución de la variabilidad genética	73
IV.2.3. Relaciones entre poblaciones: dendrogramas y análisis de coordenadas principales	78
IV.2.4. Identificación de la especie <i>Bactrocera oleae</i>	80
IV.3. Genoteca de la especie <i>Bactrocera oleae</i>	81
V. CONCLUSIONES	83
VI. RESUMEN	86
VII. BIBLIOGRAFÍA	90
VIII. DIRECTORIO DE PÁGINAS WEB	107
TABLAS	109
FIGURAS	142

Introducción.

I. INTRODUCCIÓN.

La familia Tephritidae está constituida por las moscas normalmente conocidas como “moscas de la fruta”. Se encuentra entre las familias de dípteros con mayor número de especies (actualmente se reconocen 4.352 especies; dato procedente del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), 2001, URL: <http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera>) y es la más importante desde el punto de vista económico. Las larvas de la mayoría de las especies se desarrollan en los órganos portadores de semillas de las plantas y gran parte de ellas atacan frutas comerciales. A esta familia pertenece la especie *Bactrocera oleae* (Gmelin), también llamada mosca del olivo, que es la plaga más importante de esta planta.

La introducción de nuevas especies (o biotipos) de plagas es un problema muy serio para muchos países. Tanto el aumento de los intercambios comerciales como los cambios climáticos hacen pensar que la introducción de plagas se incrementará en el futuro. Por tanto, se impone un conocimiento tan profundo como sea posible de estas especies, de las relaciones entre ellas y de los flujos génicos. También es necesario poner a punto técnicas que permitan su rápida e inequívoca identificación.

Las técnicas moleculares desarrolladas en las últimas décadas constituyen herramientas de un enorme valor para la identificación de plagas. Su potencial para detectar variabilidad a diferentes niveles nos permite tanto aumentar la precisión de la clasificación de las distintas especies y nuestra capacidad de distinguirlas, como conocer la estructura poblacional y monitorizar los flujos génicos de una determinada especie.

I.1. Relaciones filogenéticas en la familia Tephritidae.

La familia Tephritidae, a la que pertenece la especie *Bactrocera oleae*, es una de las familias de dípteros con mayor número de miembros (más de 4000 especies descritas clasificadas en cerca de 500 géneros) y está representada en todas las regiones del mundo excepto la Antártida. La mayoría de las especies atacan a los órganos portadores de semillas de las plantas, incluyendo frutas blandas y flores, por lo que se considera que constituyen el grupo de plagas más importante para la agricultura de todas las familias de moscas (Foote *et al.*, 1993). Los tefritidos están presentes en todas las áreas geográficas productoras de fruta y su importancia económica puede resumirse de la siguiente manera (White and Elson-Harris, 1994):

- atacan frutas producidas comercialmente,

- algunas especies se han convertido en plagas en regiones muy distantes de aquellas de las que proceden,
- es necesario imponer restricciones (cuarentenas) para evitar una expansión aún mayor de las plagas y
- la regulación impuesta por un país importador puede incluso privar a un país productor de un mercado potencial, o forzarle a llevar a cabo un costoso tratamiento de desinsectación.

Alrededor de 70 especies de tefrítidos se consideran plagas importantes y muchas otras especies son plagas menores o potenciales (White and Elson-Harris, 1994). Las frutas son los cultivos más afectados por el ataque de las moscas de esta familia. Los cinco géneros más importantes desde el punto de vista económico son también los que abarcan un mayor número de especies: *Bactrocera* (520 especies), *Dacus* (243), *Anastrepha* (198), *Ceratitidis* (78) y *Rhagoletis* (69). (Datos procedentes del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), 2001, URL: <http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera>).

Para hacernos una idea de la importancia económica de estas moscas puede resultar útil un ejemplo. Dowell y Wange (1986) enumeraron 8 especies de tefrítidos que suponían una amenaza importante para California y estimaron que el establecimiento de estas plagas en el estado causaría unas pérdidas debidas al daño en los cultivos de 910 millones de dólares y que el coste en mecanismos de control sería de 290 millones de dólares.

La investigación en el campo de la sistemática constituye la base para otras áreas de investigación dentro del campo de la biología, tales como el estudio del comportamiento, la ecología y el control de plagas. El estudio de la filogenia de esta familia ha demostrado ser vital para la gestión de los programas de cuarentena y control y erradicación de plagas, así como para los estudios básicos en biología evolutiva. Los estudios de tefrítidos han contribuido al desarrollo de nuestra comprensión de los procesos de evolución y especiación (Bush, 1975; Feder *et al.*, 1988; McPherson *et al.*, 1988; Craig *et al.*, 2001). Así, se considera que existe una importante correlación entre la pertenencia a los taxones de nivel superior dentro de esta familia, desde subfamilia a subtribu, y la estrategia de alimentación y el rango de especies de plantas parasitadas por estos insectos (White, 1988; McAlpine, 1989). Desde este punto de vista, la resolución de la filogenia de los tefrítidos proporcionaría una información interesante acerca del

origen de la fitofagia y de los patrones de evolución de la asociación al hospedador. En cuanto al proceso de especiación, el complejo de especies *Rhagoletis pomonella* ha estado en el centro de una discusión sobre la especiación simpátrida (Bush, 1966 y 1969; Feder *et al.*, 1988; Berlocher, 1999; Berlocher and Feder, 2002). Actualmente se debate la posibilidad de que muchos insectos fitófagos con un hospedador específico se hayan originado debido a la adaptación a una nueva especie vegetal. Si esto fuera cierto, la especiación simpátrida tendría implicaciones tremendas en nuestra comprensión de las especies y sus orígenes, de la biodiversidad, la coevolución insecto-planta, la ecología y la sistemática, así como una gran importancia práctica en el tratamiento de las plagas de insectos.

A pesar de los numerosos estudios que se han llevado a cabo en el campo de la taxonomía, la mayoría basados en caracteres morfológicos, aún no existe una clasificación satisfactoria de esta familia. La taxonomía de tefrítidos tiene una larga historia (más de dos siglos) con más de 4.500 especies descritas desde mediados del siglo XVIII. El primer intento serio de establecer las categorías superiores, en especial subfamilias y tribus en la clasificación de los tefrítidos la llevó a cabo Hering (1947, citado en Han and McPherson, 1994). En su clave se basan las clasificaciones modernas. Su sistema, con 8 subfamilias, ha sido revisado posteriormente sin que se haya alcanzado un consenso. La clasificación de White y Elson-Harris (1994) considera la existencia de 3 subfamilias y 13 tribus. En 1999 Korneyev, basándose en caracteres morfológicos, incluye en la familia Tephritidae a la subfamilia Taschiniscinae, que hasta ese momento se había considerado como una familia independiente. En algunas clasificaciones, como la de White y Elson-Harris (1994), se incluyen todos los taxones de alto rango de la familia Tephritidae, con excepción de los que pertenecen a las subfamilias Dacinae y Tephritinae, en la subfamilia Trypetinae, mientras que en otras ocasiones se les divide en varias subfamilias. Así, la clasificación facilitada por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (The Diptera Site, Estados Unidos, 2001. URL: <http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera/tephriti>), que a su vez se basa en las clasificaciones de Korneyev (1999) y Norrbom y colaboradores (1999a), agrupa a los tefrítidos en 6 subfamilias que a su vez contienen un total de 27 tribus. Por el contrario, la clasificación facilitada por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Estados Unidos, 2001. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>) considera que la familia se divide en 5 subfamilias y 16 tribus. La clasificación de los dípteros que se facilita en esta dirección

la ha llevado a cabo Michael Ashburner usando como fuente para la familia Tephritidae la clasificación de Norrbom y colaboradores (en preparación). Es decir, se han definido varias subfamilias y tribus, pero los límites de muchos de estos taxones y las relaciones entre ellos no están claros y es necesario comprobar la naturaleza monofilética de algunos.

En definitiva, no existe por el momento una clasificación universalmente aceptada de esta familia. Además, como se ha comentado, las clasificaciones existentes hasta el momento, basadas en caracteres morfológicos y ecológicos, generalmente no permiten inferir las relaciones filogenéticas entre los grupos. Los problemas más comunes en la clasificación y determinación de la filogenia de esta familia son las sinonimias y homonimias y el establecimiento de grupos supraespecíficos basados en caracteres dudosos. Esta situación puede deberse a una combinación de factores, entre ellos el gran tamaño del grupo y el hecho de que los primeros estudios sistemáticos tuvieran un carácter marcadamente regional y se centraran en la descripción de especies, así como a la dificultad de encontrar marcadores taxonómicos adecuados. Prácticamente todos los caracteres sistemáticos que se pueden utilizar en la clasificación de la familia Tephritidae, especialmente en taxones de nivel superior al de género, son autopomorfias (caracteres derivados) de taxones particulares. Es por ello que recientemente se ha propuesto la utilización de nuevas fuentes de caracteres (morfología de larvas y pupas, caracteres moleculares, etc.) para solventar este problema. Un problema añadido es el de que las clasificaciones basadas en caracteres morfológicos no pueden pasar del nivel de "morfoespecie". Existen cada vez más evidencias de que algunas de las especies polífagas y de distribución amplia, son más bien un grupo de especies morfológicamente inseparables pero biológicamente distintas (Steck, 1991; Drew *et al.*, 1994). A estos grupos se les denomina generalmente complejo de especies y a las especies que los constituyen especies gemelas. Este es el caso de los complejos *Rhagoletis pomonella* (Walsh), *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), *Bactrocera dorsalis* (Hendel), *Rhagoletis cingulata* (Loew) y *Rhagoletis tabelaria* (Fitch).

Las técnicas moleculares desarrolladas en las últimas décadas, al ofrecernos una fuente casi ilimitada de caracteres taxonómicos, pueden ser de gran ayuda no sólo en la resolución de estos problemas, sino también en la revisión de las clasificaciones existentes.

Hacia principios de los años 60 se produce un avance de gran importancia para la genética evolutiva y de poblaciones: se desarrolla la técnica denominada electroforesis de

proteínas (Hunter and Market, 1957), que facilita el estudio de la variabilidad genética. Las proteínas más empleadas para este fin son las isoenzimas. Los primeros trabajos se llevaron a cabo en el campo de la genética molecular de poblaciones en el año 1966 (Hubby and Lewontin y Lewontin and Hubby en *Drosophila pseudobscura* y Harris en humanos). Pronto se aplicó esta técnica al esclarecimiento de la taxonomía y las relaciones filogenéticas entre los taxones más diversos, desde vertebrados (Rainboth and Whitt, 1974) hasta algas (Seckbach and Fredrick, 1980). Por supuesto, los insectos no constituyen una excepción; ya en la década de los 60 aparece el primer estudio filogenético en insectos (Johnson and Bealle, 1968). En cuanto a la aplicación de la técnica a la dilucidación de las relaciones entre especies de la familia Tephritidae, cabe destacar el trabajo más reciente de Malacrida y colaboradores (1996).

Hacia finales de los años 70 y principios de los 80 se desarrollaron nuevas técnicas que permitieron el estudio directo del DNA. En 1979 estaba claro que el DNA mitocondrial (mtDNA) de los animales era la molécula mejor conocida del genoma eucariota (Wilson *et al.*, 1985). El pequeño tamaño del genoma mitocondrial de animales (entre 14,5 y 19,5 Kb) junto con su transmisión casi exclusivamente unisexual por vía materna, la falta de recombinación y el elevado número de copias en la mitocondria hacen que el mtDNA haya despertado el interés de los científicos en el campo de la genética evolutiva y de poblaciones. Por otra parte, aunque como en el caso del DNA nuclear, distintas regiones del DNA mitocondrial presentan distinta tasa de variación, la tasa de evolución del mtDNA es en general más elevada, lo que también constituye una característica de interés. El elevado número de copias por célula hace que la probabilidad de encontrar porciones intactas de mtDNA en un espécimen degradado sea mucho mayor que para los genes nucleares de copia única. Esto es especialmente importante para la sistemática de tefritidos, ya que en muchas ocasiones sólo se dispone de especímenes secos o conservados en alcohol. Es importante tener en cuenta, no obstante, que existen ciertas diferencias en la evolución del DNA mitocondrial entre insectos y vertebrados. Así, la tasa de evolución del mtDNA en insectos parece ser mayor que la de los genes nucleares de copia única (Powell *et al.*, 1986; Solignac *et al.*, 1986; Sharp and Li, 1989) aunque la diferencia no es tan importante como en vertebrados (Brown, 1983). Además, el DNA de insectos es muy rico en A+T (70%-80%), a pesar de la evidencia de que las transiciones (sustituciones de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina) están favorecidas frente a las transversiones (sustituciones de una purina por una pirimidina o viceversa) (DeSalle *et al.*, 1987; Satta *et al.*, 1987). También se ha

observado una elevada tasa de sustituciones en posiciones del codón consideradas “sinónimas” (aquellas en las que la sustitución de un nucleótido no conduce a un cambio del aminoácido codificado) (Moriyama, 1987; Sharp and Li, 1989), aunque la “neutralidad” de estos sitios dentro de la molécula varía (DeSalle *et al.*, 1987).

Los primeros trabajos que estudian el mtDNA aparecen en 1979 y emplean la técnica de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLPs . Los trabajos de Avise y colaboradores (1979 a y b) están enfocados al campo de la genética de poblaciones, mientras que los trabajos de Brown y Wright (1979) y Brown y colaboradores (1979) emplean la técnica desde una perspectiva evolutiva interespecífica más que poblacional. Desde ese momento y hasta nuestros días se ha llevado a cabo un gran número de estudios filogenéticos en insectos utilizando esta técnica (Osakabe *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 1999). En cuanto a los tefritidos, Nakara-Shigehito y colaboradores (2000) aplicaron esta técnica al estudio del complejo de especies *Bactrocera dorsalis*.

Los RFLPs son, por lo general, marcadores de carácter codominante y, además, el número de sondas utilizables es muy elevado. Estas ventajas, entre otras, han sido responsables del extendido uso de los RFLPs en estudios genéticos y filogenéticos. Por otra parte, la técnica de RFLP requiere un proceso largo y costoso, se necesitan para llevarla a cabo elevadas cantidades de DNA y en la mayoría de los casos es necesario el empleo de radiactividad. Además, la ausencia o presencia de sitios de restricción apenas proporciona información sobre el tipo de mutación que ha tenido lugar.

En 1986 aparece una nueva técnica (Mullis *et al.*) que ha producido una verdadera revolución en multitud de campos científicos. Esta técnica, denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite la amplificación de un fragmento de DNA partiendo de cantidades mínimas de material genético, de forma sencilla y en tan solo unas horas. Los fragmentos amplificados pueden ser secuenciados, lo que nos proporciona un conocimiento del fragmento de DNA objeto de estudio mucho más exhaustivo del que obtendríamos por medio de los RFLPs. El incremento en la utilización de secuencias nucleotídicas de mtDNA obtenidas mediante PCR y la posterior secuenciación de los fragmentos amplificados, está permitiendo la acumulación de un gran número de secuencias que se emplean en múltiples campos científicos, entre ellos la taxonomía y la sistemática. La progresiva acumulación de secuencias de mtDNA ha permitido corroborar las relaciones filogenéticas establecidas entre los primates basándose en diferentes

genes (Hasegawa *et al.*, 1990) o ,empleando secuencias de citocromo b, las relaciones entre los sapos de la familia Bufonidae (Graybeal, 1993) o entre las serpientes elápidas (Slowinski and Keogh, 2000), por citar algunos ejemplos.

En cuanto a la aplicación de esta técnica a la sistemática de insectos y, en concreto, dípteros, existen numerosos ejemplos, desde el estudio de familias completas (Scatophagidae: Bernasconi *et al.*, 2000), hasta el de géneros (*Ips*: Cognato and Sperling, 2000) y grupos de especies (grupo de especies *repleta* del género *Drosophila*: Durando *et al.*, 2000). También se han realizado estudios en tefrítidos. Han y McPheron, que ya habían realizado un estudio filogenético de la familia Tephritidae utilizando una secuencia de DNA ribosómico nuclear (1994), utilizan una secuencia mitocondrial de DNA ribosómico para estudiar las relaciones entre taxones de esta familia (1997); posteriormente, Han (2000) utiliza esta misma secuencia de mtDNA para estudiar con más detalle la tribu Trypetini, perteneciente a esta familia. Estos tres trabajos han ayudado a dilucidar aspectos de la filogenia de tefrítidos que no podían ser resueltos por medio de estudios morfológicos y ecológicos. Otros trabajos que utilizan métodos moleculares para inferir las relaciones filogenéticas entre determinados grupos de tefrítidos son los de McPheron y Han (1997), McPheron y colaboradores (1999) y Smith y Bush (1997). Todos ellos demuestran claramente la validez de los datos moleculares para perfeccionar la clasificación de los tefrítidos. Las relaciones inferidas en estos estudios no sólo son congruentes en gran medida con los grupos bien establecidos por las clasificaciones morfológicas, sino que además sugieren relaciones que no se conocían hasta el momento. A pesar de todo, muchos aspectos de la historia filogenética de la familia Tephritidae permanecen sin aclarar.

Así pues, uno de los objetivos de este trabajo fue investigar la utilidad de una nueva región de mtDNA, que comprende el extremo 3' del gen del citocromo b (*cytb*), un gen de RNA transferente de serina (tRNA-Ser) y el extremo 3' del gen de la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (*ND1*) de la cadena complementaria, para la inferencia de relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos de la familia Tephritidae. Para ello se incluyeron 22 especies que representaban dos subfamilias y siete géneros de tefrítidos. Algunas de estas especies son miembros de taxones bastante bien sustentados por los estudios morfológicos. La pertenencia a estos grupos se comparó con la filogenia inferida de nuestros datos, lo que nos permitió comprobar la validez de la técnica. También se incluyeron especies cuyas relaciones

filogenéticas son desconocidas u objeto de controversia; en este estudio se trata de determinar las relaciones filogenéticas entre estas especies y el resto de los tefritidos analizados.

I.2. Estructura poblacional de la especie *Bactrocera oleae*.

Bactrocera oleae es la plaga más importante del olivo (*Olea europea*). Parece ser que existen referencias de infestaciones del olivo en la zona este de la cuenca mediterránea en el siglo III a.C. (Rice, 2000). No obstante, la primera referencia fiable es la de Plinio (siglo I d.C.) sobre una “vermiculatio” de las aceitunas que muchos años compromete su producción (Ruiz, 1948). Aunque posiblemente este insecto fue introducido en la región mediterránea de Europa al mismo tiempo que los olivos silvestres procedentes de África y Asia occidental (aproximadamente en el siglo VIII a.C.), no tenemos referencias muy antiguas sobre su presencia en nuestro país. La primera referencia a “La mosca de los olivos” aparece en un trabajo de Esteban Bartelou aparecido en el año 1805 (Ruiz, 1948).

Los únicos hospedadores naturales de la mosca del olivo son los frutos de las plantas del género *Olea*. En general, las hembras prefieren para la oviposición las variedades con aceitunas grandes. No obstante, son capaces de infestar todas las variedades de olivo, incluyendo las variedades silvestres. Este insecto se distribuye por todo el área mediterránea: sur de Europa, norte de África y Oriente Medio, así como a lo largo de la costa este de África hasta Sudáfrica. También está presente en California (Estados Unidos), donde fue detectada por primera vez en 1998 (Rice, 2000). La opinión generalizada de los especialistas es que este insecto puede sobrevivir en cualquiera de las áreas del mundo en las que crece el olivo.

El umbral de actividad de la mosca del olivo es de 15,5°C. El número anual de generaciones oscila entre dos y cinco y una hembra puede poner en su vida entre 200 y 500 huevos (Rice, 2000). En verano, cuando las temperaturas son óptimas, una generación puede completarse en 30 a 35 días. El desarrollo pupal requiere aproximadamente 8 a 10 días en verano, pero puede durar 6 meses en invierno. A diferencia de otras especies de tefritidos, *Bactrocera oleae* pupa dentro de la fruta hospedadora durante el verano, pero deja la fruta para pupar en el suelo u otro nicho protegido durante el invierno. La duración del ciclo de vida completo oscila entre 1 y 7 meses, dependiendo fundamentalmente de la disponibilidad de alimento y de la temperatura. Las altas temperaturas (en el rango entre 38 y 41 grados

centígrados) son perjudiciales para esta especie. No obstante, la movilidad de los adultos es muy elevada, lo que les permite buscar zonas más favorables dentro del propio olivar o en zonas próximas. Varios autores han informado de movimientos desde 200 metros en presencia de olivos y hasta de 4 Km para encontrar hospedadores (Economopoulos *et al.*, 1978); también se han notificado movimientos de dispersión de hasta 10 Km a través de mar abierto en el Mediterráneo (Rice, 2000). El hecho de que el adulto sea un excelente volador y pueda recorrer grandes distancias explica la amplia distribución de la especie y su facilidad para las reinvasiones en las zonas donde ha sido combatida. Por otra parte, tampoco podemos olvidar la posibilidad de intervención humana en la dispersión a través del transporte de frutos infestados, aunque en la mayoría de las ocasiones las exportaciones son bien de aceite o bien de frutos en conserva.

Como se mencionó anteriormente, en la mayor parte de la cuenca mediterránea la mosca del olivo es la plaga más importante de esta especie vegetal. Las larvas se alimentan exclusivamente de aceitunas, mientras que los adultos se alimentan principalmente de néctar y polen. Si el olivo se cultiva para la producción de aceitunas de mesa, la sola presencia de la marca de oviposición hace que se descarten los frutos. Si la producción se destina a la elaboración de aceite de oliva, se pueden considerar varios tipos de daño; los más importantes son:

- caída prematura de los frutos atacados
- destrucción de la pulpa causada por la larva que se desarrolla en el interior de la aceituna
- aumento de la acidez y otros efectos secundarios asociados al desarrollo de la larva, incluyendo infecciones resultantes del orificio en la piel causado por la oviposición.

Un grado de infestación mayor del 1% impide la utilización de los frutos como aceitunas de mesa y un grado de infestación mayor del 10% impide también su utilización en la producción de aceite.

El cultivo del olivo tiene una enorme importancia económica en el área Mediterránea y una importancia económica creciente en países como Australia y Estados Unidos. Así, en la Unión Europea (UE) supuso en el año 2000 el 3,37% de la producción agrícola total, mientras que en España en este mismo año representó el 7,58% de la producción agrícola. En el año 1997 se dedicaron en la UE 4.492 hectáreas (Ha) al cultivo del olivo; el 50, 8% de las mismas (2280) se encontraban en España. En cuanto a la producción de aceitunas y aceite de oliva, en la UE se

obtuvieron en este mismo año 1997 11.980.000 toneladas de aceitunas (5.880, el 49,7%, en España) y 1.930.000 toneladas de aceite de oliva (1.123, el 58,2%, en España). (Datos procedentes del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, disponibles en: <http://www.mapya.es/indices/pags/agric/index.htm>). En el año 2000 se produjeron en el mundo 2.295.833 toneladas de aceite de oliva. El primer productor mundial es España (700.000 toneladas), seguido de Italia (614.164), Grecia (377.000) y Túnez (200.000); Estados Unidos produjo 565 toneladas. (Datos procedentes de <http://www.infolivo.com>, basados a su vez en información procedente de la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). La mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) está presente en todos los países productores de aceituna. En el área mediterránea causa anualmente, como media, la pérdida del 30% de la producción (Mazomenos, 1989). En California, donde esta especie es considerada una plaga de clase A (no está aún establecida en todo el Estado, por lo que se considera que aún es posible exterminarla), en el año 2001 se han destinado más de 300.000 dólares a programas de control de la misma (datos procedentes de la página web del *California Olive Oil Council*, <http://www.cooc.com>).

El impacto económico de esta plaga ha hecho necesario desarrollar planes de lucha contra la misma. Los métodos de lucha contra las plagas se pueden dividir en químicos y no químicos. Los métodos químicos incluyen tanto los plaguicidas convencionales como otros más respetuosos con el medio y con menor probabilidad de crear resistencias: los plaguicidas de origen mineral y orgánico y los plaguicidas biorracionales. Los métodos no químicos comprenden la protección de la salud de la planta, el correcto manejo del suelo, la conservación en lo posible del ecosistema natural, la destrucción física directa o indirecta del insecto y el control biológico. Dentro del control biológico podemos hablar de la conservación y/o potenciación de los enemigos naturales de la plaga, la utilización de *Bacillus thuringiensis* y la lucha autocida (técnica del insecto estéril). Actualmente se tiende a lo que se denomina control integrado o lucha integrada, que consiste en el empleo racional de todos los factores, tanto naturales como artificiales, minimizando el uso de los métodos agresivos con el ambiente. Se trata de un proceso complejo, que requiere un buen conocimiento tanto de la biología de los organismos implicados en el control como del ecosistema correspondiente. Se hace necesario, por consiguiente, un profundo conocimiento de la bioecología y la dinámica de las poblaciones de *Bactrocera oleae* para una

lucha racional contra la misma. Un ejemplo de aplicación de las técnicas de control biológico a la especie *Bactrocera oleae* lo encontramos en el trabajo de Ros y colaboradores (2002).

Sin embargo, y a pesar de su importancia económica, se han realizado muy pocos estudios genéticos sobre esta especie y su estructura de poblaciones es prácticamente desconocida. En la literatura solamente se encuentran unos pocos trabajos fundamentalmente descriptivos (Zouros and Krimbas, 1969; Tsakas and Krimbas, 1975; Bus and Kitto, 1979; Tsakas and Zouros, 1980; Tsakas and Zouros, 1980; Loukas *et al.*, 1985; revisiones de Loukas, 1989 y Zouros and Loukas, 1989; Ochando *et al.*, 1994; Callejas *et al.*, 1998 y Ochando and Reyes, 2000). La mayoría de los estudios de poblaciones naturales de este insecto se limitan a estimar el grado de variabilidad genética en las poblaciones analizadas; solamente los dos últimos aclaran otros aspectos de la estructura poblacional de la mosca del olivo, utilizando para ello isoenzimas (Ochando and Reyes, 2000) y RAPD-PCR (Callejas *et al.*, 1998); en ambos casos se estudió un pequeño número de poblaciones españolas.

Los primeros estudios de genética de poblaciones aplicando técnicas moleculares se llevaron a cabo, como se mencionó en el apartado anterior, en 1966 utilizando la técnica de electroforesis de proteínas (Hubby and Lewontin y Lewontin and Hubby en *Drosophila pseudoscura* y Harris en humanos). No obstante, el análisis de isoenzimas está limitado porque sólo puede ser analizado un número relativamente pequeño de loci que no constituyen una muestra al azar del genoma. Además, dada la degeneración del código genético, aproximadamente un 29% de las mutaciones que ocurren a nivel de nucleótidos no se traducen en cambios de aminoácidos (Nei, 1987) y un 70-75% de las sustituciones de aminoácidos no pueden ser detectadas por electroforesis de proteínas debido a que se mantiene la carga neta (Lu and Rank, 1996). Por todo ello, los análisis poblacionales utilizando isoenzimas pueden subestimar la diversidad genética.

Como ya hemos mencionado, en 1986 aparece la técnica de PCR (Mullis *et al.*). Una variante de esta técnica recibió el nombre de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* o DNA polimórfico amplificado al azar) (Williams *et al.*, 1990; Welsh and McClelland, 1990). Esta técnica se basa en el empleo de un único cebador (generalmente de 10 nucleótidos, con un contenido de G-C de entre el 60 y el 70%) de secuencia arbitraria, por lo que no requiere conocimiento previo del genoma de la especie a estudiar. En teoría, por medio de esta técnica se obtendrían una

serie de fragmentos de DNA que constituirían una muestra al azar del genoma (Williams *et al.*, 1990).

Esta técnica presenta una serie de ventajas para el estudio de la genética de poblaciones (Black, 1993):

- no requiere conocimiento previo de las secuencias de DNA
- es un método rápido, sencillo y con costes inferiores a los de otras técnicas
- permite analizar un número elevado de muestras en un tiempo reducido
- se necesitan cantidades mínimas de DNA molde

Una ventaja de los RAPDs sobre las isoenzimas es que revelan un grado mayor de polimorfismo que éstas, debido al gran número de loci que permite estudiar, muchos de los cuales se piensa que son no codificantes (Williams *et al.*, 1990). Además, se supone que la tasa de mutación de los marcadores RAPD es relativamente alta puesto que derivan, al menos en parte, de secuencias moderada o altamente repetidas. Se espera, por tanto, que proporcionen una mayor resolución que las isoenzimas en estudios de variabilidad geográfica.

No obstante, los RAPDs presentan también algunos inconvenientes. Así, en su mayor parte presentan una herencia dominante. Además, en algunos estudios se ha cuestionado su reproducibilidad (Weeden *et al.*, 1992), por lo que se hace necesaria una estricta estandarización de las condiciones de amplificación, así como llevar a cabo réplicas de todas las amplificaciones.

A pesar de ello, los RAPDs constituyen una excelente herramienta para los estudios genéticos de poblaciones siempre que se tomen las precauciones necesarias. Así Taberner y colaboradores (1997), publicaron que en sus experimentos 3.396 bandas de 3.422 (99,2%) fueron reproducibles. Numerosos trabajos, incluyendo estudios de tefrítidos (Haymer, 1995; Haymer *et al.*, 1997; Callejas *et al.*, 1998), demuestran la utilidad de esta técnica en la determinación de la variabilidad y la diferenciación genética tanto dentro como entre poblaciones.

En este trabajo se utiliza la técnica RAPD-PCR para el estudio de la estructura de poblaciones de la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*), constituyendo el primer análisis de dicha especie que incluye un número significativo de muestras distribuidas por varios continentes.

I.3. Genoteca genómica de la especie *Bactrocera oleae*.

Asimismo, llevados por nuestro interés en utilizar todos los medios posibles para avanzar en el conocimiento de esta especie, construimos una genoteca en colaboración con el Dr. Lucas Sánchez y la Dra. M^a Fernanda Ruiz, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

La construcción de una genoteca permite el aislamiento y secuenciación de una secuencia específica de DNA a partir de la enorme cantidad de DNA presente en una célula. Esto era impensable hace unas pocas décadas, hasta que en 1978 Maniatis *et al.* desarrollaron un procedimiento para clonar el DNA fragmentado de un organismo, construyendo así una *genoteca* o *librería genómica*, y llevar a cabo la búsqueda en la misma de la secuencia de DNA de interés por medio de hibridación con sondas específicas.

Pronto se generalizó el uso de las librerías genómicas. Ya en 1979 se publica el resultado de la caracterización de un gen aislado de una librería genómica en pollo (Lai *et al.*, 1979) y en 1980 ocurre lo mismo con genes humanos (Zaborovskii *et al.*), de ratón (Zakut *et al.*) o del anfibio *Xenopus laevis* (Wahli and Dawid). En cuanto a insectos, se tiene constancia de la construcción de una librería genómica parcial de *Sciara coprophila* en 1981 (Renkawitz *et al.*). También se han construido librerías genómicas en tefrítidos, por ejemplo en *Ceratitis capitata* (Rosetto *et al.*, 1999).

Material y Métodos.

II. MATERIAL Y MÉTODOS.

II.1. MATERIAL.

II.1.1. Material para el estudio de las relaciones filogenéticas en la familia Tephritidae.

Con el propósito de determinar las relaciones filogenéticas en la familia Tephritidae se secuenció un fragmento de DNA mitocondrial (mtDNA) de individuos procedentes de 22 especies de esta familia. Estas 22 especies pertenecen a 7 géneros: *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitidis*, *Dacus*, *Neoceratitidis*, *Rhagoletis* y *Toxotrypana*. En la Tabla 1 se recogen el nombre de la especie, los nombres asignados a cada muestra, su origen geográfico y el año de obtención. Los nombres de las muestras consisten en dos o tres letras que corresponden a la primera letra del género y la primera o dos primeras letras de la especie, seguidas de una “h” en caso de que el individuo fuera una hembra o de una “m” en el caso de que se tratara de un macho. Cuando los individuos secuenciados eran del mismo género o bien eran individuos no adultos, en vez de una “h” o una “m” se distinguió a los dos individuos de la misma especie asignándoles respectivamente los números 1 y 2.

En las Figuras 1 a 12 se muestran fotografías de individuos adultos de algunas de las especies analizadas. Estas fotografías provienen de las páginas web de la Universidad de Florida (<http://creatures.ifas.ufl.edu>; especies *Anastrepha ludens*, *Anastrepha suspensa*, *Bactrocera cucurbitae*, *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera latifrons*, *Bactrocera oleae* y *Ceratitidis capitata*), la Universidad de Sydney (<http://www.bio.usyd.edu.au/fruitfly>; especies *Bactrocera neohumeralis* y *Bactrocera tryoni*), el Museo de Historia Natural de Londres (<http://www.iaea.or.at>; especies *Bactrocera zonata* y *Dacus ciliatus*), el Cirad francés, organismo científico especializado en agronomía tropical (<http://www.cirad.fr>; especie *Neoceratitidis cyanescens*) y el HYPZ francés (Hypermédia en Protection des Plantes: <http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPZ>; especie *Rhagoletis cerasi*).

Se obtuvo la secuencia de 2 individuos adultos de cada una de las 22 especies estudiadas, a fin de tener en cuenta la posible variación intraespecífica y de corroborar la exactitud de los datos. En los casos de *Bactrocera tryoni* y *Ceratitis cosyra* se secuenciaron dos machos y dos hembras respectivamente y en el de *Rhagoletis pomonella* se utilizaron dos pupas, al no disponerse de adultos de esta especie.

En el caso de la especie *Ceratitis rosa*, se han secuenciado cuatro individuos en lugar de dos. Esto se debe a que se ha propuesto que las moscas procedentes de Kenia sean clasificadas, atendiendo a su morfología y distribución como *Ceratitis fasciventris* (N. Zenz, comunicación personal). Sin embargo, al no haber sido esto publicado, continuamos considerándolas, por el momento, *Ceratitis rosa*.

Los ejemplares analizados fueron enviados desde diferentes centros conservados en etanol 90%, excepto los ejemplares de las especies *Bactrocera oleae* (Bo) y *Ceratitis capitata* (Cc), que procedían de nuestro propio laboratorio y se habían conservado a -80 °C. De todas las especies se conservan ejemplares *voucher* en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Como especies fuera de grupo se han utilizado *Drosophila yakuba* (Dy) (Familia Drosophilidae, Superfamilia Ephydroidea) y las especies *Chrysomya chloropiga* (Coc) y *Cochliomyia hominivorax* (Ch) (Familia Calliphoridae, Superfamilia Oestroidea). Todas ellas, al igual que la familia Tephritidae (Superfamilia Tephritoidea), pertenecen al orden Diptera, suborden Brachycera, infraorden Muscomorpha. Las secuencias utilizadas en el análisis proceden del GenBank (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) y sus números de acceso son, respectivamente, NC 001322, NC 002697 y NC 002660.

II.1.2. Material empleado en el estudio de la estructura poblacional de la especie *Bactrocera oleae* (Gmelin).

En el presente estudio se han analizado 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* (Bo) procedentes de distintas áreas tanto de España como del extranjero. En las Figuras 11 a 14 se muestran dos individuos adultos pertenecientes a esta especie (un macho y una hembra), así como un fruto infestado (tanto el orificio externo como el túnel interno).

En la Figura 15 se muestra la situación de cada una de estas poblaciones sobre un mapa. De estas 21 poblaciones, 15 procedían de España y Portugal; otras 4 procedían del resto del área mediterránea (Italia y Grecia, situadas en el norte del Mediterráneo, Túnez, en el sur del Mediterráneo e Israel, en el este); las dos poblaciones restantes eran originarias de Estados Unidos, concretamente de California.

Cada población estudiada se ha designado con un código de tres letras, que corresponden a su origen geográfico; en los casos en que existen dos poblaciones procedentes de la misma región geográfica, se les asignan los números 1 y 2, respectivamente, para distinguirlas. En la Tabla 2 se recogen los nombres asignados a cada muestra, su procedencia y la localización geográfica exacta de las zonas muestreadas.

En la Tabla 3 se muestran, para cada población, la media de las temperaturas máxima, mínima y media, así como de la precipitación total mensual durante los siete meses anteriores a la obtención del adulto. Se hace la media de siete meses porque se estima que la duración del ciclo de vida de *Bactrocera oleae* oscila entre uno y siete meses. No se pudieron obtener los datos meteorológicos correspondientes a las poblaciones de Israel, Italia y Portugal, por lo que estos no se incluyen en la tabla.

Todas las localidades donde se han llevado a cabo los muestreos presentan un clima de tipo mediterráneo, si bien en sus diferentes variantes, y con temperaturas medias y precipitaciones dependientes de cada región.

Se analizaron 20 individuos de cada población, 10 machos y 10 hembras, salvo en la población Cac, en la que se analizaron 9 machos y 11 hembras y en la población USA-1, en la que todos los individuos analizados fueron machos.

II.2. MÉTODOS.

II.2.1. Extracción de DNA.

El aislamiento y purificación de DNA se llevó a cabo según el método de Reyes y colaboradores (1997) con ligeras modificaciones.

Se extrajo el DNA total de individuos completos, que se utilizaría tanto para la amplificación de DNA mitocondrial como para la amplificación por medio de la técnica RAPD-PCR.

La homogeneización se llevaba a cabo en 600 μ l de tampón con el siguiente contenido: sacarosa (0,2M), Tris-HCl pH 8,5 (100 mM), EDTA (50mM) y SDS (0,5%). La solución se incubaba a 65°C durante media hora, para romper las membranas celulares. A la mezcla se le añadían 120 μ l de acetato potásico 3M (pH 5,2), se agitaba y se mantenía durante 10 minutos a -20°C. El SDS junto al acetato potásico hace que precipiten las proteínas y los polisacáridos a bajas temperaturas. A continuación se centrifugaba durante 20 minutos a 14.000 rpm y 4°C. Se recogía el sobrenadante, se pasaba a un tubo limpio, se mezclaba con 1 volumen de fenol :cloroformo :alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugaba durante 5 minutos a 13.000 rpm. Este lavado tenía el fin de limpiar la mezcla de proteínas, que se disuelven en el fenol y quedan en la fase inferior. Recogíamos la fase superior y repetíamos el lavado de la misma forma. Por último, se añadía 1 volumen de cloroformo para eliminar los posibles restos de fenol de la fase acuosa. Centrifugábamos 5 minutos a 13.000 rpm y recogíamos la fase superior. Añadíamos 1 volumen de isopropanol, lo que, junto con el acetato potásico añadido previamente hacía que precipitara el DNA. La mezcla se mantenía durante toda la noche a -20°C.

Tras este paso se centrifugaba la solución durante 20 minutos a 13.000 rpm y 4°C para precipitar el DNA, que se lavaba con 400 μ l de etanol 70% para eliminar las sales. Se centrifugaba durante 5 minutos a 13.000 rpm y 4°C, se eliminaba el sobrenadante y el precipitado obtenido se dejaba secar al aire. A continuación se resuspendía en 600 μ l de TE 10:1 (Tris-HCl 10mM: EDTA 1mM pH8) a los que se añadían 2 μ l de RNAsa A-T₁ (10mg/ml A: 10 U/ μ l T₁). La mezcla se incubaba durante 30

minutos a 37°C para permitir que actuara la RNAsa. Pasado ese tiempo se lavaba primero con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a continuación con cloroformo de la misma forma que se hizo previamente. Una vez recuperada la fase acuosa tras el último lavado se añadían 1,5 volúmenes de etanol 100% y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M (pH 5,2) y se dejaba toda la noche a -20°C con el fin de precipitar el DNA. En esta ocasión se utilizaba acetato sódico en vez de potásico, ya que este último puede interferir en las reacciones de amplificación que se llevan a cabo posteriormente. El DNA se conservaba de esta manera hasta el momento de ser utilizado.

Cuando se iba a utilizar el DNA se centrifugaba durante 20 minutos a 13.000 rpm y 4°C. El DNA precipitado se lavaba con alcohol 70% de la misma forma que anteriormente y, una vez seco, se resuspendía el precipitado en 50µl de TE 10:1.

Para valorar el estado y la concentración del DNA se corría éste en un gel de agarosa al 0,8% con tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 1mM pH 8) y bromuro de etidio (1µg/ml) (Sambrook *et al.*, 1989). Como marcador de peso molecular se utilizaba DNA de fago λ cortado con *Hind* III. La valoración de la concentración se llevaba a cabo por medio del programa Multi-Analyst (Bio-Rad, 1997).

Para la amplificación del fragmento de DNA mitocondrial se utilizaba el DNA sin diluir. En el caso de los RAPDs se diluía el DNA con TE 10:1 hasta una concentración de 5 ng/µl.

II.2.2. Amplificación de un fragmento de DNA mitocondrial.

Para la amplificación del fragmento de DNA mitocondrial se utilizan los cebadores CBF1 (5'-ACATGAATTGGAGCTCGACCAGT-3') y N1R1 (5'-GGTACATTACCTCGGTTTCGTTATGAT-3'). Estos cebadores se diseñaron en el laboratorio del Dr. C. Fleming (Applied Plant Science, The Queen's University of Belfast, Reino Unido) a partir de la secuencia del DNA mitocondrial de *Drosophila yakuba* (Clary and Wolstenholme, 1985). Los cebadores amplifican una región de mtDNA que en *Drosophila yakuba* está comprendida entre las posiciones 11546 y 11840 (295 pares de bases). Este fragmento corresponde al extremo 3' del gen del citocromo b (*cytb*), el gen del RNA transferente de serina (tRNA-Ser) y el extremo 3' del gen que codifica la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (*ND1*). El extremo 3' del *cytb* se encuentra

entre las posiciones 11.546 y 11.658 de la cadena +, en la posición 11.658 comienza el gen del tRNA de serina, que continúa hasta la posición 11.723. El gen *ND1* (secuenciado desde la posición 11.706 a 11.840) se encuentra en la cadena – y en *Drosophila yakuba* solapa con el gen de tRNA.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 100 µl que contenía: 4 µl de DNA total, 10 µl del tampón 10x de EcoTaq (Ecogen), MgCl₂ en una concentración 2 mM, 10 picomoles de cada uno de los cebadores, la concentración final de desoxirribonucleótidos fue 0,2 mM, y 2,5 unidades de la DNA polimerasa EcoTaq (Ecogen). La mezcla se cubría con una gota de aceite mineral. En todas las amplificaciones se incluyó de forma paralela un control negativo.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Peltier PT-100 (MJ Research), bajo las siguientes condiciones.

- * 1 ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94°C

- *30 ciclos de amplificación en 3 pasos

 - *desnaturalización a 94°C durante 30 segundos

 - *hibridación a 58°C durante 1 minuto

 - *polimerización a 72°C durante 1 minuto

- *1 ciclo de terminación de 6 minutos a 72°C

Una alícuota de 3 µl del producto de amplificación se cargaba en un gel de agarosa al 2 % junto al marcador de peso molecular 100 bp Ladder Plus (MBI Fermentas) y al control negativo, con el fin de comprobar la amplificación de un único fragmento de DNA del tamaño esperado y sin problemas de contaminación.

Para purificar el producto de PCR se utilizaron el protocolo y el conjunto de reactivos del “High pure PCR product purification kit” (Boehringer-Mannheim). A continuación, una alícuota de la solución que contenía el DNA purificado se sometía a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con el fin de verificar que el DNA no se había degradado durante el proceso de purificación, así como de determinar la concentración de DNA. En la Figura 16 se muestra el producto de amplificación de un individuo de cada una de las especies incluidas en el estudio. Una alícuota del producto de purificación se llevaba a una concentración de 10 ng/µl para la secuenciación automática.

II.2.3. Secuenciación automática.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid empleando el método de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977) mediante dideoxynucleósidos marcados con fluorescencia (ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems Inc.). La secuenciación se basa en utilizar la cadena de DNA a secuenciar como molde para la síntesis de una nueva cadena de DNA utilizando dideoxynucleósidos para generar una serie de fragmentos de DNA. Cuando un dideoxynucleósido se añade a la cadena de DNA que se está sintetizando causa la terminación de la síntesis de la cadena, ya que los dideoxynucleósidos carecen de extremo 3'-OH. De este modo se producen fragmentos de DNA de diferentes tamaños. Se utilizan cuatro mezclas de reacción diferentes, cada una con un DNA molde, un cebador, los cuatro desoxirribonucleósidos marcados (en este caso con fluorescencia) y una pequeña cantidad de un solo dideoxirribonucleósido trifosfato. Puesto que sólo se utiliza una pequeña cantidad de nucleósido modificado, las cadenas recién sintetizadas terminan aleatoriamente, produciendo una colección de fragmentos. Después de la síntesis, se realiza una electroforesis con los fragmentos marcados. Los productos se separan por electroforesis y los fragmentos se visualizan por espectroscopia fluorescente. Cada una de las reacciones utiliza un colorante diferente, por lo que las cuatro reacciones se corren en un único carril. El gel se analiza leyendo la secuencia desde la base.

Se utilizó el secuenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc.).

En un total de 46 individuos pertenecientes a 22 especies, se secuenciaron las dos hebras de DNA con el fin de corroborar la secuencia. Todas las secuencias (excepto las que se repetían exactamente en los dos individuos de la misma especie, de las que sólo se envió una a la base de datos) se enviaron al GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Los números de acceso se encuentran en la Tabla 4.

II.2.4. RAPD-PCR.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de Williams y colaboradores (1990) con ligeras modificaciones, en un volumen final de 12,5 μ l. El contenido de la mezcla de reacción era el siguiente: Tris-HCl 10mM y KCl 10mM a pH 8,3, MgCl₂ 4 mM, 200 μ M de cada uno de los desoxiribonucleótidos, 3,5 picomoles del cebador correspondiente, 0,625 unidades de la Taq DNA polimerasa (fragmento Stoffel, Applied Biosystems) y 12,5 ng de DNA genómico.

Los cebadores utilizados pertenecían a las series A y C de Operon (Operon Technologies, Inc.). Se trataba concretamente de los oligonucleótidos decámeros OPA-02, OPA-07, OPA-17, OPC-05, OPC-06, OPC-11 Y OPC-18. En la Tabla 5 se muestra la secuencia de cada uno de estos oligonucleótidos.

Una vez añadido el DNA a la mezcla de reacción, esta se cubría con una gota de aceite mineral y se introducía en un termociclador programable Peltier PTC-100 (MJ Research). El programa empleado para la amplificación era el siguiente:

- *1 ciclo de desnaturalización de 6 minutos a 94°C
- *45 ciclos de amplificación en cuatro pasos
 - *desnaturalización a 94°C, 1 minuto
 - *hibridación a 36 °C durante un minuto
 - *rampa de incremento de temperatura hasta 72°C a razón de 0,4°C por segundo
 - *polimerización a 72°C, 1 minuto
- *1 ciclo de terminación de 6 minutos a 72°C

Los productos de amplificación eran separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 1mM pH 8) y bromuro de etidio (1 μ g/ml) (Sambrook *et al.*, 1989). Se visualizaban en un transiluminador con luz ultravioleta y los geles eran fotografiados empleando película Polaroid 665 con negativo. Los tamaños de los fragmentos de DNA se calculaban en función de la comigración con un marcador de peso molecular conocido, en concreto el 100 bp Ladder Plus (MBI Fermentas).

Todas las amplificaciones fueron repetidas al menos una vez para constatar la reproducibilidad de los patrones de RAPD obtenidos y en todas ellas se utilizó un control

negativo. En la Figura 17 puede observarse un ejemplo de reproducibilidad: el patrón de RAPD de 11 individuos de la población de Málaga empleando el cebador OPC-18, resultado de dos reacciones de amplificación diferentes visualizadas en dos geles de agarosa distintos.

II.2.5. Construcción de una genoteca de la especie *Bactrocera oleae*.

La construcción de la genoteca (o librería genómica) se llevó a cabo según el protocolo descrito en Sambrook y colaboradores (1989) y en el manual de instrucciones del “Lambda DASH / *Eco* RI Vector Kit” (Stratagene?????) partiendo de 150 µg de DNA genómico de *Bactrocera oleae*.

II.2.5.1. Digestiones parciales de DNA genómico de *Bactrocera oleae*.

Se realizaron pruebas de digestiones parciales de DNA genómico de *Bactrocera oleae* utilizando la enzima de restricción *Eco* RI y diferentes tiempos de reacción. La mezcla de reacción contenía 5 µg de DNA genómico, 6 unidades/µl de *Eco* RI (Boehringer-Manheim), 5 µl del tampón recomendado por el fabricante y 31 µl de agua, de modo que el volumen final de la mezcla fue de 50 µl. Se hicieron 5 alícuotas de 10 µl cada una de esta mezcla de reacción y se incubaron a 37°C durante 5, 10, 15, 20 y 25 minutos respectivamente. La digestión era bloqueada añadiendo a la mezcla 1 µl de EDTA 0,5 M; a continuación se mantenía la mezcla de reacción durante 5 minutos a 65°C.

Las muestras de DNA digerido se visualizaron en un gel de agarosa 0,8%, utilizando como control 1 µg de DNA sin digerir y como marcador de peso molecular DNA del fago lambda cortado con la enzima de restricción *Hind* III. De esta manera se determinó que el tiempo óptimo de reacción para obtener una alta concentración de fragmentos de entre 9 y 23 Kb (el rango de tamaño del inserto que puede acomodar nuestro vector) era de 15 minutos.

A continuación se prepararon 2 tubos de mezcla de reacción con un volumen final de 500 µl (50 µg de DNA, 6 unidades/µl de *Eco* RI, 50 µl de tampón y 310 µl de agua) y se digirieron con *Eco* RI durante 15 minutos a 37°C, parándose la reacción de la forma que se explicó anteriormente. El DNA digerido se juntó en un solo tubo.

II.2.5.2. Fraccionamiento por tamaño en gradiente de sacarosa.

Se prepararon dos tubos con soluciones de sacarosa al 5 y al 20% que fueron autoclavados. Por medio de un generador de gradiente se prepararon dos tubos de solución de sacarosa en gradiente concentración. A uno de ellos se le añadieron cuidadosamente 100 µg de DNA y al otro, que se utilizaría como contrapeso en la ultracentrifugación, se le añadió agua destilada hasta equilibrar. La centrifugación (a 35.000 rpm y 4°C) se llevó a cabo sin freno para evitar distorsionar el gradiente.

Se recogieron del gradiente fracciones de 200 µl cada una (es decir, un total de 24 fracciones). El DNA de estas fracciones se precipitó añadiendo 200 µl de TE y 1000 µl de etanol absoluto y dejando la mezcla durante toda la noche a -20°C. A continuación se resuspendió el DNA en 50 µl de tampón TE (Tris:EDTA). El tamaño de los fragmentos del DNA digerido presentes en cada fracción se determinó mediante su observación en un gel de agarosa 0,6%, utilizando el fago lambda cortado con *Hind* III como marcador de peso molecular. Las fracciones escogidas fueron aquellas en las que el tamaño de la mayoría de los fragmentos de DNA se encuentra entre 9 y 23 Kb. Todas estas fracciones se reunieron en un tubo eppendorf y se precipitó su DNA añadiendo NaCl 0,1M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo a -20°C durante toda la noche y a continuación se centrifugó 15 minutos a 14.000 rpm, se lavó de nuevo con etanol 70% y se resuspendió en 10 µl de agua. Se determina la concentración de DNA de la muestra visualizando alícuotas de una dilución 10⁻¹ de 1 µl de la mezcla en un gel de agarosa 0,8%; se utilizó como marcador de peso molecular DNA de fago lambda cortado con *Hind* III. De esta forma se determinó que la concentración de DNA era aproximadamente 200 ng/µl. El DNA se precipitó de nuevo de la misma forma que en pasos anteriores, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 3µl de agua ultrapura.

II.2.5.3. Ligamiento de los fragmentos de DNA a los brazos del bacteriófago.

Se utilizó el kit Lambda DASH III / *Eco* RI de Stratagene. La mezcla de ligamiento contenía 1 µl de vector Lambda DASH III, 1 µl de DNA genómico (aproximadamente 400 ng), 0,5 µl de tampón 10x de ligasa T₄ (Boehringer-Manheim), 0,5 µl de rATP 10mM y 2 unidades de ligasa T₄. La mezcla de ligamiento se mantuvo durante toda la noche a 4°C.

II.2.5.4. Empaquetamiento del DNA recombinante.

El empaquetamiento se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante del kit. Se añadió al extracto de empaquetamiento 1 μ l de la mezcla de ligamiento y se agitó suavemente para mezclar bien. Se incubó la mezcla durante 2 horas a 22°C. Se añadieron 500 μ l de tampón SM (NaCl 100mM, MgSO₄:H₂O 0,2%, Tris:HCl 50mM, pH 7,5) y 20 μ l de cloroformo y se mezcló suavemente. Se centrifugó para eliminar el cloroformo. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se almacenó a 4°C.

II.2.5.5. Titulación.

En primer lugar se prepararon las células hospedadoras. Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* XL1-BlueMRA (P₂) del kit de Stratagene. Se sembraron en placas de LB-agar y se incubaron a 27°C durante toda la noche. Los *stocks* de las cepas se prepararon a partir de una de las colonias de las placas de LB-agar que se sembró en un matraz con 50 ml de LB líquido, 500 μ l de MgSO₄ 1M y 500 μ l de maltosa 20% y se dejó incubando toda la noche a 37°C. La mezcla se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm y se resuspendieron las bacterias en 25 ml de LB líquido, 250 μ l de MgSO₄ 1M y 250 μ l maltosa 20%. Se midió la densidad óptica (DO₆₀₀) que resultó ser 1,9 y se diluyó con agua ultrapura hasta una DO₆₀₀=0,5.

Se prepararon diluciones con un volumen final de 10 μ l de la genoteca (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) en agua ultrapura a las que se añadieron 200 μ l de la dilución con células huésped y 4ml de top agar. La mezcla se extendió sobre placas de 200 ml de LB-agar y se incubó a 37°C durante 8-12 horas. Se contaron las pfu (unidades formadoras de placa) para determinar el título de la genoteca.

II.2.5.6. Amplificación de la genoteca.

Alícuotas de 63 μ l de la genoteca se mezclaron con 300 μ l de células huésped (resuspendidas en MgSO₄ 10mM a una DO₆₀₀=0,5) y se incubaron 15 minutos a 37°C en agitación suave, con el fin de permitir que las células fueran infectadas por los fagos. A continuación se añadieron 9 ml de top agar y se extendieron sobre placas con LB-agar, incubándose a 37°C durante 8 horas. Posteriormente, las placas se cubrieron con 9 ml de

tampón SM y se mantuvieron a 4°C durante toda la noche con el fin de que el fago difundiera al tampón. Se recogió la suspensión del fago, se le añadió cloroformo a una concentración final del 5% en v/v y se mantuvo 15 minutos en agitación con el fin de matar las células. El sobrenadante se centrifugó 10 minutos a 10.000 rpm para eliminar los restos de células. El fago se guardó a 4°C.

La amplificación de la genoteca se titula de igual manera que la genoteca original.

II.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

II.3.1. Análisis de las secuencias de DNA mitocondrial.

II.3.1.1. Alineamiento y análisis de las secuencias.

Una vez obtenidas las secuencias, éstas deben ser alineadas. Los análisis filogenéticos que se llevan a cabo a continuación se basan en el alineamiento, de ahí la importancia del mismo.

Sankoff y Cerdegen (1983) propusieron utilizar el principio de parsimonia para determinar los alineamientos múltiples. Puesto que el alineamiento es básicamente un procedimiento por medio del cual podemos reconocer y describir la homología potencial entre las posiciones de la secuencia de nucleótidos (o, en su caso, aminoácidos), es lógico que el criterio de evaluación de la calidad del alineamiento sea el número de pasos (o sucesos evolutivos) requeridos para explicar la variación observada entre secuencias. El número mínimo de cambios que se requieren para un alineamiento es el que produce el cladograma más parsimonioso para estas secuencias.

Para alinear las secuencias se utilizó el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), que lleva a cabo un alineamiento múltiple progresivo siguiendo el método propuesto por Feng y Doolittle (1987). El programa alinea en primer lugar las secuencias más parecidas y a continuación va añadiendo secuencias al alineamiento. Este programa mejora la sensibilidad de otros métodos de alineamiento múltiple progresivo, ya que asigna un menor peso a las secuencias más parecidas y un peso mayor a las más divergentes. Además, se asigna un peso menor a los huecos en las regiones en las que

se han abierto huecos en los primeros alineamientos, de modo que es menos costoso abrir huecos en estas posiciones que en las regiones en las que no existían previamente.

El análisis de la composición nucleotídica, de la proporción de transiciones (sustituciones de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina) frente a transversiones (sustituciones de una purina por una pirimidina o viceversa) y de las posiciones variables e informativas para la parsimonia se realizó mediante el programa PAUP* versión 4.0b8 (Swofford , 2001).

Por medio del programa MEGA (Kumar *et al.*, 2001), se calcularon tanto la distancia media como las distancias genéticas entre todos los tefritidos de la muestra (en forma de porcentaje de sustituciones en la secuencia de nucleótidos estudiada), excluyendo una de las dos secuencias de cada especie cuando éstas eran idénticas.

Por último, las secuencias de los genes *cytb* y *ND1* se tradujeron a secuencias de aminoácidos utilizando el programa Editseq, del paquete DNASTAR (DNASTAR, Inc., 1995). Las secuencias de aminoácidos se alinearon utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

II.3.1.2. Métodos de construcción de árboles filogenéticos.

Según Felsenstein (1988), Saitou e Imanishi (1989), Swofford y colaboradores (1996), Nei (1996) y Page y Holmes (1998), ninguno de los métodos actuales de reconstrucción filogenética ha probado ser el mejor en todas las situaciones. Debido a ello, en la presente memoria se han utilizado tres métodos de análisis filogenético: *neighbor-joining* o vecino más próximo (NJ, Saitou and Nei, 1987), *maximum likelihood* (ML, máxima verosimilitud, Felsenstein, 1981) y *Máxima parsimonia* (MP, Fitch, 1977). El método NJ es un método basado en distancias genéticas y los métodos ML y MP son métodos basados en caracteres, en los que cada posición de la secuencia se considera un carácter y cada una de las cuatro bases un estado del carácter, pudiendo considerarse como quinto estado las indels (inserciones y deleciones).

El método del *vecino más próximo* (NJ) se basa en encontrar pares de OTUs (Operational Taxonomic Units, es decir, unidades taxonómicas operativas) que minimicen la longitud total de las ramas del árbol en cada paso del agrupamiento, partiendo de un árbol en forma de estrella. Las estimas de las longitudes de las ramas se obtienen por el

método de los mínimos cuadrados. Los datos se suministran al programa en forma de matriz de distancias. Los estudios de simulación muestran que se trata de un método muy eficiente. Probablemente esto se deba a que en cada paso se aplica el criterio de mínima evolución, o máxima parsimonia, y la aplicación repetida de este principio reduce los efectos del error de muestreo.

Los métodos de *parsimonia* (MP) operan seleccionando los árboles que minimizan la longitud total del árbol, es decir, el número de pasos evolutivos (transformaciones de un estado a otro) requeridos para explicar determinados datos. Del conjunto de sitios polimórficos presentes en la secuencia, sólo son informativos aquellos en los que están representados al menos dos nucleótidos distintos en al menos dos de los taxones estudiados. Este es uno de los pocos métodos que busca explícitamente la reconstrucción de las secuencias ancestrales. Además, los programas disponibles no son capaces de tratar los huecos como caracteres informativos en los métodos basados en modelos de evolución (métodos de distancia y máxima verosimilitud), lo que hace del método de máxima parsimonia un método más adecuado para analizar secuencias de longitud variable.

Los métodos de *máxima verosimilitud* (ML) evalúan una hipótesis acerca de la historia evolutiva en términos de la probabilidad de que el modelo de proceso evolutivo que se propone y la historia que se postula den lugar a los datos observados. Se trata de métodos muy consistentes, robustos al incumplimiento de los supuestos básicos del modelo y a menudo la varianza de sus estimas es menor que la de otros métodos, es decir, se ven menos afectados por el error de muestreo.

El problema de los modelos de cambio evolutivo (utilizados tanto en la estima de las distancias para el NJ como en el método de ML) es que asumen que todas las regiones de la secuencia presentan la misma tasa de sustitución de nucleótidos, algo que rara vez es cierto. El incumplimiento de esta condición puede tener consecuencias importantes. La aproximación más utilizada para tener en cuenta esta variabilidad es considerar que las tasas de variación de las distintas posiciones siguen una *distribución gamma*. Esta distribución tiene un parámetro alfa (α), que especifica la tasa de variación entre sitios.

II.3.1.3. Construcción de árboles filogenéticos.

Como se explicó en el apartado anterior, se han utilizado tres métodos de análisis filogenético para reconstruir las relaciones evolutivas entre las especies de la familia Tephritidae.

El análisis de parsimonia se llevó a cabo utilizando el programa PAUP* 4.0b8 (Swofford, 2001), asignando el mismo peso a todas las posiciones de la secuencia y considerando los huecos como una quinta base. La búsqueda heurística se realizó usando el método TBR (*tree bisection-reconnection*), con 1.000 réplicas y adición aleatoria de los taxones (10 réplicas). Posteriormente se obtuvo el árbol consenso (*strict consensus tree*) de los 10 mejores árboles, todos ellos igualmente parsimoniosos.

Los análisis de máxima verosimilitud y vecino más próximo se llevaron a cabo con el programa PHYLIP 3.6a2 (Felsenstein, 2001). El modelo de sustitución de nucleótidos utilizado fue el F84, con una aproximación discreta a la distribución gamma (F84+ Γ). El modelo F84, descrito formalmente por Kishino y Hasegawa (1989), permite que las bases tengan distintas frecuencias y divide el proceso de sustitución en dos componentes: uno *general* capaz de producir todos los tipos de sustituciones y uno *dentro de grupo*, que solo produce transiciones. La proporción de transiciones frente a transversiones, el número de clases de sitios con distinta tasa de sustitución de nucleótidos y el parámetro α se calcularon con el programa PAUP* 4.0b8, utilizando una aproximación iterativa (Swofford *et al.*, 1996). Es decir, los parámetros se calcularon por máxima verosimilitud a partir del árbol más parsimonioso; con estos parámetros se construía un nuevo árbol, cuando la topología encontrada difería de aquella a partir de la que se estimaron los parámetros, éstos se volvían a estimar a partir de la nueva topología. Se continuaba de esta forma hasta que se convergía en el mismo árbol.

Se pueden utilizar modelos de evolución del DNA más complejos, pero estos pueden ser más sensibles al error sistemático que los modelos más simples, ya que es necesario estimar más parámetros a partir de los mismos datos. Además, aunque los métodos más complicados aumentan la verosimilitud, la diferencia en cuanto a la exactitud de las relaciones filogenéticas encontradas es muy pequeña (Huelsenbeck and Bull, 1996).

El análisis de máxima verosimilitud se realizó con el programa DNAML, del paquete PHYLIP 3.6a2, que utiliza el modelo de sustitución de nucleótidos F84. La búsqueda heurística se realizó del mismo modo que en el análisis de parsimonia, con la diferencia de que en este caso el método de búsqueda heurística fue SBR (*subtree pruning and regrafting*) en vez de TBR. A partir de los árboles obtenidos se construyó un árbol consenso (*50% majority rule extended consensus tree*) con el programa CONSENSE del paquete PHYLIP (Felsenstein, 2001).

Por último, las distancias genéticas se calcularon con el programa denominado DNADIST, que también forma parte del paquete PHYLIP (Felsenstein, 2001). Se utilizó la distancia F84, con distribución gamma. A continuación se obtuvieron los árboles por medio del programa NEIGHBOR de este paquete. Las especificaciones fueron las mismas que se utilizaron en DNAML (búsqueda heurística, 1000 réplicas, adición aleatoria de los taxones, 10 réplicas, y SBR). También en este caso se utilizó el programa CONSENSE para obtener un árbol consenso (*50% majority rule extended consensus tree*).

En todos los casos se llevó a cabo un análisis de *bootstrap* con 1000 réplicas, para determinar el grado de soporte estadístico de los agrupamientos. Generalmente, se considera que un grupo está apoyado de forma concluyente cuando el valor de *bootstrap* es 90 o mayor (es decir, cuando el agrupamiento se repite en 90, o más, de cada 100 réplicas). Sin embargo, Hillis y Bull (1993) han demostrado que valores de *bootstrap* mayores de 70 generalmente corresponden a una probabilidad del 95% de que los datos apoyen de forma consistente el agrupamiento.

II.3.2. Análisis de RAPDs.

Para llevar a cabo este análisis se estudiaron los patrones de bandas de todos los individuos, determinándose en cada uno de ellos la presencia o ausencia de bandas, codificándose como 1 la presencia de una banda y como 0 su ausencia. Sólo se tuvieron en cuenta las bandas reproducibles y de peso molecular intermedio (Stewart and Excoffier, 1996). De esta forma se construyó una matriz de 115 por 420 (115 bandas obtenidas por medio de RAPD-PCR en 420 individuos) que no se adjunta debido a su

gran tamaño. Se calculó la frecuencia de cada una de estas bandas en cada una de las poblaciones analizadas.

Por otra parte, con el fin de cuantificar la variabilidad genética, se calculó la proporción de loci polimórficos o polimorfismo, considerando a cada una de las bandas como un locus. El polimorfismo de una población se estima como el número total de loci polimórficos dividido por el número total de loci estudiados. La consideración de un locus como polimórfico puede basarse en diversos criterios, aunque normalmente se utiliza el criterio del 95% (o 0,95) o el menos restrictivo del 99% (o 0,99). Utilizando el criterio del 95%, se dice que un locus es polimórfico cuando la frecuencia del alelo más frecuente en la población es menor o igual a 0,95. El polimorfismo oscila entre 0 (ninguno de los loci es polimórfico) y 1 (todos los loci estudiados son polimórficos).

Se llevó a cabo un análisis de χ^2 de cada una de estas bandas para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su frecuencia en las diferentes poblaciones. También se establecieron las diferencias estandarizadas en la frecuencia de estas bandas en cada una de las poblaciones, suponiendo que la frecuencia de cada banda se distribuye como una normal (0,1), de modo que un valor mayor de 3 en una población indica que la frecuencia en esa población de la banda estudiada es alta comparada con su frecuencia en el total de poblaciones, mientras que un valor menor de -3 indicaría que su frecuencia es baja.

Las bandas obtenidas por medio de la técnica RAPD-PCR se analizaron como marcadores genéticos suponiendo que cumplen las siguientes condiciones:

- 1) Se trata de marcadores dominantes que segregan de forma mendeliana.
- 2) Las frecuencias genotípicas de los alelos guardan las proporciones de Hardy-Weinberg.
- 3) Todos los alelos recesivos (“ausencia de banda”) son *idénticos en estado* (es decir, provienen de mutaciones idénticas) tanto entre individuos como dentro de individuos; lo mismo ocurre con los alelos dominantes (“presencia de banda”).

II.3.2.1. Índice de diversidad.

Para estimar la diversidad genética se utilizó el índice de Shannon (Lewontin, 1972):

$$H_o = - \sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i$$

donde p_i es la frecuencia de un determinado fragmento de RAPD.

H_o se calculó a dos niveles: la diversidad media dentro de poblaciones (H_{pop}) y la diversidad total (H_{sp}). A continuación, la proporción de la diversidad total que se encuentra dentro de poblaciones se estimó como H_{pop}/H_{sp} y la proporción de diversidad entre poblaciones como $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$.

II.3.2.2. Índice de similitud.

El índice de similitud entre individuos se calculó a partir de la matriz de presencia- ausencia de bandas empleando la fórmula de Nei y Li (1979):

$$S = 2 N_{ab} / (N_a + N_b)$$

donde N_a y N_b son el número de bandas presentes en los individuos A y B respectivamente, mientras que N_{ab} es el número de bandas compartidas por ambos individuos. Los valores así calculados oscilan entre 0 (no existen bandas compartidas por los individuos A y B) y 1 (las bandas presentes en los individuos A y B son las mismas). Para el cálculo de este índice se utilizó el programa RAPDplot, del paquete estadístico RAPD-PCR (Black, 1995). Los datos de similitud intrapoblacionales se calcularon promediando los coeficientes de similitud de los individuos de cada población. Los datos de similitud interpoblacionales se calcularon promediando los coeficientes de similitud entre los individuos de una población y los individuos de la población con la cual se compara .

II.3.2.3. Distancias genéticas.

Por otra parte, la matriz de presencia-ausencia de bandas se transformó en una matriz de frecuencias de estas bandas en cada una de las poblaciones. A partir de estas frecuencias se estimaron las distancias de Nei (1972) entre poblaciones. La distancia de Nei proporciona una estima del número medio de mutaciones que separa los genes de dos poblaciones y se calcula por medio de la ecuación:

$$D_{xy} = -\ln [J_{xy}/(J_x J_y)^{1/2}]$$

donde:

$$J_x = \sum_{k=1}^n j_{xk} / n$$

$$J_y = \sum_{k=1}^n j_{yk} / n$$

$$J_{xy} = \sum_{k=1}^n j_{xy} / n$$

para:

$$j_x = \sum_{k=1}^n x_i^2$$

$$j_y = \sum_{k=1}^n y_i^2$$

$$j_{xy} = \sum_{k=1}^n x_i y_i$$

siendo x_i e y_i las frecuencias del alelo i en las poblaciones X e Y respectivamente y n el número de loci analizados.

Las distancias se obtuvieron utilizando el programa RAPDdist, perteneciente al paquete RAPD-PCR (Black, 1995).

11.3.2.4. Análisis de la varianza molecular (AMOVA).

También se realizó un análisis de la varianza molecular (Excoffier *et al.*, 1992).

Para llevar a cabo este análisis se comparan dos a dos todos los fenotipos con el fin de obtener una matriz de distancias entre ellos. La distancia se calcula como el número de bandas no compartidas por los dos fenotipos, lo que es equivalente a una distancia euclidiana al cuadrado (δ_{ij}^2). La idea central del AMOVA es utilizar la matriz de distancias para realizar un análisis de varianza de los fenotipos obtenidos que extraiga sus diferentes componentes: varianza de las distancias existentes entre los individuos de una misma población, entre los individuos de diferentes poblaciones pertenecientes a un mismo grupo y entre los individuos de poblaciones pertenecientes a diferentes grupos.

El diseño del análisis se detalla a continuación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de las desviaciones al cuadrado	Media de las desviaciones esperadas al cuadrado
Entre grupos	G-1	MSD _(a)	$n'' \sigma_a^2 + n' \sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Entre poblaciones dentro de grupos	P-G	MSD _(b)	$n \sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Dentro de poblaciones	N-P	MSD _(c)	σ_c^2
Total	N-1	MSD _(d)	σ_T^2

donde G es el número de grupos, P es el número de poblaciones y N es el número de individuos y los valores n'' , n' y n los tamaños muestrales de cada uno de los niveles jerárquicos.

Cada media de desviaciones al cuadrado es igual a la correspondiente suma de desviaciones al cuadrado (SSD) dividida por los grados de libertad. En cada caso, el valor de SSD se expresa como una función de las distancias fenotípicas entre los individuos que se estén analizando. Por ejemplo:

$$SSD_{(T)} = \frac{1}{4} \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n \delta_{jk}^2$$

siendo δ_{jk}^2 la distancia entre los individuos j y k de la muestra.

Los niveles de significación de las estimas de los componentes de la varianza se calculan por procedimientos permutacionales no paramétricos (en este caso por medio de 10.000 permutaciones al azar).

El análisis de la varianza molecular se llevó a cabo utilizando el programa Arlequín 2000 (Schneider *et al.*, 2000).

II.3.2.5. Test de Mantel.

La matriz de distancias genéticas obtenida mediante la fórmula de Nei (1972), se comparó con la matriz de distancias geográficas empleando el test de Mantel (1967). Este test mide el grado de relación, Z, entre las dos matrices, siendo

$$Z = \sum_{ij}^n X_{ij} Y_{ij}$$

donde X_{ij} e Y_{ij} son los elementos de las matrices X e Y . Si las dos matrices contienen valores de distancia similares, Z es mayor de lo que se esperaría por azar.

El test de significación generalmente se lleva a cabo comparando el valor de Z con su distribución permutacional, es decir, la distribución que se obtiene si se compara una matriz (por ejemplo X) con todas las posibles matrices en las que el orden de los elementos de la otra matriz (Y) se han permutado. En la práctica, el número de permutaciones posibles es tan elevado que sólo se utiliza una muestra al azar de las posibles permutaciones (en nuestro caso 10.000).

El test de Mantel se realizó utilizando el paquete estadístico NTSYSpc versión 2.01b (Applied Biostatistics Inc., 1997).

II.3.2.6. Cálculo de F_{ST} y Nm .

El índice de subdivisión de la población (F_{ST}) fue formulado por Wright (1951) como una forma de estimar la correlación entre gametos escogidos al azar dentro de una población relativa a la correlación entre gametos escogidos al azar en el conjunto de todas las poblaciones. F_{ST} es mayor que 0 cuando las poblaciones están aisladas, debido a que la probabilidad de que gametos escogidos al azar porten alelos derivados de un antepasado común es mayor dentro de una determinada población que en el conjunto de poblaciones. Métodos alternativos para estimar este estadístico son los de Weir y Cockerham (1984) y Lynch y Milligan (1994). La corrección de estos últimos tiene en cuenta el carácter dominante de los productos de amplificación obtenidos por medio de RAPD-PCR y el pequeño tamaño de las muestras.

A partir de la matriz de presencia- ausencia de bandas se estimó el coeficiente F_{ST} por los tres métodos citados utilizando el programa RAPD F_{ST} , que también forma parte del paquete de programas RAPD-PCR (Black, 1995).

La tasa efectiva de migración (Nm) es una medida del flujo génico entre poblaciones que se estima a partir del coeficiente F_{ST} por medio de la fórmula:

$$F_{ST} = 1 / (1 + 4 Nm)$$

donde m es la tasa media de migración en un modelo de población subdividida y N el tamaño poblacional local (Wright, 1931).

11.3.2.7. Construcción de dendrogramas.

La matriz de distancias genéticas de Nei se utilizó para construir dos dendrogramas por medio de los métodos del vecino más próximo (NJ) y UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) (Sneath and Sokal, 1973). Para la elaboración de los dendrogramas se utilizó el programa PHYLIP versión 3.6a2 (Felsenstein, 2001).

El método NJ de construcción de dendrogramas a partir de una matriz de distancias se explicó en el apartado de este capítulo dedicado al estudio filogenético de la familia Tephritidae. La construcción del dendrograma por el método UPGMA se lleva a cabo siguiendo los pasos que se indican a continuación:

- 1) Dada una matriz de distancias, se encuentran las dos OTUs (operational taxonomic units) i y j entre las cuáles existe la menor distancia d_{ij} .
- 2) La longitud de las ramas se calcula como $d_{ij}/2$.
- 3) Si no queda ninguna OTU por agrupar el árbol está completo, en caso contrario se crea un nuevo grupo al que llamaremos u .
- 4) Se define la distancia entre u y cualquier otro OTU (k con $k \neq i$ o j) como la media de las distancias d_{ki} y d_{kj} .
- 5) Se vuelven a repetir todos los pasos, teniendo en cuenta que hemos eliminado las OTUs i y j y hemos añadido el grupo u , de modo que ahora la matriz de dimensión $n \times n$ pasa a ser $(n-1) \times (n-1)$.

La longitud de las ramas de estos dendrogramas es proporcional a la distancia genética existente entre los dos OTUs. Se ha observado que este método se comporta muy bien en estudios de simulación. Parece ser que esto se debe al hecho de que las estimas de distancia genética están sujetas a grandes errores estocásticos y el procedimiento de promediar las distancias utilizado en el UPGMA reduce el efecto de este error en las estimas de la longitud de las ramas. Esto sugiere que si la distancia genética está sujeta a un elevado error estocástico, pero se espera que sea

aproximadamente lineal en el tiempo, el UPGMA es un buen método para construir árboles.

En ambos árboles se llevo a cabo un análisis de *bootstrap* (1000 réplicas) para comprobar la fiabilidad de los agrupamientos obtenidos.

II.3.2.8. Análisis de coordenadas principales.

A partir de las distancias obtenidas por el método de Nei se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales (Gower, 1966) para determinar las principales tendencias de variación. De esta forma se determina el número de coordenadas necesarias para explicar el 100% de la variación, así como el porcentaje de variación que absorbe cada una de ellas. Además, el análisis de coordenadas principales permite representar de forma gráfica estas tendencias de variación, así como visualizar las relaciones entre poblaciones. Para ello se proyectan las coordenadas principales sobre un eje de dos o tres dimensiones, según si se representan las dos o tres principales tendencias de variación, sobre el que se sitúan las poblaciones.

Para llevar a cabo este análisis se utilizó el paquete de programas NTSYSpc versión 2.01b (Applied Biostatistics Inc., 1997).

Resultados.

III-RESULTADOS.

III.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS EN LA FAMILIA TEPHRITIDAE.

III.1.1. Análisis de las secuencias.

Como se indica en el apartado de Material y Métodos, se han analizado un total de 46 individuos pertenecientes a 22 especies de la familia Tephritidae. La secuencia amplificada es la que corresponde a las posiciones 11.546 a 11.840 del genoma mitocondrial de *Drosophila yakuba*, especie a partir de la cual se diseñaron los cebadores. La longitud de las secuencias varía entre 286 pb y 301 pb. La longitud de las secuencias alineadas es de 308 sitios debido a la existencia de indels (inserciones y/o deleciones). Las secuencias alineadas se presentan en la Figura 18. El número de sitios constantes del total de 308 sitios es 156, 12 sitios son variables pero no informativos para la parsimonia y 140 son informativos para la parsimonia. La proporción A:T:G:C es 45:35:9:11. La proporción transiciones:transversiones (ts/tv) es, como promedio, 2,48. Estos datos se resumen en la Tabla 6.

La secuencia estudiada corresponde, en *Drosophila yakuba*, a los últimos 106 nucleótidos del gen *cytb*, una pequeña secuencia intergénica de 6 nucleótidos, el gen del tRNA de serina (tRNA-Ser) y, solapando con éste y en la cadena complementaria, los últimos 145 nucleótidos del gen *ND1* (subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa). La longitud y el número de sustituciones de las distintas regiones de la secuencia se resumen en la Tabla 7.

La longitud del extremo 3'-terminal del gen *cytb* oscila entre 105 y 111 nucleótidos: 111 nucleótidos en *Rhagoletis cerasi* (*Rc*), 107 en *Toxotrypana curvicauda* (*Tc*), 106 en la propia *Drosophila yakuba* (*Dy*), en *Rhagoletis pomonella* (*Rp*), *Neoceratitis cyanescens* (*Nc*) y *Anastrepha striata* (*Ast*) y 105 en el resto de especies de tefritidos. Todas las indels aparecen en los últimos 15 sitios de la secuencia del *cytb*. El 55,8 % de las sustituciones tienen lugar en la tercera posición del codón. Para hacer este cálculo hemos excluido la región de la secuencia a partir del punto en que comienzan las indels.

La longitud de la secuencia intergénica es muy variable. En las dos especies de *Rhagoletis* (*R. pomonella*, *Rp*, y *R. cerasi*, *Rc*) ocupa 8 nucleótidos, 6 en *Drosophila*

yakuba (*Dy*) y *Anastrepha striata* (*Ast*), 5 en *Neoceratitis cyanescens* (*Nc*) y 4 en *Toxotrypana curvicauda* (*Tc*). En el resto de especies no existe región intergénica.

La longitud del gen de tRNA de serina está muy conservada en las especies analizadas; salvo en *Rhagoletis pomonella* (*Rp*) (68 nucleótidos) y en *Drosophila yakuba* (*Dy*), *Anastrepha striata* (*Ast*), *Neoceratitis cyanescens* (*Nc*) y *Rhagoletis cerasi* (*Rc*) (66 nucleótidos), su longitud es de 65 nucleótidos. En esta región aparecen 17 mutaciones. De ellas, nueve corresponden a zonas del tRNA que no están apareadas, ocho en los lazos (ninguna de ellas en el lazo del anticodón) y una en el extremo 5'. Otras dos sustituciones aparecen únicamente en *Bactrocera oleae* (*Bo*) y están compensadas: un par A-U pasa a ser G-C. En consecuencia, sólo cinco de las mutaciones afectan a zonas apareadas.

Por último, la longitud del extremo 3' del gen *ND1* oscila entre 142 y 148 nucleótidos: 142 nucleótidos en la especie *Toxotrypana curvicauda* (*Tc*), 145 en *Drosophila yakuba* (*Dy*), 146 en *Dacus ciliatus* (*Dc*), 148 en *Dacus demmerezi* (*Dd*) y 144 en el resto de especies. Las indels aparecen únicamente en los últimos 21 sitios de la secuencia. El 61,7% de las sustituciones nucleotídicas tienen lugar en la tercera posición del codón.

Además de analizar la secuencia de nucleótidos, se tradujeron las regiones de la misma que codificaban las proteínas citocromo b (*Cytb*) y la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (*ND1*). La longitud y el número de sustituciones de cada una de estas dos secuencias de aminoácidos se detalla en la Tabla 7.

Al traducir la secuencia de nucleótidos correspondiente a *Cytb* obtenemos una secuencia de 34 aminoácidos, salvo en *Rhagoletis cerasi* (*Rc*) y *Rhagoletis pomonella* (*Rp*), en que se añade una leucina al extremo carboxilo-terminal de la proteína. Las secuencias alineadas se representan en la Figura 19. Las secuencias de aminoácidos de los dos individuos de cada especie son idénticas en todas ellas salvo en *Bactrocera dorsalis* (*Bd*), especie en la que se diferencian en un aminoácido, y *Ceratitidis rosa* (*Cr*), en que un individuo se diferencia de los otros tres en un aminoácido. Al comparar las secuencias obtenidas con la de *Drosophila yakuba*, se observan 14 sustituciones, una de las cuales afecta a todos los tefritidos. Por tanto, se observan 13 sustituciones dentro de

la familia Tephritidae. De estas 13, ocho consisten únicamente en cambios entre aminoácidos del mismo grupo (siete sustituciones de un aminoácido hidrofóbico por otro y una sustitución de un aminoácido polar por otro aminoácido polar). Algunas de estas sustituciones son compartidas por todos los miembros de determinados taxones. A continuación se indican las sustituciones compartidas por todos los miembros de un taxón, así como la posición que ocupan en la proteína. Estas sustituciones se resumen en la Tabla 8.

- En la tribu Toxotrypanini, representada en este estudio por los géneros *Anastrepha* y *Toxotrypana*, sustitución del glutamato en posición 346 por un aspartato presente en todas las especies del género *Anastrepha* (*Al*, *Ao*, *As*, *Asp* y *As†*).
- En la tribu Carpomyini, representada por el género *Rhagoletis*, sustitución de este mismo glutamato por una asparagina en las dos especies del género (*Rc* y *Rp*).
- En la tribu Ceratitini, representada por los géneros *Ceratitis* y *Neoceratitis*, sustitución en todas las *Ceratitis* (*Cc*, *Ccs*, *Cf* y *Cr*) de la valina 351 por una treonina.

La traducción de la región del mtDNA que codifica el extremo carboxilo terminal de la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (ND1) da lugar a una secuencia de 44 aminoácidos en todas las especies salvo las dos especies de *Dacus* (*Dc* y *Dd*) en las que se observa una inserción (en *Dd*) y una inserción y dos deleciones (en *Dc*) de un aminoácido en el extremo carboxilo. El alineamiento de estas secuencias se presenta en la Figura 20. Todas las secuencias de individuos de la misma especie son idénticas entre sí, salvo las de los dos individuos pertenecientes a la especie *Ceratitis cosyra* (*Ccs*), que se diferencian en un aminoácido. Al comparar estas secuencias con la secuencia de aminoácidos de *Drosophila yakuba* (*Dy*) se observan 24 sustituciones; en 3 de ellas, todos los tefrítidos comparten el mismo aminoácido, siendo este diferente al presente en *Dy*. Por tanto, sólo se observan 21 sustituciones comunes a todos los tefrítidos (Tabla 7). De ellas, 10 son cambios entre aminoácidos del mismo grupo (ocho sustituciones de un aminoácido hidrofóbico por otro y dos de un aminoácido polar por otro aminoácido polar).

También en este caso se observan sustituciones, que se detallan a continuación, compartidas por todos los miembros de determinados taxones (Tabla 8).

- En la tribu Toxotrypanini, representada por los géneros *Anastrepha* y *Toxotrypana*, encontramos sustituciones de este tipo en 6 posiciones. Dos de estas sustituciones afectan a todas las especies de la tribu: la sustitución de la serina 289 por una cisteína y la sustitución del triptófano 313 por una leucina. Otras 2 sustituciones, la de la isoleucina 309 por una metionina y la de la lisina 316 por un aspartato, afectan a todas las especies del género *Anastrepha*. Por último, 2 sustituciones afectan a todas las especies del grupo *fraterculus* del género *Anastrepha* (*Al*, *Ao* y *As*). En la posición 307 una leucina es sustituida por una fenilalanina. En la posición 304, una fenilalanina es sustituida por una valina en las especies del grupo *fraterculus*, así como en la especie del género *Toxotrypana* (*Tc*); esta misma valina es sustituida por una isoleucina en las restantes especies del género *Anastrepha* (*Ast* y *Asp*).
- La tribu Carpomyini está representada en nuestro estudio por dos especies del género *Rhagoletis* (*Rc* y *Rp*). En ambas especies, la tirosina 311 es sustituida por una leucina.
- En la tribu Dacini, de la que contamos con representantes de los géneros *Bactrocera* y *Dacus*, se observan 6 sustituciones. Una afecta a todas las especies de la tribu analizadas (tirosina 297 por una fenilalanina), mientras que otras dos afectan a todas las especies excepto *Bactrocera oleae* (fenilalanina 301 por isoleucina e isoleucina 315 por metionina). Otra sustitución afecta a todas las especies del género *Bactrocera* (*Bc*, *Bca*, *Bd*, *Bl*, *Bn*, *Bo*, *Bt* y *Bz*) (fenilalanina 304 por leucina), mientras que otra afecta a todas las especies del género excepto a *Bactrocera cucurbitae* (fenilalanina 324 por valina). Por último, la sustitución de una leucina por una metionina en la posición 307 afecta a las especies *Bca* y *Bd*.
- En cuanto a la tribu Ceratitini, encontramos dos sustituciones que afectan a todas las especies de los dos géneros de esta tribu representados en la

muestra (*Ceratitís* y *Neoceratitís*): tirosina 310 por serina y lisina 323 por asparagina.

III.1.2. Distancias genéticas.

En la Tabla 9 se muestran las distancias genéticas en forma de porcentaje de sustituciones nucleotídicas en el total de sitios de la secuencia de mtDNA estudiada. Las distancias entre los tefritidos estudiados oscilan entre el 0 y 18,3% de sustituciones, con una media del 12,1%.

Las distancias entre individuos de la misma especie, cuando estos no son idénticos, son: 0,4 entre los dos individuos de la especie *Bactrocera neohumeralis* (*Bn*) y 0,7 en las especies *Bactrocera dorsalis* (*Bd*), *B.tryoni* (*Bt*), *Ceratitís cosyra* (*Ccs*) y *Rhagoletis cerasi* (*Rc*). La mayor distancia entre individuos de la misma especie es la existente entre dos de los individuos de la especie *Ceratitís rosa* (*Crh* y *Crm*; distancia 1,1).

En cuanto a distancias entre especies las menores son las que existen entre *B. tryoni* (*Bt*) y *B. neohumeralis* (*Bn*) (0 a 0,7); *C. rosa* (*Cr* y *Cf*) de dos poblaciones distintas que se ha propuesto que podrían pertenecer a especies diferentes (0 a 1,8) y tres de las especies del género *Anastrepha* (*Al*, *Ao* y *As*): *A. ludens* y *A. obliqua* (2,1), *A. ludens* y *A. suspensa* (1,8) y *A. obliqua* y *A. suspensa* (2,5). Las mayores distancias son las que existen entre *Rhagoletis cerasi* (*Rc*) y varias especies de *Bactrocera* (*B. cacuminata*, *Bca*, 18,3 y *B. dorsalis*, *Bd*, *B. ludens*, *Bl*, y uno de los individuos de *B. zonata*, *Bz*, 17,6) y entre *Rhagoletis cerasi* (*Rc*) y *Dacus ciliatus* (*Dc*) (17,6)

Las menores distancias dentro de géneros se encuentran en el género *Anastrepha*, en el que oscilan entre 1,8 y 7. En el género *Bactrocera* encontramos el rango más amplio de distancias entre especies, entre 0 y 13,4. En todos los demás géneros las diferencias entre especies están entre 4,9 y 10,2 (10,2 en *Rhagoletis*, entre 4,9 y 7,7 en *Ceratitís* y 9,2 en *Dacus*).

Las distancias entre los géneros pertenecientes a cada una de las tribus establecidas en las clasificaciones basadas en caracteres morfológicos (White and Elson-

Harris, 1994; Korneyev, 1999; Norrbom *et al.*, 1999a). En la tribu Trypetini (constituida por los géneros *Anastrepha* y *Toxotrypana*) estas distancias oscilan entre 8,8 y 10,6. Del mismo orden son las distancias entre los géneros de la tribu Ceratitini (*Ceratitis* y *Neoceratitis*): entre 8,5 y 11,3. El rango es más amplio y las distancias son, en general, mayores en la tribu Dacini que integran los géneros *Bactrocera* y *Dacus*: entre 8,8 y 13,7.

Las distancias entre especies pertenecientes a distintas tribu de la misma subfamilia (tal como están definidas las subfamilias en las clasificaciones basadas en caracteres morfológicos) oscilan entre 10,2 y 16,9 en la subfamilia Dacinae (constituida por las tribus Dacini y Ceratitini) y entre 8,8 y 14,4 en la subfamilia Trypetinae (constituida por las tribus Toxotrypanini y Carpomyini).

Por último, las distancias entre especies pertenecientes a distintas subfamilias oscilan entre 10,6 y 18,3.

III.1.3. Árboles filogenéticos.

Los resultados del análisis filogenético de las 22 especies estudiadas se muestran en las Figuras 21 a 23. Como especies fuera de grupo se utilizaron *Drosophila yakuba*, *Coclyomyia hominivorax* y *Chrysomya chloropiga*. El análisis se llevó a cabo mediante los métodos de máxima parsimonia (MP), vecino más próximo (NJ) y máxima verosimilitud (ML).

El análisis de parsimonia (MP) generó 10 árboles igualmente parsimoniosos (longitud TL=442, índice de consistencia CI=0,5023 e índice de retención RI=0,8151). El árbol consenso (*strict consensus tree*) de estos 10 mejores árboles se muestra en la Figura 21 (los parámetros del árbol consenso son TL=454, CI=0,4890, RI=0,8050).

Los árboles consenso (*extended majority rule consensus tree*) resultado de los análisis de *neighbor-joining* (o vecino más próximo, NJ) y máxima verosimilitud (ML), se representan en las Figuras 22 y 23 respectivamente.

Los tres árboles presentan topologías muy similares. Así, todos los árboles coinciden en agrupar a las especies pertenecientes a los géneros *Bactrocera*, *Dacus*,

Ceratitis y *Neoceratitis*. El soporte de *bootstrap* de esta agrupación es bajo en el árbol de ML (21), pero muy elevado en los árboles de NJ (90) y MP (87). Además, también en todos los árboles, este gran grupo se divide en otros dos: el que agrupa a los géneros *Ceratitis* y *Neoceratitis*, y el formado por los géneros *Bactrocera* y *Dacus*. El soporte estadístico es significativo tanto en el árbol de NJ (52) como en de MP (78).

Con respecto a los otros tres géneros analizados, *Rhagoletis*, *Anastrepha* y *Toxotrypana*, observamos que en todos los árboles los dos últimos géneros se encuentran más próximos entre sí que a *Rhagoletis*.

El árbol resultante del análisis de NJ es el único en el que las especies del género *Rhagoletis* se sitúan en el mismo grupo que las especies de los géneros *Anastrepha* y *Toxotrypana*; sin embargo, el valor de *bootstrap* que apoya este agrupamiento es muy bajo (21). En los árboles de MP y ML este género aparece como un grupo aparte, separado de todas las demás especies de la familia Tephritidae, siendo además el soporte estadístico de esta separación dado por el valor de *bootstrap* bastante alto (84 y 74 respectivamente).

Por otra parte, la especie *Toxotrypana curvicauda* está estrechamente relacionada con el grupo formado por las especies del género *Anastrepha* tanto en el árbol de ML como en el de NJ, en los que ambos géneros forman un grupo de orden superior; sólo en el árbol de MP se sitúa como un taxón separado de los demás, aunque sigue estando más próximo al género *Anastrepha* que a *Rhagoletis*.

Por último, en todos los árboles se agrupan las especies pertenecientes al mismo género, con la única excepción de la especie *Bactrocera cucurbitae*. Así, no está clara la relación entre esta especie y el resto de especies del género *Bactrocera*, ya que, en los tres árboles, se sitúa como un grupo separado del formado por las demás especies de este género y las especies del género *Dacus*.

Por otro lado, los agrupamientos de especies dentro de los diferentes géneros son también prácticamente idénticos en todos los árboles.

III.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LA ESPECIE *Bactrocera oleae*.

Los 7 cebadores utilizados en esta parte del estudio generaron un total de 115 bandas, todas ellas reproducibles, en 420 individuos pertenecientes a 21 poblaciones de la especie *Bactrocera oleae*. De estas 21 poblaciones, 14 se localizan en España, 1 en Portugal y 6 se distribuyen por el resto del mundo: 4 en otros países mediterráneos (Italia, Grecia, Israel y Túnez) y dos en California (Estados Unidos).

En las Figuras 24 a 30 se muestran los perfiles de RAPD para cada uno de los cebadores utilizados en el estudio. Como puede observarse, cada cebador produce un patrón de amplificación característico, claramente distinguible del producido por los otros cebadores.

A partir de la lectura de los perfiles de RAPD se calculó la frecuencia de cada una de las bandas amplificadas. Estas frecuencias se presentan en las Tablas 10 a 16, en las que aparece también el tamaño de las bandas, que oscila entre 1031 y 248 pares de bases, encontrándose la mayoría de ellas en el rango entre 900 y 300 pares de bases. En la Tabla 17, que resume las anteriores, se comprueba que el número de fragmentos amplificados varía dependiendo del cebador utilizado, oscilando entre 23 con el cebador OPC-06 y 12 con el cebador OPC-18, siendo el promedio de 16,4 bandas amplificadas por cebador. El número total de fragmentos amplificados por los 7 cebadores es 115, oscilando entre 102 en la población de Portugal (Por) y 112 en la población de Jaén (Jae).

Del total de 115 bandas, 17 aparecían en todos los individuos analizados. Basándonos en la frecuencia de cada una de las bandas en las diversas poblaciones, se calculó el polimorfismo de cada una de las 21 poblaciones y de la especie por cebador y en total (Tabla 18). Según el criterio del 95%, la proporción de loci polimórficos (P) es 0,63. El cebador que detecta mayor variabilidad según este criterio es el OPA-17 (P=0,82) y el que menor variabilidad detecta es el OPC-05 (P=0,48). En cuanto a las poblaciones, las poblaciones que presentan mayor variabilidad son las de Jaén (Jae) y Tarragona (Tar), con P=0,70; la población con un menor polimorfismo estimado es la de Mallorca (Mal), con un valor de P de 0,51.

También se llevó a cabo una prueba de χ^2 para cada una de las 98 bandas no constantes con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre poblaciones en

cuanto a la frecuencia de cada banda. Los resultados se muestran en las Tablas 19 a 25. Por último, se llevó a cabo un test de diferencias estandarizadas, cuyos resultados también se muestran en las Tablas 19 a 25, para comprobar en cada una de las poblaciones si la frecuencia de cada banda era mayor (valor mayor de 3) o menor (valor menor de -3) que su frecuencia en el conjunto de las poblaciones. Los resultados de ambos análisis se resumen en la Tabla 26. En ella observamos que el menor número de bandas con frecuencia significativamente diferente de la frecuencia media aparece en la población de Madrid, con sólo dos bandas de diferente frecuencia; el mayor número de bandas de diferente frecuencia aparece en la población de Cáceres (Cac) (12 de las 115 bandas), seguida por las poblaciones de Túnez (Tun) y una de las de Estados Unidos (USA1), en las que 11 de las 115 bandas presentan una frecuencia significativamente distinta de la media. Como promedio, en cada población 6 bandas se apartan de la frecuencia media.

Por otra parte, según el análisis de χ^2 , las frecuencias son significativamente diferentes entre poblaciones en 70 de las 115 bandas. De las bandas cuya frecuencia varía significativamente entre poblaciones, la mayoría (42), se apartan de la media en una sola población, 15 en 2 poblaciones, 8 en 3 poblaciones, 4 en 4 poblaciones, 1 en 5 poblaciones y otra en 10 poblaciones. Estos valores no suman 70 porque en ocasiones el valor de χ^2 es significativo aún cuando la frecuencia de la banda no se aparta significativamente de la media en ninguna población. De la misma manera, en ocasiones la frecuencia de la banda se puede apartar de la frecuencia media en una población sin que la prueba de χ^2 detecte que las frecuencias entre poblaciones son estadísticamente significativas.

III.2.1. Índice de diversidad de Shannon.

La diversidad genética se estimó mediante el índice de diversidad de Shannon. Los valores de esta medida para cada una de las poblaciones estudiadas (H_o) se recogen en la Tabla 27. En la Tabla 28 se encuentran los valores medios de diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}) y la diversidad total (H_{sp}), así como la proporción de la diversidad total que encontramos dentro de poblaciones (H_{pop}/H_{sp}) y entre poblaciones ($H_{sp}-H_{pop}/H_{sp}$).

Los índices de diversidad (H_o) de cada una de las poblaciones oscilan entre 2,93 (una de las poblaciones de California: USA1) y 5,28 (población de Jaén), siendo la estima

de la diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}) 4,61. La estima de la diversidad total (H_{sp}) es 5,38.

Por otra parte, se observa que un gran porcentaje de la diversidad total (el 86%) es atribuible a la diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}/H_{sp}).

III.2.2. Índice de similitud.

Se calculó el índice de similitud de Nei y Li (1979) para los 420 individuos analizados. No se presentan los valores de similitud entre individuos puesto que resultaría una tabla desmesurada y sus valores no son relevantes para la discusión de los resultados. Los valores de similitud interpoblacional e intrapoblacional se presentan en la Tabla 29.

Los índices de similitud intrapoblaconales oscilan entre 0,61 (poblaciones de Cáceres, Cac, Tarragona, Tar, y Gerona, Ger) y 0,70 (poblaciones de Mallorca, Mal, y Málaga, Mlg), con un valor medio de 0,66. Los valores interpoblaconales son ligeramente menores: entre 0,54 (entre Túnez, Tun, y Cáceres) y 0,69 (entre Mallorca, Mal, y Málaga), con un promedio de 0,62. Lo más destacable es el hecho de que los valores de similitud inter e intrapoblaconales sean muy parecidos.

III.2.3. Distancias genéticas.

Se determinaron los valores de distancia genética de Nei (1972) entre las 21 poblaciones estudiadas. Las distancias genéticas, representadas en la Tabla 30, oscilan entre 0,162 (entre la población de Túnez, Tun, y una de las de Sevilla, Sev-1) y 0,024 (entre la población de Grecia, Gre, y la de Madrid, Mad), con una media de 0,058. Las mayores distancias son las que existen entre Túnez y el resto de poblaciones.

III.2.4. Análisis de la varianza molecular (AMOVA).

En primer lugar se llevó a cabo un análisis de la varianza molecular para el conjunto de las 21 poblaciones, calculándose únicamente la proporción de la variabilidad total atribuible a la variación entre poblaciones y entre los individuos pertenecientes a una misma población. A continuación se llevaron a cabo una serie de AMOVAs que consideraban diferentes grupos de poblaciones, calculándose en cada uno de ellos tanto

la proporción de la variabilidad atribuible a las dos fuentes de variación anteriormente citadas, como la debida a la variación entre poblaciones pertenecientes a un mismo grupo. Por último, se llevó a cabo un AMOVA de las 15 poblaciones de España y Portugal. Los resultados de estos análisis se presentan en la Tabla 31. En todos los análisis, todas las fuentes de variación (entre grupos, en el caso en que se considera esta fuente de variación, entre poblaciones y entre individuos dentro de poblaciones) contribuían a la varianza de forma significativa ($P < 0,001$).

Como se puede observar al llevar a cabo la descomposición de la varianza sin tener en cuenta la existencia de grupos de poblaciones, el porcentaje de la varianza total atribuible a las diferencias entre individuos pertenecientes a la misma población es elevadísimo (mayor del 90%), siendo la proporción de la variabilidad atribuible a la variación entre poblaciones tan solo del 8,45%.

Puesto que podría esperarse que las poblaciones de Estados Unidos (USA1 y USA2) constituyeran un grupo diferente del formado por las poblaciones situadas en el área mediterránea, se llevó a cabo un AMOVA en el que se consideraba la existencia de estos dos grupos de poblaciones. De igual modo se llevó a cabo un tercer análisis de la varianza con dos grupos de poblaciones, uno que incluía sólo a Túnez (la única población africana incluida en el análisis) y otro que comprendía el resto de poblaciones. En ambos casos, el porcentaje de variación dentro de poblaciones seguía siendo muy elevado (88,81 en USA / área mediterránea y 85,07% en Túnez / resto de poblaciones) y el porcentaje de variación entre poblaciones pasaba a situarse en torno al 7 % (7,50 y 7,07 respectivamente). Sin embargo, el porcentaje de variación entre grupos era el doble cuando se separaba a Túnez del resto de las poblaciones (7,86%) respecto a cuando eran las poblaciones de Estados Unidos las que constituían un grupo aparte (3,69%). Es decir, la población de Túnez se diferencia más del conjunto que las poblaciones estadounidenses.

Se llevaron a cabo otros dos análisis de la varianza molecular. En el primero se consideran tres grupos: Túnez, poblaciones de Estados Unidos y resto de poblaciones mediterráneas. En el segundo se consideran cuatro grupos que corresponden a los diferentes continentes representados en la muestra: Europa (poblaciones de España, Portugal, Italia y Grecia), Asia Menor (población de Israel), África (población de Túnez) y

América (USA-1 y USA-2). Los porcentajes de variación dentro de poblaciones y entre poblaciones son muy parecidos en ambos análisis: 5,85% en el AMOVA de 3 grupos frente al 5,08% del AMOVA en el de 4 grupos.

También se llevaron a cabo dos análisis de varianza en los que se formaban dos grupos: poblaciones del norte del mediterráneo (Portugal, España, Italia y Grecia) frente al resto (Túnez, Israel y Estados Unidos) y poblaciones de España y Portugal frente al resto (Italia, Grecia, Túnez, Israel y Estados Unidos). En ambos casos se observa que el porcentaje de variación entre grupos, si bien continúa siendo significativo ($P < 0,001$) es de los menores observados hasta el momento, siendo aún menor cuando se separa del resto únicamente las poblaciones de España y Portugal (3,52%).

Por último se llevó a cabo un AMOVA incluyendo únicamente las poblaciones de España y Portugal. La proporción de la variabilidad total que es debida a variaciones individuales dentro de poblaciones es aún mayor que cuando se analizan las 21 poblaciones de todo el mundo (92,28%).

III.2.5. Test de Mantel.

Como se expuso en el apartado de Material y Métodos, si la matriz de distancias genéticas y la matriz de distancias geográficas muestran relaciones similares, el estadístico Z debería ser mayor de lo que se espera por azar. Consideramos que el resultado obtenido es significativo si el valor del 95 por ciento o más de los estadísticos generados es mayor que el valor observado.

En nuestro caso ($r=0,12$, $p[Z \text{ al azar} \leq Z \text{ observado}] = 0,87$), los resultados del test de Mantel indican que no existe relación entre distancia geográfica y distancia genética.

Lo mismo ocurre cuando realizamos el test teniendo en cuenta únicamente las poblaciones españolas ($r=-0,06$, $p[Z \text{ al azar} \leq Z \text{ observado}] = 0,33$).

III.2.6. Valores de F_{ST} y Nm .

En la Tabla 32 se presentan los valores del índice de subdivisión de la población (F_{ST}) y de la tasa efectiva de migración (Nm) obtenidas utilizando tres métodos distintos (Wright, 1951; Weir and Cockerham, 1984 y Lynch and Milligan, 1994), tanto para el

conjunto de poblaciones estudiadas, como para las poblaciones del área mediterránea y las de España y Portugal.

Se observa que, para el conjunto de 21 poblaciones, los valores de F_{ST} oscilan entre 0,081 y 0,250, lo que significaría que entre el 8 y el 25 por ciento de la variación genética de las poblaciones es atribuible a la diferenciación genética entre ellas. A partir del valor de F_{ST} y asumiendo el modelo de población subdividida de Wright (1931) se puede calcular la tasa efectiva de migración (Nm), es decir, el número medio de emigrantes entre una población y otra por generación. En nuestro caso, dependiendo del método utilizado, este valor oscila entre 0,7 y 2,8. En teoría, un valor de Nm mayor que 1 sería suficiente para impedir la diferenciación genética de las poblaciones (Wright, 1931). En sus trabajos de 1970 y 1972, Maruyama llega a la conclusión de que esto también era cierto para otros modelos de población. El valor Nm es 0,7 si lo estimamos por medio del método de Lynch y Milligan y mayor que 1 utilizando cualquiera de los otros dos métodos.

Se realiza el mismo cálculo para todas las poblaciones del área mediterránea, puesto que parece lógico suponer que el flujo génico sea mayor si restringimos el análisis al área mediterránea, excluyendo del mismo a las poblaciones de Estados Unidos. Efectivamente, en este caso la diferenciación entre poblaciones es menor (entre 0,053 y 0,097) y la tasa efectiva de migración mayor (entre 2,3 y 4,5).

III.2.7. Dendrogramas.

A partir de las distancias genéticas de Nei (1972) se elaboraron dos dendrogramas por los métodos del vecino más próximo (NJ) y UPGMA. Los árboles, que se muestran en las Figuras 31 y 32 indicando los valores de *bootstrap*, muestran topologías muy similares.

En general, los valores de *bootstrap* obtenidos son muy bajos. Advertimos que la población de Túnez (junto con Israel la más alejada del resto dentro del área mediterránea, ver mapa en la Figura 15) es la primera en separarse de las demás poblaciones. A continuación se separan, por un lado, las dos poblaciones de California (USA1 y USA2) y, por otro, el resto de poblaciones del área mediterránea. Las dos poblaciones de Estados Unidos forman un grupo separado del resto en el árbol

construido por el método UPGMA, este grupo está sustentado por un valor de *bootstrap* mayor de 50. Seguidamente, del grupo formado por todas las poblaciones mediterráneas excepto Túnez (Tun), la población de Israel se separa de las del norte del Mediterráneo (poblaciones de Portugal, España, Italia y Grecia). La población griega (Gre) que en el árbol NJ se separa del grupo constituido por las demás poblaciones del Mediterráneo norte, en el árbol UPGMA forma parte de este grupo. En cuanto a la población italiana (Ita), en ninguno de los árboles se separa de las poblaciones españolas y de Portugal (Por). Entre el resto de poblaciones no se observa un patrón claro de agrupamientos, aunque se detectan algunos grupos: el constituido por las poblaciones de Portugal, Málaga y Mallorca (Por, Mlg, Mal), por un lado, las dos poblaciones de Valencia, una de las de Sevilla y la de Cáceres (Val1, Sev1, Val2, Cac), por otro, y, por último, el grupo formado por las poblaciones de Alicante y la otra población de Sevilla (Ali, Sev2).

El mismo análisis se llevó a cabo manteniendo únicamente las poblaciones españolas. Los árboles se representan en las Figuras 33 y 34. También en este caso la mayoría de los valores de *bootstrap* son inferiores al 50%. Una de las poblaciones de Sevilla (Sev2) y la de Alicante (Ali) son las primeras en separarse del resto de poblaciones en ambos árboles. Como ocurría al tener en cuenta todas las poblaciones, se mantienen en ambos árboles el grupo formado por las dos poblaciones de Valencia, la otra población de Sevilla y la de Cáceres (Val1, Sev1, Val2, Cac). Las poblaciones de Málaga (Mlg) y Mallorca (Mal) se mantienen cercanas a la de Portugal (Por), aunque en el árbol de NJ están además próximas a las de Madrid (Mad) y Ciudad Real (Ciu), lo que no ocurre en el árbol UPGMA. En este caso, además, las poblaciones de Madrid y Ciudad Real (Mad, Ciu, que sólo aparecían juntas en el árbol de UPGMA de todas las poblaciones) se mantienen agrupadas. Otras poblaciones que se mantienen próximas son las de Jaén (Jae) y Cuenca (Cue), si bien no mantienen su relación con el grupo formado por las poblaciones de Valencia, Sevilla y Cáceres (Val1, Sev1, Val2, Cac).

III.2.8. Análisis de coordenadas principales.

Se realizó un análisis de coordenadas principales con las 21 poblaciones incluidas en el estudio. En las Figuras 35 a y b se muestra la proyección de las

poblaciones sobre los dos ejes principales y los tres ejes principales respectivamente. El primer eje absorbe un 50,60% de la varianza, el segundo el 21,24% y el tercero el 13,37%. En conjunto, las tres coordenadas principales explican el 85,21% de la varianza total. Serían necesarios 5 ejes para explicar el 100% de la varianza.

En la representación gráfica observamos que el primer eje ya separa a Túnez (Tun) del resto de poblaciones. El segundo eje separa, por un lado, a las poblaciones de Estados Unidos (USA1 y USA2) y, por otro, a las de Málaga y Mallorca (Mlg y Mal). Dentro del grupo formado por las demás poblaciones se encuentran algo alejadas del resto las poblaciones de Cáceres y una de las de Sevilla (Cac, Sev1). El tercer eje separa a la población de Israel de las poblaciones más próximas a ella, separando también a la población griega (Gre) de las poblaciones cercanas.

También se realizó el análisis de coordenadas principales con las poblaciones de España y Portugal. En este caso las tres coordenadas principales absorben el 37,56%, el 18,9% y el 15,22% de la varianza respectivamente, siendo necesarios 7 ejes para explicar el 100% de la varianza.

La representación gráfica se encuentra en las Figuras 36 a y b. También en este caso, ya en la representación en dos dimensiones se observan claramente una serie de agrupamientos formados por: las poblaciones de Málaga y Mallorca (Mlg, Mal), las poblaciones de Tarragona, Madrid y Portugal (Tar, Mad, Por); las poblaciones de Gerona y Alicante (Ger, Ali); las poblaciones de Jaén, Cuenca y una de las de Sevilla (Jae, Cue, Sev2) y la población de Cáceres y una de las de Valencia (Cac, Val2). Por último, y muy separada de todas las demás, se encuentra la población de Ciudad Real (Ciu) y también separada de las demás se encuentra la otra población de Sevilla (Sev1). Al fijarnos en el tercer eje observamos que: la población de Tarragona (Tar) se separa de las de Madrid y Portugal (Mad, Por) y la población Sev1, de Sevilla, se acerca a las poblaciones Cac y Val2, de Cáceres y Valencia, mientras que la otra población de Valencia (Val1) se separa claramente de ellas.

III.3. GENOTECA DE LA ESPECIE *Bactrocera oleae*.

Se construyó una genoteca genómica de *Bactrocera oleae* en el fago Lambda DASH II (Stratagene).

Se extrajo DNA genómico de *Bactrocera oleae* hasta conseguir 150 µg, cantidad suficiente para la realización de las pruebas de digestión con la enzima *Eco* RI (Boehringer-Manheim) y la construcción de la genoteca.

Las pruebas de digestión mostraron que la concentración de enzima y el tiempo de digestión óptimos para conseguir una alta concentración de fragmentos de DNA con un tamaño adecuado era de 6 unidades de enzima por µl de reacción y 15 minutos.

Se recuperaron 24 fracciones del gradiente sacarosa y se vio que las fracciones 16 a 24 contenían fragmentos de DNA de entre 9 y 23 Kb, que es el rango de tamaños adecuado para la construcción de la genoteca. El DNA de estas fracciones, una vez lavado, se utilizó para la elaboración de la genoteca.

La titulación de la genoteca mostró que se había obtenido un total de 13.500 pfu, lo que equivale (por homología con *Drosophila melanogaster*, en la que 1 equivalente genómico = 10.000 pfu) aproximadamente a 13,5 equivalentes genómicos.

Una vez conocido el título de la genoteca original, ésta se amplificó, siendo el título de la genoteca amplificada $5,2 \times 10^7$ pfu/µl.

Discusión.

IV-DISCUSIÓN

IV.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS EN LA FAMILIA TEPHRITIDAE.

Para discutir las relaciones filogenéticas existentes en la familia Tephritidae nos basaremos en las clasificaciones existentes hasta el momento, que se han elaborado utilizando principalmente información procedente de caracteres morfológicos.

Según la clasificación de White y Elson-Harris (1994), las especies incluidas en nuestro estudio pertenecerían a los siguientes grupos:

- Subfamilia Trypetinae
 - Tribu Toxotrypanini (*Anastrepha* y *Toxotrypana*)
 - Tribu Trypetini. Subtribu Carpomyinia (*Rhagoletis*)
- Subfamilia Dacinae
 - Tribu Dacini (*Bactrocera* y *Dacus*)
 - Tribu Ceratitini (*Ceratitis* y *Neoceratitis*)

Posteriormente se lleva a cabo una reorganización de la tribu Trypetini (Han *et al.*, 1993; Han and Freidberg, 1994). Al restringir esta tribu se excluye a la subtribu Carpomyina, que pasa a adquirir categoría de tribu. Tanto en la clasificación facilitada por el NCBI (National Centre for Biotechnology Information, Estados Unidos: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>) como en la del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) (<http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera>) se adopta la definición más estricta de la tribu Trypetini, quedando la clasificación de los grupos incluidos en este análisis de la siguiente forma:

- Subfamilia Trypetinae
 - Tribu Toxotrypanini (*Anastrepha* y *Toxotrypana*)
 - Tribu Carpomyini (*Rhagoletis*)
- Subfamilia Dacinae
 - Tribu Dacini (*Bactrocera* y *Dacus*)
 - Tribu Ceratitini (*Ceratitis* y *Neoceratitis*)

Nos centraremos en primer lugar en el examen de las secuencias tanto de nucleótidos como, en el caso del citocromo b y la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa, de aminoácidos. A continuación analizaremos las distancias genéticas entre diferentes taxones y, por último, discutiremos los árboles filogenéticos.

IV.1.1. Análisis de las secuencias.

Para llevar a cabo este trabajo se ha estudiado, en 46 individuos pertenecientes a 22 especies (Tabla 1), una región de DNA mitocondrial (mtDNA) que corresponde a las posiciones 11.546 a 11.840 de *Drosophila yakuba*. La longitud de las secuencias en las distintas especies oscila entre 286 y 301 pb; la longitud de las secuencias alineadas es de 308 sitios debido a la existencia de indels (inserciones y deleciones). La proporción A:T:G:C es 45:35:9:11 (Tabla 1). Esta proporción no sólo está altamente conservada en todas las especies incluidas en el análisis, sino que es también representativa de las proporciones existentes en otros taxones de dípteros, incluyendo *Drosophila* (Clary and Wolstenholme, 1985) y otras especies de tefrítidos (Han and McPheron, 1997). Se ha observado en el mtDNA de los insectos un alto contenido en A+T que puede ser el resultado, como proponen Clary y Wolstenholme (1985), de una asimetría en la sustitución de nucleótidos en determinados taxones o de la existencia de un origen común. En el mtDNA de *Drosophila* existe una selección continua de nucleótidos A+T en todos los sitios en los que esto es compatible con la función (Wolstenholme and Clary, 1985).

La proporción de transiciones respecto a las transversiones es en las especies estudiadas, como promedio, 2,48 (Tabla 6). En mamíferos se sabe que la tasa de sustitución de nucleótidos en el DNA mitocondrial es muy superior a la del DNA nuclear y que hay un notable exceso de transiciones (Brown, 1983). Sin embargo, datos procedentes del análisis de secuencias de *Drosophila* (Clary and Wolstenholme, 1985; Satta *et al.*, 1987; Nigro *et al.*, 1991) indican que la tasa de sustitución en el DNA mitocondrial es prácticamente la misma que en los genes nucleares de copia única y que no existe un exceso significativo de transiciones. No obstante, otros trabajos llevados a cabo con *Drosophila* (DeSalle *et al.*, 1981; Tamura, 1992) encuentran una tasa de sustitución mayor en el DNA mitocondrial que en el nuclear y un importante exceso de transiciones. Tamura (1992) arguye que la razón de esta discrepancia puede ser que las especies analizadas en los primeros estudios con *Drosophila* no estaban muy relacionadas y que el número de caracteres estudiados era muy pequeño. Así, se ha observado en estudios recientes un importante exceso de transiciones tanto en otros

grupos de insectos (la proporción transiciones:transversiones encontrada en un género de hemípteros por Damgaard, 2000, es 1,81), como en la familia Tephritidae (proporción transiciones:transversiones 1,78; Han and McPheron, 1994). En este trabajo también se encuentra un exceso de transiciones.

La secuencia analizada corresponde, en *Drosophila yakuba*, a los últimos 106 nucleótidos del gen *cytb*, una pequeña secuencia intergénica de 6 nucleótidos, el gen del tRNA de serina y, solapando con este último y en la cadena complementaria, los últimos 145 nucleótidos del gen *ND1*, que codifican la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa. Los datos correspondientes a la secuencia de la región estudiada se resumen en la Tabla 7.

La longitud de la secuencia estudiada oscila, en las especies pertenecientes a la familia Tephritidae, entre 286 y 301 pb. Las secuencias de nucleótidos alineadas se representan en la Figura 18. Hay que tener en cuenta que todas las indels se sitúan en zonas que no afectan a la función de los genes estudiados, ya sea en la región intergénica, en el extremo final de los genes codificadores de proteínas (en los últimos 15 sitios del gen *cytb* y en los últimos 21 sitios del gen *ND1*) o en zonas del gen de tRNA-Ser que no corresponden ni al lazo del anticodón ni a regiones apareadas en la estructura secundaria de mismo. Dicho de otra forma, las inserciones y deleciones ocurren en las regiones que sufren una menor presión selectiva.

En cuanto a las sustituciones, la mayoría de las sustituciones nucleotídicas en las regiones correspondientes a los genes *cytb* (55,8%) y *ND1* (61,7%) se observan, como era de esperar, en la tercera posición del codón (Tabla 7). Estos porcentajes son del orden de los observados en la familia Tephritidae en otros estudios; así, el tanto por ciento de sustituciones en la tercera posición del codón observado en *Rhagoletis pomonella* (Smith and Bush, 1997) es 69,1.

En la región correspondiente al tRNA de serina se han detectado 17 sustituciones (Tabla 7). Se ha observado que los genes de tRNA están muy conservados en dípteros (Phasley and Ke, 1992), aunque los mitocondriales en menor medida que los nucleares (Clary and Wolstenholme, 1985). De las 17 sustituciones, 9 corresponden a

zonas del tRNA que no están apareadas, de modo que no afectan a su estructura secundaria. Por otra parte, tanto el lazo del anticodón como la región apareada que lo precede están estrictamente conservados tanto en longitud como en secuencia.

Por tanto, en el caso de las sustituciones, como en el de las indels, observamos que la mayoría tienen lugar en las zonas de la molécula que se espera estén sometidas a una menor presión selectiva.

IV.1.2. Identificación taxonómica.

Las secuencias de nucleótidos de las regiones correspondientes a los genes que codifican el citocromo b (Cytb) y la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (ND1) se tradujeron para generar las correspondientes secuencias de aminoácidos, que se representan en las Figuras 19 y 20.

En la secuencia correspondiente a los últimos 34 aminoácidos (35 en las dos especies del género *Rhagoletis*, *Rc* y *Rp*) del citocromo b se observan en la familia Tephritidae 13 sustituciones con respecto a la secuencia de *Drosophila yakuba*, 8 de las cuales son sustituciones entre aminoácidos del mismo grupo (Tabla 7). En la secuencia de 44 aminoácidos de ND1 (43 en *Dacus ciliatus*, *Dc* y 45 en *Dacus demmerezi*, *Dd*) se observan 21 sustituciones en esta familia, de las cuales 10 ocurren entre aminoácidos del mismo grupo (Tabla 7). Además de que gran parte de las sustituciones se producen entre aminoácidos del mismo grupo, la región que estudiamos es la correspondiente a los últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal tanto del citocromo b como de ND1, que probablemente no desempeñan una función importante en estas proteínas, por lo que las mutaciones podrían no estar tan restringidas como en otros dominios de las mismas. En el caso del citocromo b, esto queda demostrado en el artículo de Howell (1989), en el que se comparan las secuencias de aminoácidos de Cytb de 7 organismos tanto procarióticos como eucarióticos y se observa que, como era de esperar, el extremo carboxilo terminal está entre las regiones menos conservadas.

Por otra parte, se observan una serie de sustituciones de aminoácidos que aparecen en todos los miembros de un determinado taxón, por lo que pueden ser

consideradas sinapomorfias (caracteres derivados compartidos) propias de estos. Este tipo de caracteres puede ser muy útil para la identificación del grupo al que pertenece un determinado individuo. Recientemente se han comenzado a utilizar diferentes tipos de marcadores moleculares para la identificación de diferentes especies, incluyendo especies de insectos (Kambhampati *et al.*, 1992; Paskewitz *et al.*, 1993; Raich *et al.*, 1993). En tefrítidos, en los que prácticamente toda la información taxonómica procede de caracteres morfológicos de adultos, estos métodos presentan la ventaja añadida de que permiten identificar a los individuos independientemente del estadio de desarrollo en que se encuentren. Para la identificación de especies de tefrítidos se han utilizado diversas técnicas: AFLP (Kakouli-Duarte *et al.*, 2001), PCR-RFLP (Salazar *et al.*, 2002), PCR y secuenciación (Douglas and Haymer, 2001) y RAPD (Sonvico *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2001). Sin embargo, en la bibliografía de tefrítidos no existe información relacionada con sustituciones en la secuencia de aminoácidos propias de determinados grupos, por lo que los resultados que aquí se presentan son los primeros datos de este tipo obtenidos en la familia Tephritidae.

Las sustituciones observadas, que se presentan en la Tabla 8, son las siguientes:

- Dentro la tribu Toxotrypanini (*Anastrepha* y *Toxotrypana*) observamos 2 sustituciones en la secuencia de ND1 compartidas por todas las especies de la tribu, 3 sustituciones (1 en Cytb y 2 en ND1) compartidas por todas las especies del género *Anastrepha* y otras 3 (todas en ND1) compartidas por distintos subgrupos.
- De la misma forma, en el género *Rhagoletis* (tribu Carpomyini) se observan 2 sustituciones características (1 en Cytb y otra en ND1).
- En la tribu Dacini, todas las sustituciones observadas se encuentran en la región correspondiente a ND1. De ellas 3 son compartidas por todas las especies de esta tribu representadas en este estudio (excepto *Bactrocera oleae* en dos de los casos), 2 caracterizan al género *Bactrocera* exceptuando a *B. cucurbitae* en uno de los casos y una sexta sustitución es característica del subgrupo formado por las especies *B. cacuminata* y *B. dorsalis*.

- Por último, en la tribu Ceratitini encontramos 2 sustituciones en ND1 comunes a los dos géneros de esta tribu representados en el estudio (*Ceratitits* y *Neoceratitits*) y una en Cytb que caracteriza al género *Ceratitits*.

En definitiva, puesto que estas sustituciones son características de los miembros de un determinado taxón (y aún con las debidas reservas ya que sólo se estudian dos individuos por especie), podemos considerarlas como caracteres taxonómicos moleculares.

IV.1.3. Distancias genéticas.

Las distancias genéticas (representadas en la Tabla 9) observadas en nuestra muestra oscilan entre un 0 y un 18,3% de sustituciones en el total de sitios de la secuencia estudiada, con una media de 12,1%. Estas distancias son del mismo orden que las encontradas en otros estudios de tefrítidos. Así, en el estudio de la filogenia de tefrítidos llevado a cabo por Han y McPheron (1997), en el que se analizó una secuencia del DNA ribosómico (rDNA) 16S de individuos de especies pertenecientes a tres subfamilias de la familia Tephritidae, se encontraron unas distancias entre especies que oscilaban entre el 1,8 y el 20%, con una media del 11%.

En nuestra matriz de distancias (Tabla 9) advertimos que las menores distancias genéticas entre especies son las encontradas entre *B. tryoni* y *B. neohumeralis* (*Bt* y *Bn*): entre 0 y 0,7. Estas distancias son del orden de las que existen entre individuos de la misma especie cuando las secuencias de ambos no son idénticas. Como se tratará con mayor detalle más adelante, *Bt* y *Bn* son especies gemelas que forman parte del complejo de especies *tryoni*.

También son muy pequeñas las distancias entre los individuos que se ha propuesto que podrían pertenecer a una nueva especie distinta de *C. rosa*, que recibiría el nombre de *C. fasciventris* (comunicación personal, Dr. N. Zenz), y los otros dos individuos pertenecientes a esta especie (0 a 1,8). Si se trata de dos especies distintas, estas no se pueden distinguir analizando esta secuencia. De hecho, las menores distancias son las que existen entre el individuo denominado *Crm* y los dos individuos que pertenecerían a la especie *C. fasciventris* (*Cfh*, 0,7, y *Cfm*, 0).

Algo mayores, aún cuando siguen siendo bajas, son las distancias existentes entre las distintas especies del género *Anastrepha* pertenecientes al grupo *fraterculus*: 1,8 entre *A. ludens* (Al) y *A. suspensa* (As), 2,1 entre *A. ludens* y *A. obliqua* (Ao) y 2,54 entre *A. obliqua* y *A. suspensa*.

En cuanto a las distancias entre especies del mismo género, las menores son las observadas en el género *Anastrepha* (entre 1,8 y 7). En el género *Bactrocera* encontramos el rango más amplio (entre 0 y 13,4), lo que indicaría que se trata de un grupo bastante heterogéneo. En el resto de géneros, las distancias entre especies oscilan entre 4,9 y 10,2 sustituciones nucleotídicas por cada 100 sitios (10,2 en *Rhagoletis*, 9,2 en *Dacus* y entre 4,9 y 7,7 en *Ceratitis*). En otros grupos de insectos se han observado distancias entre especies del mismo género similares a las encontradas en nuestro estudio: 0,3 a 13,4 entre las especies pertenecientes a distintos géneros de lepidópteros (Wahlberg and Zimmermann, 2000) y entre 3 y 10 % entre distintas especies pertenecientes al género de coleópteros *Ips* (Cognato and Sperling, 2000); en el género *Rhagoletis*, Smith y Bush (1997) encontraron distancias entre 0 y 15,8.

De las distancias entre géneros de la misma tribu, las menores son las existentes entre *Toxotrypana* y *Anastrepha* (8,8 a 10,6), lo que confirma la estrecha relación existente entre ellos, como se comentará con más detalle al discutir los árboles filogenéticos. La distancia entre los géneros *Ceratitis* y *Neoceratitis*, pertenecientes ambos a la tribu Ceratitini, es algo mayor (8,5 a 11,3). Aún mayores son las distancias encontradas entre los dos géneros de la tribu Dacini (*Bactrocera* y *Dacus*): 8,8 a 11,3.

En cuanto a las distancias entre tribus de la misma subfamilia, estas son menores en la subfamilia Dacinae (Dacini y Ceratitini) que en la subfamilia Trypetinae (Carpomyini y Toxotrypanini): 10,2 a 16,9 y 8,8 a 14,4 respectivamente.

En definitiva, como cabría esperar, las distancias genéticas son cada vez más elevadas conforme vamos comparando taxones de orden superior.

IV.1.4. Árboles filogenéticos.

En cuanto a la filogenia de los grupos de tefrítidos analizados, las topologías de los árboles obtenidos por los diferentes métodos (Figuras 21, 22 y 23) concuerdan en líneas generales con las clasificaciones basadas en caracteres morfológicos.

Una característica de todos los árboles filogenéticos elaborados en este estudio es que el soporte estadístico dado por los valores de *bootstrap* a los grupos de taxones de orden superior (subfamilias y tribus) en ocasiones no es significativo. En estudios de simulación (Sitnikova *et al.*, 1995) se ha visto que el test de *bootstrap* puede subestimar el grado de apoyo estadístico de los grupos de especies, sobre todo a medida que aumenta el número de especies del árbol y disminuye la longitud de las ramas internas. Este puede ser exactamente nuestro caso. Han y McPherson (1997) proponen que las ramas que conectan estos taxones en la filogenia “real” podrían ser demasiado cortas para ser reconocidas con un apoyo estadístico importante debido a las sustituciones homoplásicas (paralelismos, convergencias y reversiones) que se han producido desde la divergencia de estos taxones. Para hacer esta afirmación se basan en el hecho de que la familia Tephritidae, la de mayor tamaño dentro de la superfamilia Tephritoidea, es también la única predominantemente fitófaga (McAlpine, 1989), de modo que se puede suponer que la fitofagia es una sinapomorfia de la familia Tephritidae o, al menos, de la mayor parte de los integrantes de esta familia. Según estos autores, poco después de que el ancestro común de los tefrítidos evolucionara hacia la fitofagia, pudo producirse una rápida radiación adaptativa, de modo que se podría haber formado un gran número de taxones en un periodo de tiempo relativamente corto, lo que daría lugar a ramas interiores cortas. A favor del argumento de la rápida radiación adaptativa está el hecho de que se hayan formado más de 4.000 especies (actualmente se conocen 4.352) en un periodo de 40-70 millones de años. Sin embargo, para comprobar esta hipótesis sería necesario estudiar el registro fósil, y actualmente sólo se tiene conocimiento de un pequeño número de especímenes fósiles de tefrítidos. En cualquier caso, si esta radiación adaptativa explosiva se hubiera producido, probablemente se podría resolver el problema del bajo soporte estadístico de los nodos cercanos a la raíz aumentando el número de caracteres estudiados, como se ha demostrado en recientes estudios de simulación (Hedges and Bezy, 1993).

Como decíamos al comienzo de esta discusión, basándonos en las clasificaciones morfológicas esperaríamos que nuestra filogenia siguiera el siguiente esquema general:

- Subfamilia Trypetinae
 - Tribu Carpomyini
 - Género *Rhagoletis*
 - Tribu Toxotrypanini
 - Género *Toxotrypana*
 - Género *Anastrepha*
- Subfamilia Dacinae
 - Tribu Dacini
 - Género *Bactrocera*
 - Género *Dacus*
 - Tribu Ceratitini
 - Género *Ceratitis*
 - Género *Neoceratitis*

Según esta clasificación, sería de esperar que una primera división de los árboles diera lugar a dos grupos de especies correspondientes a las subfamilias Trypetinae y Dacinae respectivamente. Observamos que, efectivamente, los cuatro géneros de la subfamilia Dacinae (*Bactrocera*, *Dacus*, *Ceratitis* y *Neoceratitis*) están agrupados. Sin embargo, el grupo formado por las especies *Anastrepha*, *Toxotrypana* y *Rhagoletis*, que son las especies que se considera que forman parte de la subfamilia Trypetinae, solo aparece en el árbol del vecino más próximo (NJ; Figura 22), aunque con un soporte estadístico muy bajo; en los árboles construidos por medio de los métodos de máxima parsimonia (MP; Figura 21) y máxima verosimilitud (ML; Figura 23), el género *Rhagoletis* no se agrupa con los demás géneros de la subfamilia Trypetinae, sino que forma un grupo aparte. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la subfamilia Trypetinae se caracteriza por la falta de caracteres derivados que se encuentran en otras subfamilias de tefrítidos, por lo que es probable que no se trate de un grupo

monofilético (Foote *et al.*, 1993). Si bien carecemos del grado de apoyo estadístico necesario para afirmarlo con rotundidad, nuestros resultados apuntan en la dirección del carácter polifilético de esta subfamilia.

Por tanto, dentro de la considerada hasta el momento como subfamilia Trypetinae, distinguimos dos grupos: por una lado la tribu Carpomyini, representada por el género *Rhagoletis* y, por otro, la tribu Trypetini, representada por los géneros *Anastrepha* y *Toxotrypana*.

Las dos especies de *Rhagoletis* forman un grupo, pero el soporte estadístico de esta agrupación es muy bajo en los árboles de NJ y ML. En determinados estudios se ha defendido la naturaleza no monofilética del género *Rhagoletis* (Han and McPherson, 1997). No obstante, ni el pequeño número de especies estudiadas ni el grado de apoyo estadístico obtenido nos permiten confirmar o desmentir el carácter monofilético del género.

En cuanto a la tribu Toxotrypanini, aunque en un primer momento se consideró que el género *Toxotrypana* pertenecía a la tribu Dacini (Hardy, 1955; Loew, 1973), existe una importante evidencia basada en caracteres morfológicos de que este género y el género *Anastrepha* constituyen un grupo monofilético. Snow (1895, citado en Norrbom *et al.*, 1999b) fue el primero en sugerir la relación entre los géneros *Anastrepha* y *Toxotrypana*, pero sus afirmaciones pasaron inadvertidas o fueron ignoradas. Sólo recientemente se ha demostrado de forma convincente la estrecha relación existente entre ambos géneros utilizando datos procedentes de estudios inmunológicos (Kitto, 1983) y moleculares (Han and McPherson, 1994 y 1997), quedando claro que el parecido entre *Toxotrypana* y los integrantes de la tribu Dacini es sólo superficial (Norrbom and Foote, 1989). El carácter monofilético de la tribu Toxotrypanini y la estrecha relación entre *Anastrepha* y *Toxotrypana*, aunque quedan menos evidentes en el árbol de MP, son apoyados por los árboles de ML y NJ, con valores altos de *bootstrap*. También apoyan la existencia de esta relación la presencia en la secuencia de aminoácidos de ND1 de dos sustituciones que afectan únicamente a las especies de los géneros *Anastrepha* (*Al*, *Ao*, *As*, *Asp* y *Ast*) y *Toxotrypana* (*Tc*) y que, como se

comentó en el apartado dedicado al análisis de secuencias, pueden ser consideradas sinapomorfias (caracteres derivados compartidos).

El estudio de Norrbom y colaboradores (1999b) apunta a que no existen evidencias morfológicas del carácter monofilético del género *Anastrepha* con respecto a *Toxotrypana*. McPheron y colaboradores (1999), basándose en una secuencia de mtDNA (el gen del rRNA 16S), sugieren que el género *Anastrepha* puede ser parafilético con respecto a *Toxotrypana*. El presente estudio, sin embargo, apoya la hipótesis del carácter monofilético del género *Anastrepha*, con un apoyo estadístico significativo en todos los árboles (valores de *bootstrap* entre 76 y 90). Además, al analizar las secuencias de aminoácidos de Cytb y ND1 observamos la existencia de tres posibles sinapomorfias: tres sustituciones, una en Cytb y dos en ND1, compartidas por todas las especies del género *Anastrepha*, pero que no aparecen en *Toxotrypana*.

No se sabe demasiado acerca de las relaciones entre las distintas especies de *Anastrepha*. Se han descrito 18 grupos de especies, que se recopilan en Norrbom y colaboradores (1999b), basándose principalmente en caracteres morfológicos, pero no se ha llevado a cabo un análisis cladístico detallado de las relaciones entre ellos. Parece, sin embargo, que la mayoría de estos grupos son monofiléticos, aunque algunos precisan un examen más exhaustivo. Así, tres sinapomorfias apoyan el supuesto carácter monofilético del grupo *fraterculus* (Norrbom, 1999b); también el análisis de la secuencia del gen de rRNA 16S (McPheron *et al.*, 1999) sugiere que este grupo es monofilético, aunque no es concluyente al respecto. En nuestro caso se observa que en todas las topologías, y con un apoyo estadístico significativo, se forma un grupo con las especies *A.ludens* (Al), *A.obliqua* (Ao) y *A.suspensa* (As), representantes del grupo *fraterculus* en nuestra muestra. Existen también en este caso dos posibles sinapomorfias en la secuencia de aminoácidos de ND1 que avalan la hipótesis de la naturaleza monofilética del grupo *fraterculus*, si bien una de ellas es compartida con *Toxotrypana curvicauda*. La otra posible sinapomorfia consiste en la sustitución de una fenilalanina por una valina. En esta última posición aparece una isoleucina en las especies *A.serpentina* (Asp) y *A.striata* (Ast) (pertenecientes, respectivamente, a los grupos *serpentina* y *striata*) que además se agrupan en los árboles de NJ, ML y el de MP (aunque los valores de *bootstrap* no son muy altos). Se

ha hablado de la posible existencia de una relación entre los grupos de especies *striata* y *serpentina* (Norrbon *et al.*, 1999b); nuestros datos también apuntan en esta dirección.

En cuanto a la subfamilia Dacinae, la topología de todos los árboles confirma su carácter monofilético, aunque los valores de *bootstrap* no son muy elevados. No obstante, la coincidencia de varios árboles obtenidos por distintos métodos otorga mayor credibilidad a la filogenia inferida por medio de ellos (Kim, 1993; Avise, 1994). Estudios previos tanto morfológicos (Foote *et al.*, 1993) como moleculares (Han and McPheron, 1997) avalan este resultado.

Asimismo, se deduce de todos los árboles, con un apoyo estadístico significativo, que las tribus Dacini y Ceratitini son también monofiléticas, como sugiere Korneyev (1999). Existen además, en la secuencia de aminoácidos de ND1, sustituciones exclusivas de cada una de estas tribus (dos en Ceratitini y tres en Dacini) que pueden ser consideradas sinapomorfias que avalan el carácter monofilético de ambos grupos.

La tribu Dacini está constituida por las moscas que en principio se agruparon en el género *Dacus*; este género fue dividido en dos géneros siguiendo el criterio de Drew (1989):

-*Dacus*: Especies con los terguitos abdominales fusionados, predominantemente africanas; atacan principalmente a las familias de plantas endémicas Asclepiadaceae y Cucurbitaceae.

-*Bactrocera*: Especies con los terguitos abdominales libres, mayoritariamente del sudeste asiático y el Pacífico sur; atacan principalmente a las frutas endémicas de la selva tropical y subtropical.

Los conocimientos de las relaciones entre especies son mayores en esta tribu que en otras tribus pertenecientes a la familia Tephritidae. Tanto en el género *Bactrocera* como en el género *Dacus* se han establecido varios subgéneros. Las especies de la tribu Dacini incluidas en este estudio pertenecen a los subgéneros *Bactrocera* (especies *Bactrocera cacuminata*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. neohumeralis*, *B. tryoni* y *B. zonata*), *Daculus* (*B. oleae*), *Zeugodacus* (*B. cucurbitae*), *Dacus* (*Dacus demmerezi*) y *Didacus* (*D. ciliatus*) (datos procedentes de White and Elson-Harris, 1994).

En nuestro estudio no existe una separación clara de los géneros *Bactrocera* (*Bc*, *Bca*, *Bd*, *Bl*, *Bn*, *Bo*, *Bt* y *Bz*) y *Dacus* (*Dc* y *Dd*) en ninguno de los árboles. La especie *Bactrocera cucurbitae* (*Bc*) se separa del resto de las especies del género *Bactrocera*, quedando más cerca que éstas de las especies de *Dacus*, que todos los árboles señalan como un grupo monofilético. Esta especie, como otras del subgénero *Zeugodacus*, tiene un tipo de relación con sus hospedadores que le diferencia de otras especies del género, atacando, más que a la fruta, a las flores de las cucurbitáceas, una característica más típica de *Dacus* que de *Bactrocera* (White and Elson-Harris, 1994). Resultados similares a los nuestros, en los que *B. cucurbitae* está más próxima a *Dacus* que a otras especies de *Bactrocera*, se han obtenido anteriormente utilizando otros marcadores (Malacrida *et al*, 1996).

Continuando con el género *Bactrocera*, llama la atención la imposibilidad de distinguir por medio del procedimiento utilizado a las especies *B. neohumeralis* (*Bn*) y *B. tryoni* (*Bt*), ambas simpátridas en toda la zona ocupada por *B. neohumeralis* y pertenecientes al complejo de especies *tryoni*. También en este caso existen antecedentes. Morrow y colaboradores (2000) observan que, a pesar de la evidencia fenotípica de que estas son dos especies distintas, la diferenciación genética utilizando cuatro marcadores moleculares (secuencias de los genes nucleares *white* e *ITS2* y secuencias mitocondriales de los genes citocromo b y subunidad II de la citocromo oxidasa) es muy pequeña. Según estos autores, el gran parecido genético sugiere, bien que la especiación ha ocurrido recientemente y de forma muy rápida, o bien que los polimorfismos compartidos son debidos a introgresión o hibridación.

Por último, las especies *B. cacuminata* (*Bca*) y *B. dorsalis* (*Bd*), ambas pertenecientes al complejo de especies *dorsalis* (White and Elson-Harris, 1994), forman un grupo avalado por un valor de *bootstrap* alto en todos los árboles. Existe, además, una posible sinapomorfia en la secuencia de ND1 que confirmaría la existencia de una estrecha relación entre estas especies.

La otra tribu de la subfamilia Dacinae incluida en este trabajo es la tribu Ceratitini. Sus representantes en nuestra muestra son los géneros *Neoceratitis* y *Ceratitis*. El carácter monofilético de esta tribu, así como la estrecha relación de los dos géneros queda claro, con un elevado soporte estadístico, en todos los árboles. También en

todos los árboles el género *Ceratitis* aparece como un género monofilético, con un apoyo estadístico significativo en los árboles de MP y ML. De nuevo, existe una sustitución en la secuencia de aminoácidos de una proteína (en este caso citocromo b) que corrobora el carácter monofilético del grupo. En este género, como en *Bactrocera* y *Dacus*, se han propuesto varios subgéneros. En nuestro estudio se incluyen tres especies del género *Ceratitis*: *Ceratitis (Ceratalapsis) cosyra*, *C. (Ceratitis) capitata* y *C. (Pterandrus) rosa* (datos sobre los subgéneros procedentes de White and Elson-Harris, 1994).

En todos los árboles se observa, con un soporte estadístico alto, una estrecha relación entre las especies *C.rosa (Cr)* y *C.capitata (Cc)*, que forman un grupo.

Como se expuso en el apartado de Material y Métodos, en este análisis se incluyeron dos individuos que se ha propuesto que podrían pertenecer a una nueva especie a la que se le daría el nombre de *Ceratitis fasciventris* (N.Zenz, comunicación personal). Nuestros resultados no apoyan claramente esta hipótesis, ya que estos dos individuos sólo se separan de los otros dos ejemplares de *Ceratitis rosa* en el árbol de NJ. Además, como se indicó anteriormente, las distancias genéticas entre los cuatro individuos son del orden de las que se observan entre otros individuos de la misma especie.

En resumen, a pesar de la multitud de trabajos basados en caracteres morfológicos y ecológicos llevados a cabo hasta el momento, aún existen controversias en cuanto a la clasificación de los tefrítidos. Los estudios moleculares pueden proporcionar una nueva fuente de caracteres que ayuden a esclarecer esta clasificación. Hasta el momento sólo se han llevado a cabo tres estudios moleculares sobre la filogenia de la familia Tephritidae (Han and McPheron, 1994; Malacrida *et al*, 1996; Han and McPheron, 1997), de los cuales solo el último utilizó una secuencia de DNA mitocondrial (mtDNA), concretamente el gen del RNA ribosómico 16S.

Este trabajo muestra la utilidad de los datos procedentes de la secuenciación de una nueva región de mtDNA para estudiar las relaciones filogenéticas entre tefrítidos a todos los niveles taxonómicos, desde grupos de especies a subfamilias.

El estudio de esta región de DNA mitocondrial, por tanto, nos permite explorar la historia evolutiva de la familia Tephritidae. Aclarar las relaciones entre distintos linajes de tefrítidos hace

posible tanto comprobar las hipótesis morfológicas como construir nuevas hipótesis que determinen la dirección que deben seguir los nuevos estudios. Un conocimiento más exhaustivo de la filogenia de la familia contribuirá a la comprensión de la evolución de los caracteres relacionados con el carácter de plaga de este grupo y, por tanto, podrá aportar información útil para el desarrollo de programas de control integrado.

IV.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Bactrocera oleae*.

En este trabajo se analizaron, por medio de la técnica RAPD-PCR, 420 individuos de la especie *Bactrocera oleae*. Estos individuos pertenecían a 21 poblaciones procedentes de diferentes continentes. Por medio de este análisis se trataba de determinar los niveles de variabilidad genética y los patrones de distribución de la misma en la especie *Bactrocera oleae*, así como esclarecer las relaciones entre las poblaciones de esta especie incluidas en el estudio. También se discute la utilidad de esta técnica para la identificación de bandas características de especie.

IV.2.1. Cantidad de variabilidad genética.

Para el estudio se utilizaron 7 cebadores diferentes, obteniéndose 115 bandas. De estas 115 bandas, 17 resultaron ser comunes a todos los individuos estudiados (Tablas 10 a 16; resumen en la Tabla 17). Estos resultados concuerdan con los obtenidos, también mediante RAPD-PCR, por Callejas *et al.* (1998), que utilizando 7 cebadores diferentes a los empleados en este trabajo obtienen 17 bandas constantes de un total de 94 fragmentos amplificados.

Por otra parte, el índice de polimorfismo según el criterio del 95% fue de 0,63 (Tabla 18). Los niveles de polimorfismo observados en otros insectos utilizando la técnica RAPD-PCR son muy variados. Así, se encuentran en torno a 0,8 en distintas especies pertenecientes al género *Anopheles* (de Sousa *et al.*, 1999: 0,82 en *A. albifasciatus*; Manguin *et al.*, 1999: 0,8 en *A. darlingi*); en la especie *Myzus persicae* (Zitoudi *et al.*, 2001) el polimorfismo estimado es 0,53; en la especie *Daktulosporia vitifoliae*, Downie (2000) estima un valor de polimorfismo de 0,51, mientras que en otro estudio Lin y colaboradores (1999) estiman valores de 0,14 en una población de esta especie y 0,15

en otra. Desgraciadamente, no disponemos de datos para la comparación procedentes de la familia Tephritidae, en general, y de *Bactrocera oleae*, en particular, ya que apenas se han llevado a cabo estudios de genética de poblaciones en esta especie, y los pocos que se han llevado a cabo utilizaban en su mayor parte isoenzimas. Los datos procedentes de RAPD e isoenzimas no son directamente comparables, dado que se espera que el nivel de variabilidad detectado por las isoenzimas sea mucho menor que el detectado a nivel de DNA en general y de RAPD en particular (Nei, 1987; Clegg, 1989; Lu and Rank, 1996). En cualquier caso, los datos de este estudio, que indican que el 63% de los loci son polimórficos según el criterio del 95%, así como la comparación de los mismos con los obtenidos en otras especies de insectos, nos indican que los niveles de polimorfismo en la especie *Bactrocera oleae* son bastante elevados.

Los valores del índice de diversidad de Shannon (H_0) de cada una de las poblaciones oscilan entre 2,93 y 5,28, siendo la estima de la diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}) 4,61 y la de la diversidad total (H_{sp}) 5,38 (Tablas 27 y 28).

Como decíamos, se han llevado a cabo muy pocos estudios de genética de poblaciones en la especie *Bactrocera oleae*. De estos, la mayor parte se han realizado con isoenzimas e incluyen muy pocas poblaciones (entre 1 y 4) (trabajos recopilados en Loukas, 1989 y Zouros and Loukas, 1989; Ochando *et al.*, 1994; Ochando and Reyes, 2000). También se ha publicado un trabajo aplicando la técnica RAPD al estudio de las características genéticas de dos poblaciones españolas (Callejas *et al.*, 1998). En todos ellos se llega también a la conclusión de que la especie *Bactrocera oleae* presenta una elevada variabilidad genética, lo que parece indicar que esta elevada variabilidad es una característica de la especie.

Durante mucho tiempo se mantuvo que, de acuerdo con la teoría (Gillespie and Langlay, 1974) y algunos estudios experimentales (Powell, 1971; Levinton, 1973), cabía esperar una correlación positiva entre la cantidad de variabilidad genética de una especie y su grado de diversidad ambiental. En la especie *Bactrocera oleae*, por tanto, se esperaría una escasa variabilidad dada la total dependencia de la aceituna de este insecto. Los resultados experimentales, sin embargo, indican que en esta especie existe una gran variabilidad. Por otra parte, la comparación del grado de variabilidad genética de diversas especies de tefrítidos que presentan un único hospedador con la especie

Ceratitis capitata, que presenta un gran número de hospedadores, muestra que los niveles de variabilidad genética en la familia Tephritidae no se ajustan a estas expectativas. Así, la variabilidad genética estimada por medio de la heterocigosis en *Ceratitis capitata* es muy baja (entre 0,021 y 0,071, datos recopilados en Loukas, 1989; 0,096 en el estudio de Roda *et al.*, 1996). Sin embargo, en las especies estrictamente monófagas *Rhagoletis pomonella* y *R. completa*, así como en *Bactrocera oleae*, los niveles de variabilidad son, en general, mucho más altos; los valores de heterocigosis son, respectivamente, 0,181, 0,075 (Berlocher and Bush, 1982) y 0,188 (Loukas, 1989). Todos estos datos proceden de isoenzimas. Parece, por tanto, que la hipótesis de que la cantidad de variabilidad está directamente relacionada con el grado de diversidad ambiental de una especie no se cumple en el caso de la familia Tephritidae, en general, y de la especie *Bactrocera oleae*, en particular, que se caracteriza por una gran variabilidad genética.

El elevado grado de diversidad genética observado en *Bactrocera oleae* puede deberse al hecho de que se trate de una especie establecida desde hace largo tiempo en el área mediterránea, de donde proceden la mayor parte de las muestras incluidas en el estudio. Se considera que llegó a Europa en el siglo VIII a.C., con la introducción de los olivos silvestres procedentes de África y Asia occidental, posiblemente por los fenicios (Ruiz, 1948).

Otro factor que puede contribuir a la variabilidad de la especie es el elevado tamaño efectivo que cabe esperar en poblaciones como éstas, dado que el hospedador de la mosca, el olivo, se cultiva de forma extensiva.

IV.2.2. Distribución de la variabilidad genética.

El análisis de los resultados de este trabajo conduce a la conclusión de que la diferenciación genética entre poblaciones es escasa, aunque hemos de tener en cuenta que la mayor parte de las poblaciones proceden del norte del Mediterráneo, fundamentalmente de la Península Ibérica, si bien esta zona comprende la mayor parte del área de distribución de la especie.

Así, a pesar de que en el análisis de χ^2 (Tablas 19 a 25, resumen en Tabla 26) 71 de las 115 bandas (61,7%) presentan diferencias significativas entre poblaciones, el test de diferencias estandarizadas muestra que en la mayoría de las ocasiones estas diferencias se deben a que la banda presenta una frecuencia significativamente distinta de la frecuencia media en una población (42 bandas) o dos poblaciones (15 bandas). Es decir, la frecuencia de la mayoría de las bandas es muy parecida en todas o la mayor parte de las poblaciones.

También los índices de similitud de Nei y Li (1979), presentados en la Tabla 29, nos indican que las poblaciones son muy similares genéticamente. El índice de similitud interpoblacional toma valores que oscilan entre 0,55 y 0,79, con un valor medio de 0,62. Estos valores son parecidos a los índices de similitud intrapoblacional (entre 0,61 y 0,70, con un promedio de 0,66). Valores de similitud interpoblacionales como estos, mayores de 0,5 y del mismo orden que los intrapoblacionales, indican que las poblaciones son muy similares genéticamente (Haymer *et al.*, 1997; Infante-Malachias *et al.*, 1999). Resultados similares a los de este trabajo (índices de similitud, en este caso de Jaccard, interpoblacional elevados y del mismo orden que los intrapoblacionales) se observan en Callejas *et al.* (1998). De nuevo, disponemos de muy pocos datos para la comparación, dado que la mayoría de los escasos trabajos de genética de poblaciones realizados en la familia Tephritidae se han llevado a cabo utilizando isoenzimas. No obstante, se dispone de datos procedentes del trabajo llevado a cabo por Haymer y colaboradores (1997) utilizando marcadores RAPD-PCR para el estudio de la especie *Ceratitis capitata*, que están en claro contraste con los obtenidos para la especie *Bactrocera oleae*. Así, mientras los valores del índice de similitud intrapoblacional son sólo algo menores en *Ceratitis capitata* (0,51 a 0,71; promedio 0,64), los índices de similitud interpoblacional son mucho menores que en *Bactrocera oleae* (0,04 a 0,63; promedio 0,39).

También el índice de diversidad de Shannon (Tabla 28) indica que la variabilidad interpoblacional no contribuye de manera importante a la variabilidad total de la especie. Así, el porcentaje de variabilidad total debido a diferencias entre individuos dentro de poblaciones es del 86%, frente a un 14% debido a diferencias entre poblaciones. El análisis de la varianza molecular (AMOVA), atribuye a las diferencias entre poblaciones una contribución aún menor a la variabilidad total (8,45%, Tabla 31).

En resumen, los análisis llevados a cabo en este estudio nos conducen a la conclusión de que la diferenciación genética entre las poblaciones de la especie *Bactrocera oleae* es escasa, fundamentalmente en el norte del Mediterráneo, que probablemente constituye la zona de mayor cultivo olivarero del mundo. A la misma conclusión se llega en otros trabajos (Zouros and Loukas, 1989; Ochando *et al.*, 1994; Callejas *et al.*, 1998).

Varias son las posibles explicaciones de la escasa diferenciación poblacional observada en *Bactrocera oleae*.

Una posibilidad es la existencia de polimorfismos ancestrales que seguirían siendo compartidos por las poblaciones incluso si estas estuvieran aisladas (Avisé and Ball, 1990; Harrison, 1991). La ventaja de los RAPDs es que las bandas obtenidas constituyen una muestra de todo el genoma que comprende muchos loci no ligados, por lo que la probabilidad de que la ausencia de diferenciación poblacional se deba a polimorfismos ancestrales compartidos es bastante remota (Downie, 2000).

El parecido entre poblaciones también podría deberse a la reciente dispersión de la especie, que no habría dejado tiempo suficiente para una evolución diversificadora (Gibbs *et al.*, 1994; Rossetto *et al.*, 1995). Esta posibilidad, sin embargo, es incompatible con la gran cantidad de variabilidad genética observada en la especie, ya que tras la introducción de una especie en un nuevo entorno se espera una disminución de la variabilidad genética (Mayr, 1963). Además, como ya se ha mencionado, se considera que la llegada a Europa (de donde proceden la mayor parte de las poblaciones analizadas, que son además las más parecidas genéticamente) de *Bactrocera oleae* se produjo en el siglo VIII a.C. (Ruiz, 1948). El tiempo transcurrido parece, por tanto, suficiente para permitir la diferenciación de las poblaciones.

La similitud de las poblaciones también podría atribuirse a la existencia de selección normalizadora, que tiende a igualar las frecuencias génicas en todas las poblaciones. Este tipo de selección podría relacionarse con la estricta monofagia de la especie analizada, que implicaría la adaptación a condiciones semejantes en diferentes

zonas geográficas. No obstante, debemos considerar que las presiones selectivas pueden ser distintas en diferentes zonas geográficas por efecto, no del sustrato nutritivo, sino de otros factores como las diferentes condiciones climáticas (aún dentro del rango de temperaturas y precipitaciones que caracterizan al clima mediterráneo; ver Tabla 3 para comparación), el uso de diferentes insecticidas en distintas zonas, etcétera. Por otra parte, a diferencia de la deriva genética, la selección actúa de forma diferente en diferentes loci, por lo que resulta difícil pensar que el mismo tipo de selección actúe sobre todos o la mayor parte de los loci, siendo el único proceso responsable de la estructura genética observada en la especie. Además, los RAPDs son considerados marcadores neutrales (Williams *et al.*, 1990; Lu and Rank, 1996; Ross *et al.*, 1999; Stenoién and Samstad, 1999), por lo que no se puede invocar la selección para explicar la distribución de la variabilidad genética detectada por este método en 98 de los 115 loci estudiados en la especie. Persiste, empero, la posibilidad de que la selección natural pueda actuar sobre algunos loci concretos. No obstante, para demostrarlo sería necesario caracterizar estas secuencias y hacer un seguimiento de las mismas.

Por último, cabe la posibilidad de que la ausencia de diferenciación genética entre poblaciones se deba a la existencia de flujo génico entre las mismas (Gaspari *et al.*, 1991; Schwerck *et al.*, 1998; Downie, 2000). Así, mientras que la existencia de poblaciones pequeñas y aisladas debería conducir a la existencia de divergencia entre poblaciones y homogeneidad dentro de las mismas, la existencia de poblaciones grandes y comunicadas entre sí conduciría a una menor diferenciación de las poblaciones y a una mayor diversidad dentro de ellas (Lin *et al.*, 1999). Los resultados de nuestro estudio coinciden con estas expectativas.

Por otra parte, si la existencia de flujo impide la diferenciación entre poblaciones y este flujo no está restringido, se espera que las distancias genéticas y geográficas no estén correlacionadas. La existencia de flujo génico no restringido es fácil de imaginar en esta especie, ya que su hospedador, el olivo, presenta una distribución prácticamente continua a lo largo de todo el área mediterránea. Como esperábamos, al comparar las distancias genéticas (Tabla 30) y geográficas por medio de un test de Mantel observamos que no existe relación entre ellas ($r=0,12$, $P=0.87$). Para explicar este punto

es necesario discutir la capacidad de dispersión de la especie. Se ha comprobado que estas moscas son excelentes voladoras, informándose de movimientos de hasta 4 Km (Economopoulos *et al.*, 1978) para encontrar hospedadores y hasta de 10 Km a través de mar abierto (Rice, 2000). Naturalmente, también es necesario tener en cuenta la posible dispersión pasiva a través del intercambio comercial de frutos infestados. No obstante, no es probable que esta fuente de flujo génico sea tan importante como la movilidad de los individuos, ya que la mayor parte de las exportaciones son de aceitunas en conserva o bien directamente de aceite de oliva.

Como se mencionó anteriormente, según Wright (1931) y Maruyama (1970, 1972) una tasa efectiva de migración (Nm) aproximadamente igual a 1 es suficiente para impedir la diferenciación genética de las poblaciones. En nuestro caso los valores de Nm obtenidos a partir del índice de subdivisión de la población (F_{ST}) por los métodos diferentes de Wright, Weir y Cockerham y Lynch y Milligan, respectivamente, son 2,8 , 1,8 y 0,7 (Tabla 32). Si excluimos del cálculo a las poblaciones estadounidenses, que es de suponer que apenas mantengan intercambio con las poblaciones mediterráneas, los valores de Nm son aún mayores (4,5, 2,3 y 2,7). En otro estudio de la estructura de poblaciones de *Bactrocera oleae*, en este caso utilizando isoenzimas, también se han encontrado valores altos de Nm (8,9; Ochando and Reyes, 2000). La comparación de los datos del presente trabajo con los obtenidos por medio de RAPD-PCR en otros dípteros voladores parece indicar que el valor de Nm en esta especie es intermedio respecto al de otros insectos. Así, las estimas de Nm en *Aedes albifasciatus*, obtenidas también por los métodos de Wright, Weir y Cockerham y Lynch y Milligan son, respectivamente 2,3, 6,2 y 9 (de Sousa *et al.*, 1999), mientras que en *Aedes aegypti* (Apóstol *et al.*, 1996) los valores son 11,7, 12,2 y 9,7. Sin embargo, los valores observados en 5 especies de dípteros pertenecientes al género *Culicoides* (Sebastián *et al.*, 2001) son menores que los observados en *Bactrocera oleae*, encontrándose las estimas de Nm , calculadas por el método Excoffier *et al.* (1992), de entre 0,23 y 0,73.

En cualquier caso, los valores de Nm parecen suficientes para impedir la diferenciación geográfica de las poblaciones. La significación de estas cifras se hace más patente si tenemos en cuenta que el valor de Nm hace referencia al número de individuos

emigrantes reproductores por población y generación, y que estamos hablando de una especie multivoltina (hasta 5 generaciones por año) y en la que una hembra puede poner en su vida entre 200 y 300 huevos (Rice, 2000).

Los resultados, por tanto, parecen indicar que el flujo ha ocurrido lo bastante a menudo y a lo largo de un periodo de tiempo suficiente como para impedir la diferenciación de las poblaciones. Es posible, no obstante, que la selección natural esté actuando sobre determinados loci.

La existencia de flujo génico ha de ser tenida en cuenta si se quiere llevar a cabo una lucha efectiva contra esta plaga, haciendo necesaria la coordinación de diferentes administraciones a la hora de diseñar estrategias de control.

IV.2.3. Relaciones entre poblaciones: dendrogramas y análisis de coordenadas principales.

Como se ha dicho anteriormente, la mayor parte de la variabilidad genética de la especie *Bactrocera oleae* es variabilidad intrapoblacional, siendo la diferenciación entre poblaciones poco importante. Así, en los dendrogramas se observa que los valores de *bootstrap* obtenidos son, en general, muy bajos, lo que apoya la idea de que las poblaciones son tan similares genéticamente que resulta muy difícil separarlas en un dendrograma (Haymer *et al.*, 1997; Clements *et al.*, 2000). A pesar de ello, los dendrogramas (Figuras 31 a 34) y los análisis de coordenadas principales (Figuras 35 y 36) elaborados a partir de la matriz de distancias genéticas de Nei (Tabla 30) nos permiten extraer de los datos alguna información acerca de las relaciones entre poblaciones.

En los dos dendrogramas en los que se incluyen todas las poblaciones (Figuras 31 y 32) observamos que la población de Túnez es la primera en separarse de las demás, seguida de las dos poblaciones de Estados Unidos. Estas dos últimas, además, forman un grupo, con un valor de *bootstrap* mayor de 50, separado del resto en el dendrograma UPGMA. Según Felsenstein (1988), para asegurar que un agrupamiento es legítimo, este debe ocurrir al menos en la mitad de las estimas de *bootstrap*, de modo

que podemos considerar que este grupo es suficientemente fiable. A continuación la población de Israel se separa del grupo formado por todas las poblaciones europeas. También en el análisis de componentes principales (Figura 35 a y b) observamos que las poblaciones de Túnez, Estados Unidos e Israel se separan del resto de poblaciones y que las dos poblaciones estadounidenses se mantienen agrupadas.

El hecho de que las dos poblaciones de Estados Unidos se parezcan mucho más a las poblaciones del área mediterránea de lo que cabría esperar dada la enorme distancia geográfica que las separa de ellas, hace pensar que la especie *Bactrocera oleae* se ha establecido en América recientemente, probablemente desde el norte o el este del Mediterráneo, por lo que las poblaciones americanas aún no han tenido tiempo de diferenciarse genéticamente de las mediterráneas. De hecho, la mosca del olivo fue detectada por primera vez en California, donde actualmente está presente en 17 de los 58 condados, en octubre de 1998; también se ha detectado la presencia de *B. oleae* en Baja California (Mexico) (Rice, 2000). Parece evidente que la introducción de este insecto en Norteamérica ha sido mediada por el hombre, lo que pone de manifiesto la necesidad de controlar cuidadosamente los cargamentos de productos que son hospedadores potenciales de plagas. Por otra parte, se observa que las dos poblaciones estadounidenses se parecen más entre si que a cualquiera de las demás poblaciones, lo que nos hace descartar la hipótesis de que provengan de dos “introducciones” separadas. Es decir, es probable que la introducción de esta especie en Norteamérica sea relativamente reciente y debida a un suceso único, pero en la actualidad la especie parece haberse extendido por la zona de California y Baja California, de modo que las poblaciones estadounidenses se parecen más entre si que a las del Mediterráneo. Nuestros datos apuntan, por tanto, a una introducción única de la especie en Estados Unidos y a su posterior expansión, posiblemente debido entre otros factores a que los programas de control se centraron en un principio en el tratamiento de los olivares cultivados y no tuvieron en cuenta la gran cantidad de olivos ornamentales existentes en esta parte de Estados Unidos, que han podido constituir un reservorio para la especie.

En cuanto a las restantes poblaciones, las diferencias genéticas entre ellas no permiten establecer separaciones claras. Sólo algunos grupos de poblaciones se mantienen constantes, pero no así las relaciones entre grupos. Así, las poblaciones

procedentes de Grecia e Italia aparecen mezcladas con las españolas. En cuanto a las poblaciones de España y Portugal, los agrupamientos que se mantienen tanto en los árboles construidos por los dos métodos (Figuras 33 y 34) como en el análisis de coordenadas principales (Figura 36 a y b) no guardan, aparentemente, ninguna relación con la proximidad geográfica. Así, en el grupo formado por las dos poblaciones de Valencia, una de las de Sevilla y la de Cáceres (Val1, Sev1, Val2, Cac), Val2 y Cac están situadas en la mitad oeste de la Península Ibérica (la de Cáceres se encuentra, además, bastante más al norte que la de Sevilla), mientras que las de Valencia se encuentran al este. Por otra parte, la segunda población de Sevilla y la de Alicante (Sev2, Ali), se encuentran situadas respectivamente al oeste y al este de la Península. Tampoco están próximas las poblaciones de Málaga y Mallorca (Mlg, Mal) ni las de Jaén y Cuenca (Jae, Cue).

En definitiva, de las poblaciones analizadas, las pertenecientes al continente americano y africano (USA1, USA2 y Tun) son claramente diferentes del resto. También se diferencia del resto, aunque en menor grado, la población de Oriente Medio (Isr). El resto de poblaciones, todas ellas pertenecientes al norte del Mediterráneo, muestran una escasa diferenciación entre ellas, posiblemente debido a la existencia de un intercambio de individuos entre poblaciones bastante frecuente y mantenido a lo largo del tiempo.

IV.2.4. Identificación de la especie *Bactrocera oleae*.

En este trabajo se han analizado 420 individuos pertenecientes a 21 poblaciones diferentes por medio de la técnica RAPD-PCR. Para el estudio se han utilizado 7 cebadores diferentes (Tabla 5), obteniéndose 115 bandas, de ellas 17 estaban presentes en todos los individuos analizados. De estas 17 bandas, 5 eran productos de amplificación del cebador OPC-05; en los patrones de amplificación de cada uno de los restantes cebadores aparecían 2 bandas constantes (Tablas 10 a 16).

Es probable que estas 17 bandas sean bandas diagnóstico de especie, aunque para poder afirmarlo sería necesario comprobar que no están presentes en especies relacionadas. La capacidad de identificar especies utilizando una técnica rápida, sencilla y barata como la técnica RAPD-PCR puede ser de gran ayuda en la lucha contra esta

plaga. Por otra parte, una característica de los marcadores de DNA es que son estables a lo largo de todos los estadios del ciclo de vida, por lo que permite identificar estadios inmaduros de estos insectos (larvas y pupas), en los que las especies son prácticamente indistinguibles morfológicamente. Además, esta técnica es especialmente útil para el análisis de organismos, como los insectos, de los que sólo se pueden extraer pequeñas cantidades de DNA (del orden de nanogramos). La técnica RAPD-PCR ya ha demostrado su utilidad para identificar otras especies de insectos (Wilkerson *et al.*, 1995; Kengne *et al.*, 2001), incluyendo tefrítidos (Sonvico *et al.*, 1996).

En resumen, la técnica RAPD-PCR ha demostrado su utilidad para proporcionar datos sobre la variabilidad genética inter e intrapoblacional de esta especie, permitiendo establecer las relaciones entre poblaciones y obtener información acerca de la existencia de flujo génico, todo lo cual tiene una extraordinaria importancia en el campo del control de plagas. Esta técnica también puede ser adecuada para descubrir bandas diagnósticas de especie, lo que facilitaría la identificación de la especie en cualquier estadio de desarrollo (larva, pupa o adulto) de forma relativamente rápida y sencilla, lo que resultaría muy valioso para los laboratorios de cuarentena. Los conocimientos adquiridos por medio de esta técnica pueden ser de gran ayuda en el desarrollo de programas de lucha contra la plaga más respetuosa con el medio ambiente y económicamente más rentable.

IV.3. GENOTECA DE LA ESPECIE *Bactrocera oleae*.

Llevados por nuestro interés en profundizar en el conocimiento de la mosca del olivo (*B.oleae*), construimos una genoteca de esta especie en colaboración con el Dr. Lucas Sánchez y la Dra. M^a Fernanda Ruiz, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) perteneciente al Centro Superior de Investigaciones Científicas.

La genoteca constituye una herramienta de extraordinaria utilidad para muy diversos fines. Nos permite avanzar no sólo en el conocimiento de las especies a través del aislamiento y caracterización de genes y otras secuencias presentes en las mismas, sino incluso en la comprensión de las relaciones entre estas especies. Así, por ejemplo, la existencia de genotecas de diversas especies de dípteros ha permitido el aislamiento y caracterización del gen *fruitless* en

21 especies; gracias a la comparación de estas secuencias se han podido inferir las relaciones entre ellas (Davis *et al.*, 2000).

Una genoteca también puede ser utilizada para obtener marcadores polimórficos que se pueden emplear en estudios de genética de poblaciones. Una aproximación de este tipo se ha llevado a cabo en la especie *Bactrocera tryoni* en la que el rastreo de una genoteca por medio de sondas procedentes de secuencias repetidas permitió identificar 22 loci con este tipo de secuencias, a partir de los cuales se obtuvieron 16 cebadores. Los productos de amplificación obtenidos por medio de estos cebadores resultaron ser polimórficos y, por tanto, utilizables en estudios de genética poblacional (Kinnear *et al.*, 1998).

En el caso de las especies de interés económico, como *Bactrocera oleae*, los conocimientos obtenidos gracias a las genotecas pueden contribuir a la lucha contra la plaga. Así, el conocimiento de los genes de expresión específica de sexo y de sus elementos reguladores puede permitir aislarlos y utilizarlos para construir líneas de insectos transgénicos de las que se pueden eliminar específicamente las hembras; estas líneas pueden contribuir al control de la plaga (Tolias *et al.*, 1990). Por otra parte, la caracterización de genes que codifican proteínas implicadas en la resistencia a insecticidas y el estudio de la base molecular del aumento de expresión de estos genes en las líneas resistentes (Huang *et al.*, 1998) puede contribuir a la lucha contra la resistencia a insecticidas así como al desarrollo de plaguicidas más eficaces.

En definitiva, la genoteca presenta un gran número de aplicaciones muy interesantes en muy diversos campos.

Una copia de esta genoteca se encuentra depositada a disposición de los investigadores interesados en utilizarla en el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Conclusiones.

V. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten inferir las siguientes conclusiones:

- 1) La secuencia de DNA mitocondrial estudiada presenta un alto contenido de A+T, como ocurre en la mayoría de los insectos, y una elevada proporción de transiciones frente a transversiones.
- 2) Todas las inserciones y deleciones y la mayoría de las sustituciones observadas en esta secuencia se encuentran en zonas que, al no afectar a la función de los productos génicos, no se espera que sufran una fuerte presión selectiva.
- 3) Al traducir la secuencia de nucleótidos de las regiones correspondientes a los genes *cytb* y *ND1*, obtenemos unas secuencias de aminoácidos en las que se observan sustituciones compartidas por todos los miembros de determinados taxones que pueden ser consideradas sinapomorfias y podrían ser útiles como marcadores taxonómicos.
- 4) En cuanto a la filogenia de la familia Tephritidae, se infieren de nuestro estudio las siguientes conclusiones relativas a la clasificación la misma.
 - Posible carácter no monofilético de la subfamilia Trypetinae: relación entre los géneros *Anastrepha* y *Toxotrypana* más estrecha que entre estos y el género *Rhagoletis*
 - Carácter monofilético de la tribu Toxotrypanini
 - Carácter monofilético del género *Anastrepha* y estrecha relación de este con el género *Toxotrypana*
 - Carácter monofilético, dentro del género *Anastrepha*, del grupo de especies *fraterculus*
 - Relación entre las especies *Anastrepha striata* y *Anastrepha serpentina*
 - Nuestros resultados apoyan topológicamente el carácter monofilético de la subfamilia Dacinae, representada por los géneros *Bactrocera*, *Dacus*, *Ceratitis* y *Neoceratitis*, que aparecen siempre agrupados

- Especie *Bactrocera cucurbitae* más estrechamente relacionada con el género *Dacus* más estrecha que el resto de las especies del género *Bactrocera*
- Gran parecido genético de las especies *Bactrocera neohumeralis* y *Bactrocera tryoni*
- Estrecha relación entre las especies *Bactrocera cacuminata* y *Bactrocera dorsalis*
- Carácter monofilético de las tribus Dacini y Ceratitini
- Carácter monofilético del género *Dacus*.
- Carácter monofilético del género *Ceratitis*

- 5) La especie *Bactrocera oleae* presenta un gran variabilidad intrapoblacional a pesar de tratarse de una especie estrictamente monófaga.
- 6) La diferenciación poblacional es escasa, probablemente debido a la existencia de flujo génico, si bien es posible que la selección natural esté actuando sobre determinados loci.
- 7) Del conjunto de poblaciones estudiadas, la más divergente de todas las demás es la población de Túnez, seguida de las dos poblaciones de Estados Unidos y de la de Israel. Las restantes poblaciones no forman grupos claramente diferenciados.
- 8) Las poblaciones de Estados Unidos probablemente provengan de un único suceso de "introducción" ocurrido en un momento relativamente reciente.
- 9) La técnica RAPD-PCR permitió la detección de 17 bandas presentes en todos los individuos analizados; estas bandas podrían ser bandas diagnóstico de la especie *Bactrocera oleae*.
- 10) La técnica RAPD ha demostrado su eficacia en la determinación de la cantidad de variabilidad genética y sus patrones de distribución, así como su potencial utilidad para la detección de bandas que permitan la rápida identificación de especies.

Resúmen.

VI. RESUMEN.

La familia Tephritidae, constituida por las llamadas “moscas de la fruta”, es el grupo de plagas más importante de todas las familias de moscas. A esta familia pertenece la especie *Bactrocera oleae*, de enorme importancia económica como plaga del olivo, principalmente en los países mediterráneos. Las técnicas moleculares desarrolladas en los últimos años constituyen una herramienta que puede contribuir en gran medida al conocimiento profundo de estos insectos.

En este trabajo se plantearon tres objetivos. El primer gran objetivo fue tratar de contribuir al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas de la familia Tephritidae, utilizando para ello una secuencia de DNA mitocondrial (mtDNA); el segundo gran objetivo fue tratar de determinar la estructura poblacional de la especie *Bactrocera oleae*; por último, se contruyó una genoteca de la especie *Bactrocera oleae*.

Para estudiar las relaciones filogenéticas en la familia Tephritidae se analizó, en 22 especies pertenecientes a 7 géneros diferentes, una secuencia de DNA mitocondrial que comprende una región del gen *cytb*, un gen de tRNA (tRNA-Ser) y una región del gen *ND1*.

Para estudiar la estructura poblacional de *Bactrocera oleae* se analizaron, por medio de la técnica RAPD-PCR, 420 individuos pertenecientes a 21 poblaciones utilizando 7 cebadores diferentes. De estas 21 poblaciones, 17 procedían del norte del Mediterráneo (15 de España y Portugal, 1 de Italia y 1 de Grecia), una del Mediterráneo este (Israel) y otra del Mediterráneo sur (Túnez); las dos poblaciones restantes procedían de California (Estados Unidos).

La secuencia de DNA mitocondrial utilizada para el análisis de las relaciones filogenéticas de la familia Tephritidae fue una secuencia rica en A+T (como ocurre con la mayor parte de las secuencias de mtDNA en insectos) y presentar una elevada proporción de transiciones frente a transversiones. Todas las inserciones y deleciones, así como la mayor parte de las sustituciones, se sitúan en zonas en que no afectan a la función de los productos de expresión de estos genes, por lo que, en principio, no deberían sufrir una presión selectiva demasiado intensa.

Al traducir la secuencia de nucleótidos de las regiones codificantes de las proteínas citocromo b y ND1, obtenemos unas secuencias de aminoácidos que presentan una serie de sustituciones compartidas por todos los miembros de determinados taxones. Estas sustituciones

pueden ser consideradas sinapomorfias y podrían permitir identificar el grupo al que pertenece un determinado individuo.

En cuanto a la filogenia de la familia Tephritidae, en principio esperaríamos encontrar dos grandes grupos correspondientes a las subfamilias Trypetinae y Dacinae. Sin embargo, mientras que nuestros resultados no ofrecen dudas acerca del carácter monofilético de la subfamilia Dacinae, no ocurre lo mismo con la subfamilia Trypetinae.

En este último caso se agrupan, por un lado, las especies que forman parte de la tribu Trypetini, pertenecientes a los géneros *Toxotrypana* y *Anastrepha*, y, por otro, las especies del género *Rhagoletis*, lo que apunta a un posible carácter polifilético de esta subfamilia que ya ha sido sugerido por otros autores. En cuanto a la tribu Toxotrypanini, nuestros datos confirman el carácter monofilético de la misma, así como del género *Anastrepha*, y confirman la existencia de una estrecha relación entre los géneros *Anastrepha* y *Toxotrypana*.

Como se ha mencionado, la subfamilia Dacinae, representada por las tribus Dacini y Ceratitini, si presenta carácter monofilético. Centrándonos en la tribu Dacini, uno de los rasgos que más llama la atención en los árboles filogenéticos elaborados en este estudio es la estrecha relación existente entre la especie *Bactrocera cucurbitae* y las especies del género *Dacus*. Con esta excepción, las especies de los géneros *Bactrocera* y *Dacus* quedan claramente separadas, no existiendo dudas acerca del carácter monofilético de este último. Por último, en la tribu Ceratitini se separan claramente los géneros *Neoceratitis* y *Ceratitis*, cuyo carácter monofilético es confirmado por nuestra filogenia. Dentro del género *Ceratitis*, las especies *C. rosa* y *C. capitata* forman un grupo en todos los árboles, lo que sugiere la existencia de una estrecha relación entre ellas. Por otra parte, se debate la posibilidad de la existencia de una nueva especie (*C. fasciventris*) muy parecida a *C. rosa*, lo que no es apoyado por nuestros datos.

El segundo gran objetivo del trabajo fue tratar de determinar la variabilidad intra e interpoblacional de la especie *Bactrocera oleae*.

El análisis de los resultados reveló que, como se había observado en estudios anteriores, la especie *Bactrocera oleae* presenta una gran variabilidad a pesar de ser una especie estrictamente monofágica. Esto puede ser atribuido al largo tiempo transcurrido desde el establecimiento de las poblaciones estudiadas y al tamaño efectivo de las mismas,

probablemente grande. Por otra parte, la mayor parte de esta variabilidad es intrapoblacional, siendo la diferenciación entre poblaciones escasa.

A pesar de la escasa diferenciación entre poblaciones, los datos permitieron obtener alguna información acerca de las relaciones entre las mismas. Así, de entre las poblaciones del Mediterráneo, la más alejada de todas las demás es la población de Túnez, seguida de la población de Israel. En cuanto a las poblaciones de Estados Unidos, en los dendrogramas se observa que son las primeras en separarse de las poblaciones del norte del Mediterráneo después de Israel. De las relaciones de las poblaciones norteamericanas entre si y con el resto de las poblaciones parece desprenderse que las primeras proceden de un único evento de colonización que se produjo de forma relativamente reciente.

Por otra parte, la escasa variabilidad interpoblacional, de la que ya se ha hecho mención, podría explicarse por la existencia de flujo génico entre estas poblaciones, que impediría a las mismas llegar a diferenciarse. No obstante, no puede descartarse la existencia de la acción de la selección natural actuando sobre determinados loci.

Por último, al analizar los patrones de amplificación obtenidos por medio de la técnica RAPD-PCR, se observa la existencia de 17 bandas que están presentes en los 420 individuos analizados. Estas bandas podrían ser bandas diagnóstico de especie, aunque para afirmarlo con seguridad sería necesario confirmar que no están presentes en especies cercanas.

El tercer y último objetivo de este trabajo fue la construcción de una librería genómica de *Bactrocera oleae*, con el fin de disponer de una nueva herramienta para avanzar en el conocimiento de la misma. Esta genoteca se encuentra depositada en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid a disposición de los investigadores interesados en utilizarla.

Bibliografía.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Apostol, B.L., W.C. Black IV, P. Reiter and B.R. Miller. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325-334.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J.C. and R.M. Ball. 1990. Principles of genealogic concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxf. Surv. In Evol. Biol.* 7: 45-68.
- Avise, J.C., C. Giblin-Davidson, J. Laerm, J.C. Patton and R.A. Lansman. 1979a. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys oinetis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6694-6698.
- Avise, J.C., R.A. Lansman and R.O. Shade. 1979b. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I: Population structure of the genus *Peromyscus*. *Genetics* 92: 279-295.
- Berlocher, S.H. 1999. Host race or species? Allozyme characterization of the "flowering dogwood fly" a member of the *Rhagoletis pomonella* complex. *Heredity* 83: 652-662.
- Berlocher, S.H. and G.L. Bush. 1982. An electrophoretic analysis of *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) phylogeny. *Sys. Zool.* 31: 136-155.
- Berlocher, S.H. and J.L. Feder. 2002. Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annu. Rev. Entomol.* 47: 773-815.
- Bernasconi, M.V., J. Pawlowski, C. Valsangiacomo, J.C. Piffaretti and P.I. Ward. 2000. Phylogeny of the Scathophagidae (Diptera, Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogent. Evol.* 16: 308-315.
- Bio-Rad Laboratories. 1997. Multi-Analyst 1.1. Hercules, California.
- Black IV, W.C. 1997. FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Colorado State University, Ft. Collins.
- Brown, W.M., M. George and A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 1967-1971.
- Brown, W.M., E.M. Prager, A.Wang and A.C.Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239.

- Brown, W.M. and J.W. Wright. 1979. Mitochondrial DNA analysis of the origin and relative age of partenogenic lizards (genus *Cnemidophorus*). *Science* 203: 1247-1249.
- Bush, G.L. 1966. The taxonomy, cytology and evolution of the genus *Rhagoletis* in North America (Diptera: Tephritidae). *Bull. Mus. Comp. Zool.* 134: 431-562.
- Bush, G.L. 1969. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution* 23: 237-251.
- Bush, G.L. 1975. Modes of animal especiation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 6: 339-364.
- Bush, G.L. and G.B. Kitto. 1979. Research on the genetic structure of wild and laboratory strains of the olive fly. En: *Development of Pest Management Systems for Olive Culture Program*. FAO Report, Roma: FAO. GRE69/525, pag. 20.
- Callejas, C., P. Roda, A.Reyes and M.D. Ochando. 1998. Identificación genética de *Dacus* – *Bactrocera- oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) mediante marcadores RAPD-PCR. *Bol. San. Veg. Plagas* 24: 873-882.
- Clary, D.O. and D.R. Wolstenholme D.R. 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *J. Mol. Evol.*, 22: 252-271.
- Clegg, M.T. 1989. Molecular diversity in plant populations. En: *Plant Population Genetics, breeding and genetic resources*. Brown, H.D., M.T. Clegg, A.L. Kahler and B.S. Weir (eds.). Sinauer, Sunderland, MA.
- Clements, K.M., C.E. Sorenson, B.M. Wiegmann, P.A. Neese and R.M. Roe. 2000. Genetic, biochemical, and behavioral uniformity among populations of *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. *Entomol. Experimentalis et Applicata.* 95: 269-281.
- Cognato, A.I. and F.A.H. Sperling. 2000. Phylogeny of *Ips* DeGeer species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 14: 445-460.
- Craig, T.P., J.D. Horner, J.K. Itami. 2001. Genetics, experience and host-plant preference in *Eurosta solidaginis*: implications for host shifts and speciation. *Evolution Int. J. Org. Evolution* 55: 773-782.
- Damgaard, J. 2000. Phylogeny of sea skaters, *Halobates* Eschscholtz (Hemiptera, Gerridae), based on mtDNA sequence and morphology. *Zool. J. Linn. Soc.* 130: 511-526.

- Davis T., J. Kurihara, E. Yoshino, D. Yamamoto. 2000. Genomic organization of the neural sex determination gene *fruitless (fru)* in the Hawaiian species *Drosophila silvestris* and the conservation of the *fru* BTB protein-protein binding domain throughout evolution. *Hereditas* 132: 67-78.
- de Sousa, G.B., G.P. de Dutari and C.N. Gardenal. 1999. Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) populations in Central Argentina determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction markers. *J. Med. Entomol.* 36: 400-404.
- DeSalle, R., T. Freedman, E.M. Prager and A.C. Wilson. 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 26: 157-164.
- Douglas, L.J. and D.S. Haymer. 2001. Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitits capitata* and *Ceratitits rosa* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 726-731.
- Dowell, R.V. and L.K. Wange. 1986. Process analysis and failure avoidance in fruit fly programs. En *Pest control: Operations and system analysis in fruit fly management*. NATO Advanced Series Institute series G: Ecological Sciences. Mangel, M., J.R. Carey and R.E. Plant (eds.). Springer Verlag, Berlin.
- Downie, D.A. 2000. Patterns of genetic variation in native grape phylloxera on two sympatric host species. *Mol. Ecol.* 9: 505-514.
- Drew, R.A.I. 1989. The Taxonomy and Distribution of Tropical and Subtropical Dacinae (Diptera: Tephritidae). En *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. Aluja M. and A.L. Norrbom (eds.). CRC Press, Boca Raton, pag 13.
- Drew, R.A.I. and D.L. Hancock. 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. *Bull. Entomol. Res. Suppl.* 2: 1-68.
- Durando, C.M., R.H. Baker, W.J. Etges, W.B. Heed, M. Wasserman and R. DeSalle. 2000. Phylogenetic analysis of the *repleta* species group of the genus *Drosophila* using multiple sources of characters. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16: 296-307.
- Excoffier, L., P.E. Smouse and 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.

- Feder, J.L., C.A. Chicote and G.L. Bush. 1988. Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Nature*, 336: 61-64.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17: 368-376.
- Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.*, 22: 521-565.
- Felsenstein, J. 2001. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6a2. Department of Genetics. University of Washington, Seattle.
- Fernández, P., D. Segura y M.D. Ochando. 2001. Taxonomía y diferenciación genética de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae) y *Bactrocera oleae* (Gmelin, 1790) (Diptera, Tephritidae) mediante marcadores moleculares (RAPD-PCR). *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Sec. Biol.)* 96: 321-329.
- Feng, D.F. and R.F. Doolittle. 1987. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.*, 25: 351-360.
- Fitch, W.M. 1977. On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am. Nat.*, 111: 223-257.
- Foote, R. H., F.L. Blanc and A.L. Norrbom. 1993. *Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico*. Comstock Publishing Associates, Ithaca.
- Gasperi, G., C.R. Guglielmino, A.R. Malacrida and R. Milani. 1991. Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata*. *Heredity* 67: 347-356.
- Gibbs, H.L., K.A. Prior, P.J. Weatherhead. 1994. Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 329-337.
- Gillespie, J.H. and C.H. Langley. 1974. A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics* 76: 837-848.
- Gower, J.C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-338.
- Graybeal, A. 1993. The phylogenetic utility of cytochrome b: Lessons from bufonid frogs. *Mol. Phyl. Evol.* 2: 256-269.
- Han, H.Y. 2000. Molecular phylogenetic study of the tribe Trypetini (Diptera: Tephritidae), using mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 501-513.

- Han, H.Y. and A. Freidberg. 1994. *Pseudomyoleja*, a new Afrotropical genus of Tephritidae (Diptera). *J. Afr. Zool.* 108: 547-554.
- Han, H.Y. and B.A. McPheron. 1994. Phylogenetic study of selected tephritid flies (Insecta: Diptera: Tephritidae) using partial sequences of the nuclear 18S ribosomal DNA. *Biochem. Syst. Ecol.* 22: 447-457.
- Han, H.Y. and B.A. McPheron. 1997. Molecular phylogenetic study of Tephritidae (Insecta: Diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 17-32.
- Han, H.Y., X.J. Wang and K.C. Kim. 1993. Revision of *Coutrypeta*, a new tephritid genus proposed for Oriental and Palearctic species (Diptera: Tephritidae). *Entomol. Scand.* 24: 167-184.
- Hardy, D.E. 1955. A reclassification of the Dacini (Tephritidae-Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 48: 425-437.
- Harris, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 164: 298-310.
- Harrison R.G. 1991. Molecular changes at speciation. *Ann. Rev. of Ecol. and Systematics* 22: 281-308.
- Hasegawa, M., H. Kishino, K. Hayasaka and S. Horai. 1990. Mitochondrial DNA evolution in primates: transition rate has been extremely low in the lemur. *J. Mol. Evol.* 31: 113-121.
- Haymer, D.S. 1995. Genetic analysis of laboratory and wild strains of the melon fly (Diptera: Tephritidae) using random amplified polymorphic DNA- polymerase chain reaction. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 705-710.
- Haymer. D.S., M. He and D.O. McInnis. 1997. Genetic marker analysis of spatial and temporal relationships among existing populations and new infestations of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*). *Heredity* 79: 302-309.
- Hedges, S.B. and R.L. Bezy. 1993. Phylogeny of xantusiid lizards: concern for data and analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2: 76-87.
- Hering, M. 1947. Bestimmungstabelle der Unterfamilien und tribus der Tephritidae. *Siruna Seva* 6: 12-16.
- Hillis, D.M. and J.J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst.. Biol.* 42: 182-192.

- Howell, N. 1989. Evolutionary conservation of protein regions in the protonmotive cytochrome *b* and their possible roles in redox catalysis. *J. Mol. Evol.* 29: 157-169.
- Huang, H.S., N.T. Hu, Y.E. Yao, C.Y. Wu, S.W. Chiang, C.N. Sun. 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione *S*-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 651-658.
- Hubby, J.L. and R.C. Lewontin. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 577-594.
- Hunter, R.L. and C.L. Market. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295.
- Infante-Malachias, M.E., K.S.C. Yotoko and A.M.L. de Azeredo Espin. 1999. Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil and Northern Argentina. *Genome* 42: 772-779.
- Johnson, F.M. and S. Bealle. 1968. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. V. Ejaculatory bulb esterases in *Drosophila* phylogeny. *Biochem. Genet.* 2: 1-18.
- Kakouli-Duarte, T., D.G. Casey, A.M. Burnell. 2001. Development of a diagnostic DNA probe for the fruit flies *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa*. *J. Econ. Entomol.* 94: 989-997.
- Kambhampati, S., W.C. Black IV and K.S. Rai. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis and applications. *J. Med. Entomol.* 26: 953-957.
- Kengne, P., H.D. Trung, V. Baimai, M. Coosemans and S. Manguin. 2001. A multiplex PCR-based method derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the identification of species of *Anopheles minimus* group in Southeast Asia. *Insect Mol. Biol.* 10: 427-435.
- Kim, J. 1993. Improving the accuracy of phylogenetic estimation by combining different methods. *Syst. Biol.* 42: 331-340.
- Kinrear, M.W., H.S. Bariana, J.A. Sved, M. Frommer. 1998. Polymorphic microsatellite markers for population analysis of a tephritid pest species, *Bactrocera tryoni*. *Mol. Ecol.* 7: 1489-1495.

- Kishino, H, and M. Hasegawa. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* 29: 170-179.
- Kitto, G.B. 1983. An immunological approach to the phylogeny of Tephritidae. In *Fruit Flies of Economic Importance. Proceedings of the CEC/IOBC International Symposium*. Cavalloro, R. (ed.) A.A. Bakelma, Rotterdam, 624 pags.
- Korneyev, V.A. 1999. Phylogenetic relationships among higher groups of Tephritidae. En: *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. Aluja M. y A.L. Norrbom (eds.). CRC Press, Boca Raton, 944pags.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jacobsen and M. Nei. 2001. MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versión 2.1. Arizona State University, Tempe.
- Kumar, S., W.C. Black and K.S. Rai. 1998. An estimate of phylogenetic relationships among culicine mosquitoes using a restriction map of the rDNA cistron. *Insect Mol. Biol.* 7: 367-373.
- Lai, E.C., J.P. Stein, J.F. Catterall, S.L. Woo, M.L. Mace, A.R. Means, B.W. O'Malley. Molecular structure and flanking nucleotide sequences of the natural chicken ovomucoid gene. *Cell* 18: 829-842.
- Levinton, J. 1973. Genetic variations in a gradient of environmental variability: marine bivalvia (Mollusca). *Science* 180: 75-76.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: 381-398.
- Lewontin, R.C. and J.L. Hubby. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- Lin, H., D.A. Downie, M.A. Walker, J. Granett and G. English-Loeb. 1999. Genetic structure in native populations of grape phylloxera (Homoptera: Phylloxeridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 376-381.
- Loew, H. 1873. Monographs of the Diptera of North America. Part III. *Smithson. Misc. Collect.* 11; 351 pp.
- Loukas, M. 1989. Population genetics studies of fruit flies of economic importance, especially medfly and olive fruit fly, using electrophoretic methods. En: *Electrophoretic studies on agricultural pests*. Loxdale H.D. and J.D. Hollander (eds.). Clarendon Press, Oxford.

- Loukas, M., A.P. Ecomomopulos, E. Zouros, Y. Vergini. 1985. Genetic changes in artificially reared colonies of the olive fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78: 159-165.
- Lu., R. and G.H. Rank. 1996. Use of RAPD analysis to estimate population genetics parameters in the alfalfa leaf cutting bee, *Megachile rotundata*. *Genome* 39: 655-663.
- Lynch, M. and B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91-99.
- Malacrida, A.R., C.R. Guglielmino, P. D'Adamo, C. Torti, F. Marinoni and G.Gasperi. 1996. Allozyme divergence and phylogenetic relationships among species of tephritid flies. *Heredity* 76: 592-602.
- Manguin, S., R.C. Wilkerson, J.E. Conn, Y. Rubio-Palis, J.A. Danoff-Burg and D.R. Roberts. Population structure of the primary malaria vector in south America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphological markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 364-376.
- Maniatis, T., R.C. Hardison, E. Lacy, J. Lauer, C. O'Connell, D. Quon, G.K. Sim and A. Efstratiadis. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* 15: 687-701.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Market, C. and F. Moller. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and specific species patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45: 753-763.
- Maruyama, T. 1970. Effective number of alleles in a subdivided population. *Theoret. Popul. Biol.* 1: 273-306.
- Maruyama, T. 1972. Distribution of gene frequencies in a geographically structured finite population. I. Distribution of neutral genes and of genes with a small effect. *Ann. Hum. Genet.* 35: 273-306.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Mazomenos, B.E. 1989. *Dacus oleae*. En *Fruit Flies, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Robinson, A.S. and G. Hooper (eds.). Elsevier. Amsterdam, pag. 176.
- McAlpine, J.F. 1989. Phylogeny and classification of the Muscomorpha. En: *Manual of Nearctic Diptera, Volume 3*. McAlpine, J.F. (ed.). Agriculture Canada, Ottawa, pages.: 1397-1518.

- McPheron, B.A. and H.Y.Han. 1997. Phylogenetic analysis of North American *Rhagoletis* (Diptera:Tephritidae) and related genera using mitochondrial DNA sequence data. *Molec. Phylogen. Evol.* 7: 1-16.
- McPheron, B.A., H.Y. Han, J.G. Silva and A.L. Norrbom. 1999. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rA mitochondrial DNA sequences. En *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. Aluja M. and A.L. Norrbom (eds.). CRC Press, Boca Raton, 944pags.
- McPheron, B.A., D.C. Smith and S.H. Beerlocher. 1988. Genetic differences between host races of *Rhagoletis pomonella*. *Nature* 336: 64-66.
- Moriyama, E.N. 1987. Higher rates of nucleotide substitutions in *Drosophila* than in mammals. *Jpn. J. Genet.* 62: 139-147.
- Morrow, J., L. Scott, B. Congdon, D. Yeates, M. Fromer, J. Sved. 2000. Close genetic similarity between two sympatric species of tephritid fruit flies reproductively isolated by mating time. *Evolution Int J Org Evolution*, 54: 899-910.
- Mullis, K.B., F.A. Faloona, S. Scherf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*. The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Ann. Rev. Genet.*, 30: 371-403.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:5269-5273.
- Nigro, L., M.Solignac and P.M.Sharp. 1991. Mitochondrial DNA sequence divergence in the *melanogaster* and oriental species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 33: 156-162.
- Norrbom, A.L. and R.H. Foote. 1989. The taxonomy and biogeography of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). En *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Robinson A.S. and G.Hooper (eds.). En *World Crop Pests* (Helle, W. (ed.), vol. 3A. Elsevier. Amsterdam. 524 pags.

- Norrbom, A.L., L.E. Carroll and A. Freidberg. 1999a. Status of knowledge. En: *Fruit Fly Expert Identification System and Systematic Information Database*, pags. 9-47. Thompson, F.C. (ed.). *Myia*.1988. 9: 524 pags.
- Norrbom, A.L., L.E. Carroll, F.C. Thompson, I.M.White and A. Freidberg. *Systemtic database of world Tephritidae*. USDA Agricultural Handbook. (En preparación).
- Norrbom, A.L., R.A. Zucchi and V. Hernández-Ortiz. 1999b. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* based on morphology. En *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. Aluja M. y A.L. Norrbom (eds.). CRC Press, Boca Raton, pag. 944.
- Ochando, M.D. and A. Reyes. 2000. Genetic population structure in olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin): gene flow and patterns of geographic differentiation. *J. Appl. Ent.* 124: 177-183.
- Ochando, M.D., C. Callejas, O.H. Fernández y A. Reyes. 1994. Variabilidad genética aloenzimática en *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). I. Análisis de dos poblaciones naturales del sureste español. *Bol. San. Veg. Plagas* 20: 35-44.
- Osakabe, M. and Y. Sakagami. 1994. RFLP análisis of ribosomal DNA in sibling species of spider mite, genus *Panonychus* (Acari: Tetranychidae). *Insect Mol. Biol.* 3: 63-66.
- Page, R.D.M. and E.C. Holmes. 1998. *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, London, pag:364.
- Pasquewitz, S.M., N. Kakin, M. Coetzee and R.H. Hunt. 1993. Evaluation of the polymerase chain reaction method for identifying members of the *Anopheles gambiae* complex in Southern Africa. *J. Med. Entomol.* 26: 953-957.
- Phasley, D.P. and L.D. Ke. 1992. Sequence evolution in mitochondrial ribosomal and ND-1 genes in Lepidoptera: Implications for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 9: 1061-1075.
- Powell, J.P. 1971. Genetic polymorphism in varied environments. *Science* 174: 1035-1036.
- Powell, J.R., A. Caccone, G.D. Amato and C. Yoon. 1986. Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83: 9090-9093.
- Raich, T.J., J.L. Archer, M.A. Robertson, W.J. Tabachnik and B.J. Beaty. 1993. Polymerase chain reaction approaches to *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) identification. *J. Med. Entomol.* 30: 228-232.

- Rainboth, W.J. and G.S. Whitt. 1974. Analysis of evolutionary relationships among shiners of the subgenus *Luxilus* (Teleostei, Cypriniformes, Notropis) with the lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme systems. *Comp. Biochem. Physiol.* 49: 241-252.
- Renkawitz-Pohl, R., L. Matsumoto, S.A. Gerbi. 1981. Two distinct intervening sequences in different ribosomal DNA repeat units of *Sciara coprophila*. *Nucleic Acids Res.* 9: 3747-3764.
- Reyes, A., R. Linacero and M.D. Ochando. 1997. Molecular genetics and integrated control: a universal genomic DNA integrated method for PCR, RAPD, restriction and Southern analysis. *IOBC wprs Bulletin*, 20: 274-284.
- Rice, R.E. 2000. Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. *UC Plant Protection Quarterly* 10: 1-5.
- Roda, P., C. Callejas, A. Reyes and M.D. Ochando. 1996. Caracterización genética en *Ceratitidis capitata* Wied. asociada a fruto hospedador: I. Análisis isoenzimático. *Bol. San. Veg. Plagas* 22: 71-78.
- Ros, J.P., E. Wong, J. Oliveros, E. Castillo. 2002. Improvement of traps, attractants and killing agents against *Ceratitidis capitata* Wied and *Bactrocera oleae* Gmel. How to make the mass trapping technique a good way for both pests controlling. En: *Second RCM on development of improved attractants and their integration into fruit fly SIT management programmes*. IAEA, TEC-DOC, Stellenbosch. (In press).
- Roseto, M., T. de Filippis, A.G. Manetti, D. Marchini, R. Dallai. 1999. FST, a female specific transcript from the medfly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Insect Mol. Biol.* 8: 545-550.
- Ross, K.G., D.D. Shoemaker, M.J.B. Krieger, C.J. DeHeer and L. Keller. 1999. Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case of study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*. *Mol. Biol. Evol.* 16: 525-543.
- Rossetto, M.P., P.K. Weaver, K.W. Dixon. 1995. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scrapigera* (Proteaceae). *Mol. Ecol.* 4: 321-329.
- Ruiz, A. 1948. *Fauna entomológica del olivo en España. Estudio sistemático y biológico de las especies de mayor importancia económica*. Trabajos del Instituto Español de Entomología. Madrid.

- Saitou, N. and T. Imanishi. 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* 6: 514-525.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- Salazar, M., C. Theoduloz, A. Vega, F. Poblete, E. González, R. Badilla, L. Meza-Basso. 2002. PCR-RFLP identification of endemic Chilean species of *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) attacking Solanaceae. *Bull. Entomol. Res.* 92: 337-341.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sankoff, D.D. and R.J. Cedergren. 1983. Simultaneous comparison of three or more sequences related by a tree. En: *Time Warps, String Edits and Macromolecules: the Theory and Practice of Sequence Comparison*. Sankoff D.D. and J.B. Kruskal (eds.) Addison-Wesley, MA, pags. 253-264.
- Satta, Y., H. Ishiwa y S.I. Chigusa. 1987. Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. *Mol. Biol. Evol.* 4: 638-650.
- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Versión 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Schwerck, A., P. Wahle, T. Assmann and M. Abs. 1998. Analysis of genetic diversity of the carabid beetle species *Harpalus rubripes* and *Nebria brevicollis* (Coleoptera: Carabidae) using RAPD fingerprinting and allozyme analysis. *Zool. Beitr. N. F.* 38: 245-260.
- Sebastiani, F., R. Meiswinkel, L.M. Gomulski, C.R. Guglielmino, P.S. Mellor, A.R. Malacrida and G. Gasperi. 2001. Molecular differentiation of the Old World *Culicoides imicola* species complex (Diptera, Ceratopogonidae), inferred using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol. Ecol.* 10: 1773-1786.
- Seckbach, J. and J.F. Fredrick. 1980. A primaevial alga bridging the blue-green and the red algae: further biochemical and ultrastructure studies of *Cyanidium caldarium* with special reference to the plastid membranes. *Microbios.* 29: 135-147.

- Sharp, P.M. and W.H. Li. 1989. On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 28: 398-402.
- Sigehito, N., M. Makoto, M. Kaneda, T. Sugimoto and M. Muraji. 2000. Identification of *Bactrocera dorsalis* complex species (Diptera: Tephritidae) by PCR-RFLP analysis: A study of variation in mitochondrial DNA D-loop region. *Research of the Plant Protection Service of Japan* 36: 37-41.
- Sitnikova, T., A. Rzhetsky and M. Nei. 1995. Interior-branch and bootstrap test of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 12: 319-333.
- Slowinski, J.B. and J.S. Keogh. 2000. Phylogenetic relationships of elapid snakes based on cytochrome *b* mtDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15: 157-164.
- Smith, J.J. and G.L. Bush. 1997. Phylogeny of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase II. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 33-43.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Snow, W.A. 1895. On *Toxotrypana* of Gerstaecker. *Kans. University Q.* 4: 117-119.
- Solignac, M., M. Monnerot and J.C. Mounolou. 1986. Mitochondrial DNA evolution in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 23: 31-40.
- Sonvico, A., F. Manso and L.A. Quesada-Allue. 1996. Discrimination between the immature stages of *Ceratitidis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) populations by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *J. Econ. Entomol.* 89: 1208-1212.
- Steck, G.J. 1991. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. America* 84: 10-28.
- Stenoien, H.K. and S.M. Samstad. 1999. Genetic structure in three haploid peat mosses (*Sphagnum*). *Heredity* 82: 391-400.
- Stewart, C.N. and L. Excoffier. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon*. *J. Evol. Biol.* 9: 153-171.
- Swofford, D.L. 2001. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4.0b8. Sinauer, Sunderland, MA.

- Swofford, D.L., G.J. Olsen, P.J. Waddell and D.M.Hillis. 1996. Phylogenetic inference. En: *Molecular Systematics*. Hillis, D.M. y C. Moritz (eds.). Sinauer Associates, Sunderland.
- Taberner, A., J. Dopazo and P. Castañera. 1997. Genetic characterization of populations of a *de novo* arisen sugar beet pest, *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera, Curculionidae) by RAPD analysis. *J. Mol. Evol.* 45: 24-31.
- Tamura, K. 1992. The rate and pattern of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 9: 814-825.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Tolias, P.P., M. Konsolaki, K. Komitopoulou, F.C. Kafatos. 1990. The chorion genes of the medfly, *Ceratitis capitata*. II. Characterization of three novel cDNA clones obtained by differential screening of an ovarian library. *Dev. Biol.* 140: 105-112.
- Tsakas, S.C. and C.B Krimbas. 1975. How many genes are selected in populations of *Dacus oleae*. *Genetics* 79: 675-679.
- Tsakas, S.C. and E. Zouros. 1980. Genetic differences among natural and laboratory reared populations of the olive fruit fly *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Entomol. Exp. Appl.* 28: 268-276.
- Wahlberg, N. and M. Zimmermann. 2000. Pattern of phylogenetic relationships among members of the tribe Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Cladistics*. 16: 347-363.
- Wahli, W., I.B. Dawid. 1980. Isolation of two closely related vitellogenin genes, including their flanking regions, from a *Xenopus laevis* gene library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1437-1441.
- Weeden, N.F., G.M. Timmerman, M. Hemmat, B.E. Kneen, M.A. Lodhi. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. En: *Proc. Symp. RAPD Technol. Plant Breed.* Hoisington, D. and A. McNab (eds.) Crop Ci. Soc. Am., Minneapolis, pag.17.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wells, J.D. and F.A.H. Sperling. 1999. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 36: 222-226.

- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nuc. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Wheeler, W.C. 1994. Sources of ambiguity in nucleic acid sequence alignment. En: *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Schierwater, B., B. Streit, G.P. Wagner and R. DeSalle (eds.). Birkhäuser Verlag, Suiza.
- White, I.M. 1988. Tephritid flies (Diptera: Tephritidae). *Handbks. Ident.Br.Ins.*, 10: 1-134.
- White, I.M. and M. Elson-Harris. 1994. *Fruit flies of economic significance; their identification and bionomics*. CAB International, Wallingford, Oxon.
- Wilkerson, R., T.J. Parsons, T.A. Klein, T.V. Gaffigan, E. Bergo and J. Consolim. 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. *J. Med. Entomol.* 32: 697-704.
- Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wilson, A.C., R.L. Cann, S.M. Carr, M. George, U.B. Gyllensten, K.M. Helm-Bychowsky, R.G. Higuchi, S.R. Palumbi, E.M. Prager, R.D. Sage and M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives in evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26: 375-400.
- Wolstenholme, D.R. and D.O. Clary. 1985. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics.* 109: 725-744.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, 15: 323-354.
- Zaborovskii, E.R., I.M. Chumakov, V.S. Prasolov, L.L. Kiselev. 1980. Construction of a human gene library and cloning of nucleotide sequences homologous to mouse leukaemia and sarcoma virus genomes. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 255: 1275-1277.
- Zakut R., D. Givol, Y.Y. Mory. 1980. Structure of immunoglobulin gamma 2b heavy chain gene cloned from mouse embryo gene library. *Nucleic Acids Res.* 8: 453-466.
- Zitoudi, K., J.T. Margaritopoulos, Z. Mamuris and J.A. Tsitsipis. 2001. Genetic variation in *Myzus persicae* populations associated with host-plant and life cycle category. *Entomol. Experimentalis et Applicata* 99: 303-311.

- Zouros, E. and C.B. Krimbas. 1969. The genetics of *Dacus oleae*. III. Amount of variation at two esterase loci in a Greek population. *Gen. Res.* 14: 249-258.
- Zouros, E. and M. Loukas. 1989. Biochemical and colonization genetics of *Dacus oleae* (Gmelin). En: *Fruit Flies: their Biology, Natural Enemies and Control*. Robinson, A.S. y G. Hooper (eds.). Elsevier, Ámsterdam.

Directorio de páginas web.

VIII. DIRECTORIO DE PÁGINAS WEB.

<i>California Olive Council</i>	http://www.cooc.com
Cirad	http://www.cirad.fr
Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA)	http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera
<i>Genebank</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank
<i>Hypermédia en Protection des Plantes</i>	http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ
Infolivo	http://www.infolivo.com
Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación	http://www.mapya.es/indices/pags/agric/index.htm
Museo de Historia Natural de Londres	http://www.iaea.or.at
<i>National Center for Biotechnology Information</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy
Taxonomía en el NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy
<i>The Diptera Site</i>	http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera/tephriti
Universidad de Florida	http://creatures.ifas.ufl.edu
Universidad de Sydney	http://www.bio.usyd.edu.au/fruitfly

Especie	Origen	Año
<i>Anastrepha ludens</i> (Loew) (<i>Alh</i> y <i>Alm</i>)	México	1999
<i>Anastrepha obliqua</i> (Macquart) (<i>Aoh</i> y <i>Aom</i>)	México	1999
<i>Anastrepha serpentina</i> (Wiedemann) (<i>Asph</i> y <i>Aspm</i>)	México	1999
<i>Anastrepha striata</i> (Schiner) (<i>Asth</i> y <i>Astm</i>)	México	1999
<i>Anastrepha suspensa</i> (Loew) (<i>Ash</i> y <i>Asm</i>)	EEUU (Florida)	1999
<i>Bactrocera cacuminata</i> (Hering) (<i>Bcah</i> y <i>Bcam</i>)	Australia	1999
<i>Bactrocera cucurbitae</i> (Coquillet) (<i>Bch</i> y <i>Bcm</i>)	EEUU (Hawai)	1999
<i>Bactrocera dorsalis</i> (Hendel) (<i>Bdh</i> y <i>Bdm</i>)	EEUU (Hawai)	1999
<i>Bactrocera latifrons</i> (Hendel) (<i>Blh</i> y <i>Blm</i>)	EEUU (Hawai)	1999
<i>Bactrocera oleae</i> (Gmelin) (<i>Bom</i> y <i>Boh</i>)	España	1998
<i>Bactrocera neohumeralis</i> (Hardy) (<i>Bnh</i> y <i>Bnm</i>)	Australia	1999
<i>Bactrocera tryoni</i> (Frogatt) (<i>Bt1</i> y <i>Bt2</i>)	Australia	1999
<i>Bactrocera zonata</i> (Saunders) (<i>Bzh</i> y <i>Bzm</i>)	Islas Mauricio	1998
<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) (<i>Cch</i> y <i>Ccm</i>)	España	1997
<i>Ceratitis cosyra</i> (Walker) (<i>Ccs1</i> y <i>Ccs2</i>)	Sudáfrica	1999
<i>Ceratitis rosa</i> (Karsch) (<i>Crh</i> y <i>Crm</i>)	Isla Mauricio	1998
<i>Ceratitis rosa</i> (Karsch) (<i>Cfh</i> y <i>Cfm</i>)	Kenia	2000
<i>Dacus ciliatus</i> (Loew) (<i>Dch</i> y <i>Dcm</i>)	Isla Reunión	1998
<i>Dacus demmerezi</i> (Bezzi) (<i>Ddh</i> y <i>Ddm</i>)	Isla Reunión	1998
<i>Neoceratitis cyanescens</i> (Bezzi) (<i>Nch</i> y <i>Ncm</i>)*	Isla Reunión	1998
<i>Rhagoletis cerasi</i> (Linnaeus) (<i>Rc1</i> y <i>Rc2</i>)	Suiza	1998
<i>Rhagoletis pomonella</i> (Walsh) (<i>Rpm</i> y <i>Rph</i>)	EEUU (Nueva York)	1999
<i>Toxotrypana curvicauda</i> (Gerstaecker) (<i>Tch</i> y <i>Tcm</i>)	EEUU (Florida)	1998

*Sinonimia: *Trirhithromyia cyanenses*.

Tabla 1. Especies analizadas, nomenclatura utilizada para designarlas (1), origen y año de obtención.

- (1) La primera letra corresponde al género, la segunda –y en ocasiones la tercera- a la especie y la última letra es una *m* si se trata de un macho y una *h* si se trata de una hembra; en el caso de *Rhagoletis cerasi* se secuencia DNA procedente de pupas, por lo que hablamos de Rc1 y Rc2.

Nomb.	Procedencia	Año	Localización
Ali	Alicante, Alicante, España.	1998	38°20' N 30°46' O
Cac	Las Viñas, Cáceres, España.	1997	39°58' N 06°21' O
Ciu	Argamasilla de Calatrava, Ciudad Real, España.	1998	38°43' N 05°55' O
Cue	Tarancón, Cuenca, España.	1998	40°00' N 04°59' O
Ger	Regencós, Gerona, España.	1998	41°57' N 03°10' E
Gre	Tesalónica, Grecia.	1998	40°38' N 22°56' O
Isr	Iksal, Israel.	2000	32°41' N 35°19' E
Ita	Viterbo, Lazio, Italia.	1998	42°24' N 12°06' E
Jae	Huelma, Jaén, España.	1997	37°39' N 04°32' O
Mad	Algete, Madrid, España.	1998	40°35' N 04°30' O
Mal	Soller, Mallorca, España.	1999	39°45' N 02°43' E
Mlg	Ardales, Málaga, España.	1998	36°52' N 05°59' O
Por	Castelo Branco, Portugal.	1997	39°49' N 07°30' O
Sev-1	Alanís, Sevilla, España.	1997	38°02' N 06°17' O
Sev-2	Sevilla, Sevilla, España.	1998	37°22' N 07°59' O
Tar	Cambrils, Tarragona, España.	1997	42°08' N 01°23' E
Tun	Sfax, Túnez.	2001	34°44' N 10°46' E
USA-1	Fresno-Bakersfield, California, EEUU.	2000	35°53' N 119°23' O
USA-2	San Diego, California, EEUU.	2001	32°42' N 117°09' O
Val-1	Requena, Valencia, España.	1997	39°29' N 02°53' O
Val-2	Tabernes de Valldigna, Valencia, España.	1997	39°04' N 43°44' O

Tabla 2. Poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas, localidad de procedencia, año de obtención y localización geográfica exacta.

Población	T mínima	T máxima	T media	Precipitación total
Ali	17,0	25,9	21,5	8,4
Cac	15,9	28,1	22,0	48,5
Ciu	12,5	26,0	19,3	26,8
Cue	10,5	26,4	18,4	37,0
Ger	12,2	25,2	18,7	61,1
Gre	16,5	25,5	20,9	38,4
Isr	11,4	23,3	16,8	80,0
Jae	16,2	25,8	21,0	32,7
Mad	10,9	23,6	17,2	31,0
Mal	19,0	26,7	22,8	16,8
Mlg	11,5	21,3	16,4	26,7
Sev-1	11,9	23,4	17,6	42,7
Sev-2	15,4	29,6	22,4	32,4
Tar	15,6	25,5	20,5	34,7
Tun	13,7	24,8	19,2	13,6
USA-1	14,8	29,9	22,4	0,4
USA-2	14,4	21,1	17,4	18,3
Val-1	11,4	26,0	18,7	43,0

Tabla 3. Temperaturas mínima, máxima y media (en °C) y precipitación total mensual (en mm) en las zonas de procedencia de las poblaciones estudiadas. Los valores se refieren a las medias para los 7 meses anteriores a la recogida de los individuos. (No se dispone de los datos correspondientes a las poblaciones Ita, Por y Val-2).

Especie	Símbolo	Número de acceso
<i>Anastrepha ludens</i>	<i>Alm</i>	AY096075
<i>Anastrepha obliqua</i>	<i>Aom</i>	AY096076
<i>Anastrepha suspensa</i>	<i>Asm</i>	AY096077
<i>Anastrepha serpentina</i>	<i>Aspm</i>	AY096078
<i>Anastrepha striata</i>	<i>Astm</i>	AY096079
<i>Bactrocera cacuminata</i>	<i>Bca</i>	AY096080
<i>Bactrocera cucurbitae</i>	<i>Bc</i>	AY096081
<i>Bactrocera dorsalis</i>	<i>Bdm</i>	AY096082
<i>Bactrocera dorsalis</i>	<i>Bdh</i>	AY096083
<i>Bactrocera ludens</i>	<i>Bl</i>	AY096084
<i>Bactrocera neohumeralis</i>	<i>Bnm</i>	AY096085
<i>Bactrocera neohumeralis</i>	<i>Bnh</i>	AY096086
<i>Bactrocera oleae</i>	<i>Bo</i>	AY096087
<i>Bactrocera tryoni</i>	<i>Btm1</i>	AY096088
<i>Bactrocera tryoni</i>	<i>Btm2</i>	AY096089
<i>Bactrocera zonata</i>	<i>Bz</i>	AY096090
<i>Ceratitis capitata</i>	<i>Cc</i>	AY096091
<i>Ceratitis cosyra</i>	<i>Ccsh1</i>	AY096092
<i>Ceratitis cosyra</i>	<i>Ccsh2</i>	AY096093
<i>Ceratitis rosa</i>	<i>Crm</i>	AY096094
<i>Ceratitis rosa</i>	<i>Crh</i>	AY096095
<i>Ceratitis rosa</i>	<i>Cfh</i>	AY096096
<i>Dacus ciliatus</i>	<i>Dc</i>	AY096097
<i>Dacus demmerezi</i>	<i>Dd</i>	AY096098
<i>Neoceratitis cyanescens</i>	<i>Nc</i>	AY096099
<i>Rhagoletis cerasi</i>	<i>Rc1</i>	AY096100
<i>Rhagoletis cerasi</i>	<i>Rc2</i>	AY096101
<i>Rhagoletis pomonella</i>	<i>Rpm</i>	AY096102
<i>Toxotrypana curvicauda</i>	<i>Tcm</i>	AY096103

Tabla 4. Números de acceso en el banco de datos GeneBank de las secuencias de los individuos indicados.

Oligonucleótido	Secuencia
OPA-02	TGCCAGAGCTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-17	GACCGCTTGT
OPC-05	GATGACCGCC
OPC-06	GAACGGACTC
OPC-11	AAAGCTGCGG
OPC-18	TGAGTGGGTG

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados.

Sitios		Proporción bases				Proporción ts/tv
constantes	variables	A	T	G	C	
156	12 no informat. + 140 informat.	45	35	9	11	2,48

Tabla 6. Resumen de los datos obtenidos a partir de las secuencias alineadas.

		<i>cytb</i>	región intergénica	tRNA-Ser	<i>ND1</i>
Sec. de nucleótidos	longitud	105-111	0-8	65-68	142-148
	n° sustituciones	47	-	17	54
	3 ^a posic. codón (1)	55,8%	-	-	61,7%
Sec. de aminoácidos	longitud	34-35	-	-	43-45
	n° sustituciones	13	-	-	21
	mismo tipo aa (2)	8	-	-	10

Tabla 7. Longitud y número de sustituciones en las distintas regiones de la secuencia analizada.
(1) Porcentaje de cambios que ocurren en la tercera posición del codón.
(2) Número de sustituciones de un aminoácido por otro del mismo grupo.

	<i>Cytb</i>		<i>ND1</i>	
	posición ¹	aminoácido	posición ¹	aminoácido
Tr. Toxotrypanini				
<i>(Al, Ao, As, Asp, Ast, Tc)</i>	-	-	289	Cys
	-	-	313	Leu
-Género <i>Anastrepha</i>				
<i>(Al, Ao, As, Asp, Ast)</i>	346	Asp	-	-
	-	-	309	Met
	-	-	316	Asp
grupo <i>fraterculus</i> <i>(Al, Ao, As)+ Tc</i>	-	-	304	Val
grupo <i>fraterculus</i> <i>(Al, Ao, As)</i>	-	-	307	Phe
<i>Ast + Asp</i>	-	-	304	Ile
Tr. Carpomyini				
- Género <i>Rhagoletis</i> <i>(Rc, Rp)</i>	346	Asn	-	-
	-	-	311	Leu
Tr. Dacini				
<i>(Bc, Bca, Bd, Bl, Bn, Bo, Bt, Bz, Dc, Dd)</i>	-	-	297	Phe
	-	-	301	Ile ²
	-	-	315	Met ²
-Género <i>Bactrocera</i>				
<i>(Bc, Bca, Bd, Bl, Bn, Bo, Bt, Bz)</i>	-	-	304	Leu
	-	-	324	Val ³
<i>Bca + Bd</i>	-	-	307	Met
Tr. Ceratitini <i>(Cc, Ccs, Cf, Cr, Nc)</i>	-	-	310	Ser
			323	Asn
-Género <i>Ceratitis</i>				
<i>(Cc, Ccs, Cfy Cr)</i>	351	Thr	-	-

Tabla 8. Aminoácidos característicos de determinados taxones. (1 Posición respecto a la secuencia de la proteína en *Drosophila yakuba*) (2excepto en *Bactrocera oleae*; 3excepto en *Bactrocera cucurbitae*)

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2
1 (722)	0,75	0,85	0,95	1	0,80	0,90	1	0,95	1	0,95	1	1	1	0,90	1	0,95	0,60	0,90	0,65	0,90	0,75
2 (703)	0,35	0,15	0,10	0	0,25	0,05	0,30	0,15	0,15	0,35	0,05	0	0,10	0,05	0,15	0,15	0,30	0,10	0,35	0,10	0,20
3 (682)	0,15	0,05	0,05	0,35	0,20	0,40	0,45	0,20	0,47	0,40	0,05	0,05	0,15	0,10	0,15	0,30	0,35	0,30	0,30	0,10	0,20
4 (655)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20	0,05	0,15	0	0,16	0,15	0,05	0,05	0	0,20	0,05	0,05	0,30	0,15	0,15	0	0,05
5 (607)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6 (591)	0,05	0	0,10	0,05	0,05	0	0,10	0,15	0,05	0,05	0	0,10	0	0,25	0	0	0,10	0	0,05	0,05	0,10
7 (552)	0,05	0	0,10	0	0	0	0,05	0,05	0,15	0,30	0,05	0,05	0,30	0,05	0,05	0,17	0,25	0,10	0,10	0	0,05
8 (535)	0	0	0,05	0,05	0	0	0,10	0	0,10	0	0	0	0	0,15	0,10	0,11	0,75	0,05	0	0	0,05
9 (512)	0,95	0,35	0,80	0,85	0,75	0,75	0,90	0,80	0,61	0,95	0,80	0,90	0,80	0,75	0,70	0,94	0,50	0,90	0,95	0,40	0,58
10(500)	0,10	0,60	0,15	0,05	0,10	0,35	0,15	0,25	0,11	0,25	0,45	0,15	0,10	0,37	0,35	0	0,30	0,05	0,15	0,30	0,35
11(486)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12(422)	0,30	0,25	0,60	0,15	0,55	0,50	0,53	0,40	0,35	0,50	0,50	0,55	0,60	0,15	0,40	0,45	0,55	0,55	0,55	0,25	0,25
13(392)	0	0,05	0,05	0,05	0,05	0	0,10	0	0,20	0,05	0,10	0	0,05	0,15	0,10	0,18	0	0,10	0,40	0	0,10
14(383)	1	0,45	1	0,55	0,75	0,65	0,70	0,90	0,55	0,85	0,90	0,95	1	0,55	0,90	0,87	0,90	0,70	0,55	0,50	0,65
15(340)	0,30	0,20	0,55	0,20	0,35	0,75	0,55	0,30	0,20	0,35	0,35	0,25	0,25	0,40	0,45	0,31	0,55	0,90	0,65	0,30	0,35

Tabla 10. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA-02 en las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas. En la primera columna se muestra, entre paréntesis, el número de pares de bases de estas bandas.

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2
1(868)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2(857)	0	0	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,15	0,05	0,10	0	0	0	0
3(795)	0,10	0,30	0,16	0,15	0,07	0,10	0,39	0,37	0,24	0,40	0,40	0,55	0,15	0,50	0,26	0,26	0,15	0,15	0,21	0,15	0,35
4(750)	0,55	0,25	0,05	0,20	0,21	0,20	0,12	0,25	0,33	0,30	0,50	0,70	0,55	0,10	0,23	0,26	0,15	0,15	0,21	0,05	0,05
5(710)	0,05	0,25	0,11	0,25	0,29	0,20	0,06	0,19	0,22	0,30	0	0,05	0	0,60	0,23	0,44	0,05	0,10	0,16	0,30	0,15
6(694)	0,15	0,10	0,21	0,15	0,14	0,10	0,06	0,06	0,18	0,15	0,05	0,05	0,05	0,15	0,23	0	0,30	0,30	0,05	0	0
7(646)	0,75	0,70	0	0,60	0,57	0,16	0,11	0,37	0,44	0,50	0,60	0,75	0,85	0,70	0,75	0,44	0,25	0,65	0,05	0,45	0,65
8(622)	0,05	0,10	0	0,20	0,29	0,25	0	0,07	0,11	0,10	0	0,10	0,25	0,15	0,08	0,12	0,70	0	0,26	0,10	0,25
9(607)	0,85	0,85	0,89	1	0,79	1	1	0,88	1	1	1	0,85	0,75	1	1	0,94	0,55	0,95	1	0,95	0,90
10(563)	0,05	0,05	0,11	0,05	0,14	0,05	0,17	0,23	0	0,05	0,20	0,05	0	0,05	0,05	0	0,50	0	0,16	0,10	0
11(517)	0,50	0,55	0,22	0,50	0,47	0,30	0,28	0,35	0,26	0,40	0,60	0,40	0,50	0,30	0,55	0,50	0,30	0,05	0,32	0,50	0,35
12(503)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13(479)	0,58	0,56	0,61	0,47	0,35	0,20	0,31	0,61	0,37	0,45	0,35	0,35	0,45	0,90	-	0,35	0,37	0,10	0,18	0,55	0,40
14(421)	0,05	0,39	0,29	0,23	0,60	0,45	0,44	0,12	0,32	0,45	0,20	0,39	0,20	0,20	-	0,12	0,32	0,90	0,35	0,25	0,25
15(406)	0,53	0,17	0,77	0,47	0,75	0,75	0,62	0,56	0,42	0,75	0,65	0,35	0,40	0,85	-	0,76	0,63	0,26	0,35	0,65	0,35
16(365)	0,79	0,72	0,47	0,70	0,46	0,21	0,71	0,63	0,47	0,40	0,05	0,71	0,30	0,47	-	0,61	0,85	0,20	0,53	0,80	0,80
17(340)	0,32	0,61	0,08	0,35	0,15	0,25	0,31	0,10	0,21	0,15	0,10	0,12	0,10	0,20	0	0,26	0,20	0	0,35	0,90	0,37
18(307)	0,42	0,17	0,26	0,30	0,08	0,15	0,44	0,84	0,53	0,05	0,25	0,29	0,05	0,15	0,22	0,42	0,45	0,05	0,28	0,75	0,44
19(294)	0,53	0,56	0,37	0,50	0,46	0,60	0,83	0,53	0,42	0,25	-	0,55	0,20	0,15	0,50	0,68	0,90	1	0,59	0,95	0,26

Tabla 11. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA-07 en las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas. En la primera columna se muestra, entre paréntesis, el número de pares de bases de estas bandas. (No se muestra la frecuencia de las bandas en aquellos casos en los que sólo se disponía de datos procedentes de 10 o menos individuos).

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2
1 (937)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2 (896)	0,60	0,63	0,60	0,10	0,53	0,80	0,50	0,80	0,65	0,85	0,70	0,79	0,85	0,90	0,79	0,57	-	0,64	0,50	0,95	0,95
3 (800)	0,30	0,53	0,08	0,35	0,29	0,42	0,05	0,58	0,65	0,21	0,30	0,21	0,05	0,15	0,63	0,21	-	0,27	0,40	0,15	0,50
4 (755)	0,55	0,70	0,25	0,55	0,60	0,68	0,50	0,58	0,55	0,58	0,74	0,63	0,70	1	0,63	0,38	0,50	0,62	0,50	1	0,95
5 (711)	0,85	0,85	0,80	0,60	0,80	0,75	0,79	0,95	1	0,68	0,90	0,89	0,70	0,90	0,95	0,77	-	0,90	0,87	0,95	0,90
6 (682)	0,50	0,15	0,47	0,40	0,40	0,35	0,53	0,37	0,20	0,35	0,20	0,42	0,55	0,40	0,58	0,46	0,30	0,28	0,44	0,65	0,20
7 (663)	0,25	0,25	0,64	0,10	0,31	0,30	0,16	0,53	0,30	0,37	0,50	0,30	0,40	0,30	0,32	0,67	0,60	0,61	0,31	0,35	0,40
8 (627)	0,30	0,15	0,07	0,30	0,62	0,50	0,53	0,53	0,60	0,32	0,50	0,50	0,75	0,70	0,42	0,71	0,36	0,50	0,44	0,60	0,40
9 (573)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10(527)	0,21	0,05	0,33	0,39	0,26	0,30	0,53	0,10	0,37	0,22	0,35	0,21	0,05	0,20	0,37	0,47	0,61	0,35	0,42	0,25	0,25
11(511)	0,21	0,50	0,82	0,53	0,26	0,60	0,26	0,40	0,33	0,35	0,15	0,47	0,75	0,35	0,37	0,06	0,33	0,50	0,26	0,40	0,65
12(491)	0,32	0,15	0,44	0,18	0,16	0,20	0,47	0,20	0,39	0,53	0,30	0,26	0,60	0,45	0,32	0,47	0,50	0,30	0	0,45	0,25
13(440)	0,67	0,21	0,56	0,47	0,30	0,65	0,58	0,55	0,68	0,67	0,30	0,50	0,60	0,75	0,58	0,53	0,42	0,90	0,58	0,90	0,80
14(405)	0,63	0,60	0,59	0,82	0,47	0,65	0,63	0,80	0,63	0,71	0,55	0,57	0,40	0,45	0,42	0,71	0,42	0,70	0,89	0,85	0,65
15(359)	0,10	0,20	0,16	0,29	0,32	0,50	0,32	0,35	0,37	0,33	0,30	0,50	0,25	0,15	0,32	0,35	0,33	0,45	0,21	0,25	0,30
16(347)	0,69	0,15	1	0,85	0,90	1	1	0,80	0,85	0,85	0,75	0,54	0,90	0,35	0,63	0,94	1	0,75	0,89	0,75	0,25

Tabla 12. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPA-17 en las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas. En la primera columna se muestra, entre paréntesis, el número de pares de bases de estas bandas. (No se muestra la frecuencia de las bandas en aquellos casos en los que sólo se disponía de datos procedentes de 10 o menos individuos).

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev-1	Sev-2	Tar	Tun	USA-1	USA-2	Val-1	Val-2
1 (837)	0,05	0,10	0	0,05	0,10	0	0,05	0	0,05	0,10	0	0,10	0,05	0,05	0	0,05	0,05	0	0	0,05	0,10
2 (813)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3 (716)	0,21	0,05	0,05	0,05	0,15	0,05	0,31	0,10	0,16	0	0,10	0	0	0,25	0,22	0,30	0,44	0,16	0,16	0,20	0,15
4 (623)	0,05	0	0,05	0,05	0,30	0,20	0,20	0,10	0,10	0,05	0,15	0,05	0	0,05	0,05	0,20	0,26	0,15	0,26	0,05	0,10
5 (594)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6 (573)	0,16	0,11	0,40	0,20	0,25	0,25	0,45	0,60	0,16	0,15	0,25	0,15	0,06	0,20	0,32	0,35	0,67	0,30	0,10	0,20	0,30
7 (544)	0,75	0,65	0,70	0,75	0,85	0,75	0,75	0,90	0,80	0,60	0,75	0,58	0,68	0,80	0,79	0,75	0,74	0,80	0,65	0,80	0,75
8 (498)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9 (450)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10(400)	0,28	0,65	0,89	0,35	0,50	0,50	0,65	0,25	0,50	0,85	0,89	0,60	0,55	0,55	0,70	0,65	0,72	0,47	0,60	0,47	0,68
11(337)	0,10	0,15	0,05	0,05	0,44	0,30	0,50	0,11	0,30	0,21	0	0	0	0,05	0,20	0,30	0,47	0,45	0,30	0,35	0,15
12(316)	0,22	0,06	0,47	0,45	0,21	0,85	0,89	0,95	0,50	0,85	0,95	1	0,45	0,20	0,45	0,95	1	0,70	0,60	0,47	0,16
13(283)	0,84	0,95	0,84	0,75	0,74	0,70	0,70	0,79	0,85	0,67	1	1	0,80	0,95	0,90	0,90	0,84	0,60	0,45	0,90	0,85
14(248)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 13. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC-05 en las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas. En la primera columna se muestra, entre paréntesis, el número de pares de bases de estas bandas.

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev-1	Sev-2	Tar	Tun	USA-1	USA-2	Val-1	Val-2
1 (1031)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1
2(985)	0,70	0,35	0,44	0,55	0,10	0,44	0,68	0,65	0,75	0,37	0,15	0,50	0	0,20	0,90	0	-	0,22	0,65	0,35	0,15
3(966)	0,50	0,60	0,39	0,70	0,60	0,68	0,89	0,45	0,50	0,63	0,60	0,50	0,60	0,65	0,30	0,65	-	0,95	0,62	0,85	0,85
4(915)	0,25	0,60	0,06	0,40	0,21	0,05	0,11	0,10	0,25	0,33	0,25	0,25	0,25	0,10	0,20	0,24	-	0,10	0,50	0,10	0,35
5(870)	0,35	0,20	0,05	0,20	0,21	0	0	0,05	0,25	0,11	0,05	0,10	0	0,25	0,35	0,11	-	-	0,33	0,20	0,20
6(835)	0,55	0,60	0,89	0,75	0,68	0,56	0,33	0,35	0,35	0,89	1	0,65	0,75	0,30	0,80	0,84	-	-	0,36	0,90	0,70
7(799)	0,10	0,20	0,06	0,15	0	0	0	0,35	0,10	0,05	0	0	0,05	0,05	0,10	0,16	-	-	0	0	0,10
8(780)	0,30	0,10	0,06	0,15	0	0,05	0,32	0,25	0,10	0	0,05	0,10	0	0,10	0,15	0,16	-	-	-	0,20	0,15
9(705)	0,06	0,20	0	0,40	0,31	0,17	0,06	0,20	0,15	0	0,15	0,20	0,15	0,20	0,10	0,53	-	-	-	0,15	0,15
10(690)	0,83	1	0,81	0,95	0,44	1	0,35	0,75	1	0,79	1	0,90	0,90	1	0,95	0,89	-	-	-	0,75	1
11(675)	0,28	0,60	0,53	0,10	0,31	0,11	0,65	0,55	0,28	0,44	0,45	0,70	0,20	0,40	0,60	0,26	-	-	-	0,40	0,10
12(632)	0,53	0,25	0,13	0,60	0,25	0,50	0,47	0,25	0,39	0,28	0,20	0,20	0,45	0,30	0,45	0,26	-	-	-	0,30	0,65
13(605)	0,50	0,20	0,40	0,35	0,44	0,44	0,50	0,45	0,39	0,39	0,65	0,70	0,30	0,35	0,60	0,37	-	-	-	0,60	0,80
14(555)	0,19	0,25	0,73	0,45	0,47	0,17	0,33	0,35	0,50	0,58	0,20	0,30	0,25	0,10	0,10	0,26	-	0,20	-	0,10	0,40
15(511)	0,29	0,90	0,60	0,45	-	0,30	0,16	0,15	0,53	0,37	0,50	0,50	0,30	0,55	0,35	0,68	-	0,50	-	0,35	0,65
16(490)	0,59	0,15	0,67	0,80	-	0,85	1	0,80	0,63	0,89	1	0,95	0,95	0,35	0,85	0,58	-	0,57	-	0,95	0,40
17(453)	0,53	0,40	0,33	0,10	0,13	0,15	0,32	0,35	0,32	0,33	0,25	0,35	0,30	0,35	0,35	0,58	-	0,30	0,33	0,35	0,50
18(420)	0,06	0	0,14	0,10	0	0,05	0,37	0	0,05	0,47	0,05	0,20	0,15	0,05	0	0,16	-	0	0,07	0,15	0
19(411)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1
20(358)	0,67	0,45	0,50	0,32	0,70	0,65	0,53	0,75	0,42	0,78	0,95	1	0,95	0,70	0,72	0,74	-	0,41	0,46	0,75	0,15
21(342)	0,44	0,45	0,58	0,32	-	0,55	0,76	0,50	0,63	0,56	0,60	0,70	0,55	0,50	0,50	0,89	-	0,79	0,31	0,80	0,80
22(317)	0,50	0,85	0,50	0,90	-	0,85	1	0,95	0,68	0,79	0,90	1	0,90	0,90	0,83	0,79	-	0,29	0,85	0,45	0,40
23(295)	0,64	0,70	0,84	1	-	0,95	0,89	1	0,79	0,89	0,90	1	0,90	0,65	0,71	0,89	-	0,80	0,38	0,10	0,95

Tabla 14. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC-06 en las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas. En la primera columna se muestra, entre paréntesis, el número de pares de bases de estas bandas. (No se muestra la frecuencia de las bandas en aquellos casos en los que sólo se disponía de datos procedentes de 10 o menos individuos).

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev-1	Sev-2	Tar	Tun	USA-1	USA-2	Val-1	Val-2
1 (858)	0,90	0,90	0,72	1	0,70	0,50	0,85	0,77	0,65	0,80	0,75	0,80	0,85	0,84	0,95	0,85	0,95	0,90	0,80	0,85	1
2 (838)	0,05	0,05	0,17	0,10	0,05	0,15	0,10	0,31	0,30	0,05	0,05	0,10	0,15	0,16	0,15	0,10	0,15	0,25	0,30	0,10	0,05
3 (803)	1	1	1	1	0,90	1	1	0,95	1	1	1	1	1	1	0,95	0,95	0,89	0,95	1	1	1
4 (767)	0,95	1	1	1	0,85	1	0,90	1	0,95	1	1	0,80	1	1	0,95	0,80	0,50	1	0,95	1	1
5 (707)	0,30	0,50	0,68	0,80	0,65	0,80	0,95	0,71	0,65	0,60	0,45	0,80	0,75	0,84	0,40	0,85	0,89	1	1	0,65	0,70
6 (669)	0,10	0,15	0,21	0,40	0,18	0	0,10	0,27	0,10	0,10	0,05	0	0,05	0,16	0,15	0,10	0,21	0,35	0,40	0,15	0,10
7 (646)	0,85	0,70	0,75	0,75	0,80	0,85	0,75	0,32	0,65	0,85	0,50	0,75	0,85	0,58	0,65	0,65	0,55	0,75	0,80	0,65	0,75
8 (634)	0,90	0,45	0,70	0,95	0,95	0,65	0,80	0,90	0,85	0,85	1	0,85	0,70	0,90	0,95	1	0,80	0,80	0,80	0,85	0,70
9 (609)	0,25	0,25	0,15	0,25	0,26	0,50	0,35	0,15	0,40	0,30	0,30	0,30	0,50	0,16	0,15	0,25	0,35	0,35	0,25	0,25	0,30
10(546)	0,55	0,65	0,95	0,85	0,80	0,70	0,65	0,65	0,90	0,85	0,95	0,75	0,90	0,84	0,80	0,60	0,85	0,35	0,45	0,55	0,70
11(517)	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,30	0,25	0,05	0
12(498)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13(454)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14(405)	0,95	1	0,90	1	1	1	1	1	0,95	1	0,95	1	0,95	1	1	1	1	1	1	1	0,80
15(310)	0,90	0,85	0,90	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,90	1	1	1	1	1	1	1
16(270)	0,90	0,45	0,75	0,70	0,85	0,75	0,65	0,85	0,90	0,70	0,65	0,75	0,80	0,90	0,80	0,90	0,90	0,80	0,70	0,75	0,70

Tabla 15. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC-11 en las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas. En la primera columna se muestra, entre paréntesis, el número de pares de bases de estas bandas.

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev- 1	Sev- 2	Tar	Tun	USA- 1	USA- 2	Val- 1	Val- 2
1 (858)	0,60	0,75	0,65	0,45	0,40	0,50	0,60	0,45	0,45	0,70	0,60	0,70	0,50	0,90	0,70	0,25	0,32	0,45	0,45	0,53	0,55
2 (838)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3 (803)	0,20	0,15	0,15	0,05	0,05	0,25	0,10	0	0,25	0,30	0,40	0,25	0	0,25	0	0,15	0,22	0,10	0,10	0	0,25
4 (767)	0,15	0,40	0,15	0,40	0,25	0,20	0,10	0,10	0,30	0,15	0,15	0,30	0,25	0,45	0,10	0,15	0,16	0,20	0,05	0,20	0,50
5 (707)	0	0,30	0,05	0,15	0,20	0	0,10	0,05	0,20	0,35	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30	0,21	0	0,10	0,15	0,21
6 (669)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7 (646)	0,05	0,20	0,15	0,55	0,35	0,25	0,05	0	0,40	0,40	0,20	0,55	0,60	0,25	0	0,25	0,26	0,30	0,20	0,45	0,10
8 (634)	0	0,10	0,05	0,20	0,30	0,05	0,05	0,05	0	0,05	0	0,05	0	0	0	0,25	0,05	0	0,20	0,05	0
9 (609)	0,90	1	0,83	1	1	0,90	0,90	1	1	1	0,95	1	1	1	1	0,95	0,94	0,90	0,94	1	1
10(546)	1	1	1	1	1	1	0,95	1	0,95	0,95	1	1	1	1	1	1	0,95	1	1	1	1
11(517)	0,05	0,55	0,17	0,60	0,55	0,25	0,05	0,20	0,20	0,05	0	0,20	0,63	0,30	0	0,45	0,17	0,05	0,44	0,50	0,10
12(498)	0,40	0,65	0,33	0,50	0,30	0,55	0,10	0,65	0,50	0,58	0,35	0,75	0,68	0,45	0,30	0,55	0,56	0,50	0,61	0,45	0,50

Tabla 16. Frecuencia de cada una de las bandas de RAPD amplificadas con el cebador OPC-18 en las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas. En la primera columna se muestra, entre paréntesis, el número de pares de bases de estas bandas.

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2	Media	Total
OPA02	13	12	15	13	13	11	15	12	15	14	13	11	13	15	14	13	14	14	14	11	15	13,3	15
OPA07	18	18	16	18	19	18	17	18	17	18	-	18	16	18	-	17	19	15	18	17	16	17,4	19
OPA17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	-	16	15	16	16	15,9	16
OPC05	14	13	13	14	14	13	14	13	14	13	12	12	11	14	13	14	14	13	13	14	14	13,3	14
OPC06	23	22	22	23	-	21	21	22	23	21	22	22	21	22	22	22	-	-	-	22	22	21,9	23
OPC11	16	15	15	15	15	14	15	15	16	15	15	14	15	15	15	15	15	16	16	16	15	15,1	16
OPC18	10	12	12	12	12	11	12	10	11	12	10	12	10	11	8	12	12	10	12	11	11	11,1	12
Media	15,7	15,6	15,6	15,9	-	14,9	15,3	15,1	16,0	15,6	-	14,9	14,6	15,9	-	15,6	-	-	-	15,3	15,6	15,4	16,4
Total	110	109	109	111	-	104	107	106	112	109	-	104	102	111	-	109	-	-	-	107	109	108	115

Tabla 17. En la parte superior se muestra el número de bandas por cebador en cada población, el número medio de bandas por población para cada cebador y el número total de bandas obtenidas con cada uno de los cebadores. En la parte inferior se muestran el número medio de bandas por cebador y el número total de bandas obtenidas con todos los cebadores en cada población y en el conjunto de poblaciones. (No se facilita el número de bandas de distinto peso molecular para aquellos cebadores y poblaciones en los que se carece de información para una o más bandas; en las poblaciones en las que falta información para alguno de los cebadores no se hace la media de bandas de distinto peso molecular por población ni se facilita el total de bandas).

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2	
OPA02	0,40	0,47	0,47	0,33	0,60	0,47	0,73	0,53	0,73	0,53	0,40	0,33	0,47	0,73	0,60	0,60	0,80	0,67	0,67	0,53	0,67	0,56
OPA07	0,63	0,79	0,68	0,74	0,79	0,74	0,74	0,84	0,74	0,68	0,56	0,68	0,63	0,74	0,67	0,74	0,84	0,47	0,68	0,63	0,68	0,70
OPA17	0,87	0,81	0,81	0,87	0,87	0,81	0,75	0,81	0,81	0,87	0,87	0,87	0,75	0,81	0,81	0,87	0,77	0,87	0,81	0,69	0,75	0,82
OPC05	0,50	0,43	0,43	0,36	0,64	0,50	0,57	0,50	0,57	0,50	0,36	0,29	0,36	0,36	0,50	0,50	0,50	0,57	0,57	0,50	0,64	0,48
OPC06	0,91	0,83	0,87	0,87	0,72	0,61	0,74	0,74	0,83	0,78	0,57	0,70	0,66	0,78	0,83	0,87	-	0,71	0,79	0,83	0,78	0,77
OPC11	0,63	0,56	0,63	0,44	0,56	0,50	0,56	0,56	0,63	0,50	0,31	0,56	0,50	0,50	0,44	0,56	0,63	0,56	0,56	0,56	0,50	0,54
OPC18	0,42	0,67	0,58	0,58	0,58	0,58	0,50	0,33	0,58	0,50	0,50	0,58	0,50	0,58	0,33	0,67	0,67	0,50	0,67	0,50	0,58	0,54
	0,63	0,65	0,64	0,60	0,68	0,60	0,66	0,62	0,70	0,62	0,51	0,57	0,55	0,64	0,60	0,69	0,70	0,62	0,68	0,61	0,66	0,63

Tabla 18. Polimorfismo estimado, con el criterio del 95%, para cada uno de los cebadores utilizados y para el conjunto de cebadores, de cada una de las poblaciones analizadas y del conjunto de poblaciones.

pb	Frec. global	χ^2	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2
722	89,5	61,5*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-4,4	-	-3,7	-	-
703	16,2	38,3*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
682	22,7	44,6*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
655	9,3	30,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
591	6,0	27,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7	-	-	-	-	-	-	-
552	8,9	43,7*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4	-	-	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-
535	7,2	158,6*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,0	-	-	-	-
512	75,9	69,2*	-	-4,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	22,4	53,0*	-	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
422	42,5	35,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
392	8,2	46,8*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,3	-	-
383	75,5	73,2*	-	-3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
340	40,6	59,3*	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6	-	-	-

Tabla 19. Frecuencia global (frecuencia de la banda en el conjunto de 21 poblaciones) y valor de χ^2 para cada una de las bandas no constantes obtenidas con el cebador OPA-02 y valores significativos de las diferencias estandarizadas para cada una de las poblaciones. En la primera columna se muestra el número de pares de bases (pb) de cada una de las bandas.

* valores de χ^2 significativos, con un nivel de significación de 0,01

pb	Frec. global	χ^2	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2			
857	1,7	38,2*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,7	-	-	-	-	-	-	-		
795	25,9	38,1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
750	26,1	65,8*	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
710	18,7	56,6*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
694	11,7	29,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
646	49,4	95,3*	-	-	-	-	-	-3,0	-	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-3,9	-	-	-	
622	15,3	73,5*	-	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0	-	-	-	-	-	-	
607	91,1	61,9*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-5,8	-	-	-	-	-	-	
563	9,4	61,2*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
517	39,2	30,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,2	-	-	-	-	-	
479	42,4	47,7*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,0	-	-	-	-	-	
421	32,5	61,3*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,6	-	-	-	-	-	
406	55,5	54,7*	-	-3,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
365	54,8	78,3*	-	-	-	-	-	-3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,2	-	-	-	-	-	
340	25,4	83,6*	-	3,6	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,8	-	-	
307	31,8	82,7*	-	-	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3	-	-	-	
294	54,4	88,3*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,6	-	-	3,3	4,2	-	3,7	-	-	-	
																3,2										

Tabla 20. Frecuencia global (frecuencia de la banda en el conjunto de 21 poblaciones) y valor de χ^2 para cada una de las bandas no constantes obtenidas con el cebador OPA-07 y valores significativos de las diferencias estandarizadas para cada una de las poblaciones. En la primera columna se muestra el número de pares de bases (pb) de cada una de las bandas.

* valores de χ^2 significativos, con un nivel de significación de 0,01

pb	Frec, global	χ^2	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2
896	71,0	47,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,1	-	-	-	-
800	32,7	58,2*	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
755	64,6	51,1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4	-	-	-	-	-	-	3,4	-
711	84,1	29,5	-	-	-	-3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
682	38,9	29,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
663	36,9	36,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
627	47,0	45,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
527	29,2	36,2	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
511	41,1	55,8*	-	-	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
491	32,5	39,4*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-	-3,1	-	-
440	58,7	52,0*	-	-3,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
405	62,9	32,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
359	29,8	19,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
347	75,3	124,6*	-	-6,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-4,3	-	-	-	-	-	-	-5,3

Tabla 21. Frecuencia global (frecuencia de la banda en el conjunto de 21 poblaciones) y valor de χ^2 para cada una de las bandas no constantes obtenidas con el cebador OPA-17 y valores significativos de las diferencias estandarizadas para cada una de las poblaciones. En la primera columna se muestra el número de pares de bases (pb) de cada una de las bandas.

* valores de χ^2 significativos, con un nivel de significación de 0,01

pb	Frec. global	χ^2	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2	
837	4,6	13,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
716	14,7	39,4*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-	-	-	-
623	11,6	31,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
573	26,7	48,5*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	-	-	-	-	-
544	74,3	12,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400	58,5	49,2*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
337	21,3	65,2*	-	-	-	-	-	-	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
316	59,5	156,8*	-3,3	-4,8	-	-	-3,5	-	3,2	3,3	-	-	3,3	3,8	-	-3,7	-	3,3	3,7	-	-	-	-	-4,0
283	81,1	48,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-4,2	-	-	-

Tabla 22. Frecuencia global (frecuencia de la banda en el conjunto de 21 poblaciones) y valor de χ^2 para cada una de las bandas no constantes obtenidas con el cebador OPC-05 y valores significativos de las diferencias estandarizadas para cada una de las poblaciones. En la primera columna se muestra el número de pares de bases (pb) de cada una de las bandas.

* valores de χ^2 significativos, con un nivel de significación de 0,01

pb	Frec. global	χ^2	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2	
985	41,0	105,4*	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
966	62,6	44,6*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,1	-	-	3,0	-	-	-	-
915	23,3	42,5*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
870	16,7	53,3*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	3,2	-	-	-	-
835	65,6	75,3*	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,0	-	-	-	-	-3,4	-	-	-	-	-	-	-	-
799	8,1	38,3*	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
780	12,7	27,3	-	-	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
705	17,8	37,5*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,1	-	-	-	-	-	-
690	86,0	87,9*	-	-	-	-	-5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
675	39,5	50,0*	-	-	-	-	-	-	6,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
632	36,0	33,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
605	48,1	36,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
555	30,7	45,0*	-	-	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
511	45,8	52,2*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
490	72,3	104,3*	-	-5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,8	-	-	-	-	-	-	-	-3,3
453	33,1	23,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
420	10,6	69,4*	-	-	-	-	-	-	3,8	-	-	5,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
358	63,3	77,4*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	3,5	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-4,6
342	59,3	36,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
317	74,9	97,0*	-	-	-	-	-3,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-4,1	-	-3,2	-3,7	-
295	78,5	112,9*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,6	-7,7	-	-

Tabla 23. Frecuencia global (frecuencia de la banda en el conjunto de 21 poblaciones) y valor de χ^2 para cada una de las bandas no constantes obtenidas con el cebador OPC-06 y valores significativos de las diferencias estandarizadas para cada una de las poblaciones. En la primera columna se muestra el número de pares de bases (pb) de cada una de las bandas.

* valores de χ^2 significativos, con un nivel de significación de 0,01

pb	Frec. global	χ^2	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2	
858	82,7	39,5*	-	-	-	-	-	-4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
838	13,4	23,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
803	98,1	24,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
767	93,7	90,1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-7,8	-	-	-	-	-
707	71,2	69,8*	-4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,2	-	-	-	-	-	-	-
669	15,6	39,7*	-	-	-	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	-	-	-
646	70,3	33,7*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
634	82,6	48,3*	-	-4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
609	28,7	19,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
546	72,8	55,1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,9	-	-	-	-
517	4,1	78,6*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0	4,9	-	-	-
405	97,6	41,4*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-5,3
310	97,9	40,8*	-	-4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
270	76,9	28,4	-	-3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 24. Frecuencia global (frecuencia de la banda en el conjunto de 21 poblaciones) y valor de χ^2 para cada una de las bandas no constantes obtenidas con el cebador OPC-11 y valores significativos de las diferencias estandarizadas para cada una de las poblaciones. En la primera columna se muestra el número de pares de bases (pb) de cada una de las bandas.

* valores de χ^2 significativos, con un nivel de significación de 0,01

pb	Frec. global	χ^2	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2	
858	54,8	37,8*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-
803	15,3	40,0*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
767	22,4	35,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-
707	13,9	32,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
646	26,5	65,8*	-	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	3,0	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
634	6,9	50,4*	-	-	-	-	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-
609	96,4	27,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
546	99,0	17,4	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
517	26,2	93,2*	-	3,0	-	3,5	3,0	-	-	-	-	-	-	-	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
498	48,8	37,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
									3,6															

Tabla 25. Frecuencia global (frecuencia de la banda en el conjunto de 21 poblaciones) y valor de χ^2 para cada una de las bandas no constantes obtenidas con el cebador OPC-18 y valores significativos de las diferencias estandarizadas para cada una de las poblaciones. En la primera columna se muestra el número de pares de bases (pb) de cada una de las bandas.

* valores de χ^2 significativos, con un nivel de significación de 0,01

	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev 1	Sev 2	Tar	Tun	USA 1	USA 2	Val 1	Val 2	χ^2
OPA02																						
(15)	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
+	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
-	0	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	2	1	2	0	0	
Total																						10
OPA07																						
(19)	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2	1	1	0	2	2	0	3	0	
+	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	3	1	0	0	
-	1	2	0	0	0	2	1	1	0	0	1	2	3	2	1	0	3	5	1	3	0	
Total																						15
OPA17																						
(16)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	
+	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	
-	0	2	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	1	1	0	1	1	1	
Total																						8
OPC05																						
(14)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	3	0	0	0	0	
+	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	
-	1	1	0	0	1	0	1	2	0	0	1	1	0	1	0	1	3	0	1	0	1	
Total																						6
OPC06																						
(23)	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	2	0	0	0	
+	0	1	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	1	2	1	1	0	1	1	2	3	
-	0	1	1	0	2	0	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	3	1	2	3	
Total																						16
OPC11																						
(16)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	
+	1	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	
-	1	3	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	0	1	
Total																						10
OPC18																						
(12)	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	1	0	0	0	0	1	
+	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
-	0	1	1	2	2	0	1	0	0	0	1	1	2	1	0	1	0	0	0	0	1	
Total																						5
Todos																						
	3	13	4	4	5	4	5	6	3	2	4	5	9	9	3	5	11	11	8	6	7	

Tabla 26. Número de bandas por población y cebador cuya frecuencia es significativamente menor (-) o mayor (+) que la frecuencia media de la banda en el conjunto de poblaciones. Debajo del nombre de cada cebador se indica, entre paréntesis, el número total de bandas amplificadas por el mismo. En la última fila se muestra la suma de estas bandas para todos los cebadores. La última columna señala el número de bandas cuya frecuencia presenta diferencias significativas entre diferentes poblaciones según un análisis de χ^2 .

H _o																					
	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	Val2
OPC05	3,18	2,42	2,41	3,00	3,78	3,07	3,45	2,36	3,39	2,66	1,77	1,86	2,09	2,88	2,97	3,17	3,01	3,44	3,59	3,31	3,32
OPC06	9,10	8,16	7,54	8,01	-	5,58	7,06	7,41	8,73	7,37	6,05	6,80	6,36	8,30	7,46	7,59	-	-	-	7,63	3,08
OPC11	3,35	3,77	3,36	2,56	3,05	2,94	2,98	3,42	3,54	2,73	2,83	2,76	2,70	2,77	2,96	2,87	3,35	3,64	3,77	3,45	7,34
OPC18	2,41	3,44	3,25	3,55	3,76	3,29	2,63	2,15	3,57	3,31	2,86	3,18	2,57	3,03	1,55	3,90	3,68	2,69	3,67	3,11	3,11
OPA02	3,34	3,71	3,52	3,16	4,08	3,15	4,50	3,52	5,02	4,29	3,14	2,36	3,01	4,94	3,99	3,74	5,26	3,61	4,78	3,59	4,97
OPA07	5,84	6,55	5,51	6,83	7,10	6,37	5,77	6,43	6,90	6,56	4,99	6,15	5,66	5,79	-	6,26	7,04	4,02	6,74	5,05	6,10
OPA17	6,17	5,70	5,31	6,09	6,31	5,76	5,78	5,04	5,83	6,05	6,09	6,29	5,03	5,38	6,20	5,73	-	6,17	5,53	4,62	5,39
Media	4,77	4,82	4,41	4,74	4,68	4,31	4,60	4,33	5,28	4,71	3,96	4,20	3,92	4,73	4,20	4,75	4,47	2,93	4,68	4,39	4,76

Tabla 27. Estimaciones de las medidas de diversidad genética de Shannon (H_o) para las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* y los 7 cebadores utilizados.

Cebador	H _{pop}	H _{sp}	H _{pop} /H _{sp}	(H _{sp} -H _{pop})/H _{sp}
OPC05	2,91	3,45	0,84	0,16
OPC06	7,44	8,82	0,84	0,16
OPC11	3,14	3,46	0,91	0,09
OPC18	3,08	3,62	0,85	0,15
OPA02	3,89	4,63	0,84	0,16
OPA07	6,08	7,33	0,83	0,17
OPA17	5,72	6,37	0,90	0,10
Media	4,61	5,38	0,86	0,14

Tabla 28. Estimaciones de la diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}), la diversidad total (H_{sp}) y la proporción de diversidad dentro de poblaciones (H_{pop}/H_{sp}) y entre poblaciones (H_{sp}-H_{pop}/H_{sp})

Ali	0,63																					
Cac	0,58	0,61																				
Ciu	0,61	0,57	0,67																			
Cue	0,61	0,60	0,62	0,65																		
Ger	0,59	0,56	0,61	0,61	0,61																	
Gre	0,60	0,57	0,63	0,63	0,61	0,65																
Isr	0,61	0,55	0,63	0,62	0,60	0,65	0,67															
Ita	0,62	0,57	0,63	0,63	0,59	0,64	0,64	0,67														
Jae	0,60	0,58	0,61	0,62	0,59	0,62	0,62	0,63	0,62													
Mad	0,61	0,58	0,65	0,63	0,61	0,64	0,64	0,63	0,62	0,66												
Mal	0,63	0,60	0,65	0,64	0,62	0,66	0,64	0,65	0,63	0,67	0,70											
Mlg	0,63	0,61	0,64	0,65	0,61	0,65	0,65	0,66	0,63	0,67	0,69	0,70										
Por	0,62	0,59	0,64	0,65	0,62	0,65	0,62	0,63	0,62	0,66	0,67	0,68	0,67									
Sev1	0,61	0,60	0,61	0,62	0,60	0,61	0,60	0,62	0,61	0,62	0,64	0,64	0,64	0,66								
Sev2	0,64	0,60	0,65	0,64	0,61	0,64	0,64	0,65	0,63	0,65	0,67	0,67	0,65	0,63	0,67							
Tar	0,61	0,58	0,63	0,63	0,62	0,64	0,64	0,64	0,62	0,64	0,66	0,66	0,65	0,62	0,64	0,66						
Tun	0,59	0,54	0,61	0,60	0,60	0,60	0,63	0,62	0,59	0,60	0,61	0,62	0,59	0,58	0,62	0,64	0,65					
USA1	0,61	0,57	0,63	0,62	0,62	0,65	0,65	0,63	0,62	0,63	0,63	0,64	0,63	0,61	0,63	0,64	0,61	0,68				
USA2	0,59	0,56	0,61	0,61	0,60	0,62	0,63	0,61	0,60	0,61	0,60	0,61	0,59	0,59	0,61	0,62	0,59	0,63	0,62			
Val1	0,62	0,59	0,62	0,63	0,61	0,63	0,63	0,63	0,61	0,62	0,63	0,64	0,63	0,63	0,64	0,64	0,60	0,63	0,61	0,68		
Val2	0,60	0,60	0,61	0,62	0,58	0,60	0,60	0,60	0,61	0,61	0,62	0,63	0,62	0,62	0,62	0,61	0,58	0,62	0,58	0,62	0,64	
	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev-1	Sev-2	Tar	Tun	USA-1	USA-2	Val-1	Val-2	

Tabla 29. Índices de similitud interpoblacionales (por debajo de la diagonal) e intrapoblacionales (en la diagonal) calculados por el método de Nei y Li.

Cac	0,048±0,022																				
Ciu	0,038±0,020	0,065±0,026																			
Cue	0,048±0,022	0,047±0,022	0,052±0,023																		
Ger	0,032±0,018	0,050±0,023	0,043±0,021	0,044±0,021																	
Gre	0,050±0,023	0,066±0,026	0,035±0,019	0,035±0,019	0,038±0,020																
Isr	0,055±0,024	0,090±0,030	0,043±0,021	0,045±0,021	0,046±0,022	0,026±0,016															
Ita	0,045±0,021	0,065±0,026	0,051±0,023	0,038±0,020	0,045±0,022	0,035±0,019	0,042±0,020														
Jae	0,041±0,021	0,043±0,021	0,046±0,022	0,035±0,019	0,036±0,019	0,037±0,019	0,047±0,022	0,037±0,020													
Mad	0,042±0,021	0,058±0,025	0,031±0,018	0,031±0,018	0,040±0,020	0,024±0,016	0,036±0,019	0,041±0,021	0,039±0,020												
Mal	0,064±0,026	0,075±0,028	0,054±0,024	0,053±0,024	0,068±0,027	0,051±0,023	0,065±0,026	0,055±0,024	0,052±0,023	0,032±0,018											
Mlg	0,060±0,025	0,072±0,028	0,070±0,027	0,054±0,024	0,067±0,027	0,053±0,024	0,055±0,024	0,037±0,020	0,057±0,024	0,039±0,020	0,037±0,020										
Por	0,043±0,021	0,062±0,026	0,043±0,021	0,039±0,020	0,046±0,022	0,041±0,021	0,058±0,024	0,047±0,022	0,047±0,022	0,030±0,018	0,044±0,021	0,037±0,020									
Sev1	0,051±0,023	0,040±0,020	0,073±0,028	0,053±0,024	0,053±0,024	0,058±0,025	0,082±0,030	0,057±0,025	0,043±0,021	0,051±0,023	0,064±0,026	0,068±0,027	0,057±0,024								
Sev2	0,027±0,017	0,045±0,022	0,043±0,021	0,039±0,020	0,031±0,018	0,046±0,022	0,044±0,021	0,031±0,018	0,026±0,016	0,038±0,020	0,043±0,021	0,045±0,022	0,043±0,021	0,046±0,022							
Tar	0,046±0,022	0,070±0,027	0,049±0,023	0,041±0,021	0,030±0,018	0,038±0,020	0,042±0,021	0,036±0,019	0,043±0,021	0,034±0,019	0,045±0,022	0,045±0,022	0,050±0,023	0,057±0,024	0,041±0,021						
Tun	0,129±0,038	0,157±0,042	0,114±0,035	0,136±0,039	0,106±0,034	0,121±0,036	0,096±0,032	0,114±0,035	0,116±0,036	0,116±0,035	0,144±0,040	0,127±0,037	0,148±0,040	0,162±0,042	0,105±0,034	0,085±0,030					
USA1	0,063±0,026	0,083±0,030	0,068±0,027	0,063±0,026	0,049±0,023	0,039±0,020	0,049±0,023	0,058±0,025	0,062±0,025	0,061±0,025	0,101±0,033	0,088±0,031	0,075±0,028	0,078±0,029	0,066±0,026	0,055±0,024	0,128±0,037				
USA2	0,046±0,022	0,062±0,026	0,050±0,023	0,047±0,022	0,036±0,019	0,034±0,019	0,040±0,020	0,053±0,024	0,047±0,022	0,042±0,021	0,087±0,030	0,083±0,030	0,073±0,028	0,070±0,027	0,058±0,025	0,044±0,021	0,104±0,034	0,038±0,020			
Val1	0,054±0,024	0,061±0,025	0,074±0,028	0,059±0,025	0,043±0,021	0,052±0,023	0,059±0,025	0,060±0,025	0,052±0,023	0,056±0,024	0,070±0,027	0,079±0,029	0,063±0,026	0,053±0,023	0,042±0,021	0,053±0,024	0,129±0,038	0,064±0,026	0,063±0,026		
Val2	0,046±0,022	0,034±0,019	0,063±0,026	0,042±0,021	0,053±0,024	0,060±0,025	0,082±0,030	0,058±0,025	0,039±0,020	0,052±0,023	0,070±0,027	0,078±0,029	0,057±0,024	0,042±0,021	0,045±0,022	0,060±0,025	0,134±0,038	0,066±0,026	0,065±0,026	0,049±0,023	
	Ali	Cac	Ciu	Cue	Ger	Gre	Isr	Ita	Jae	Mad	Mal	Mlg	Por	Sev1	Sev2	Tar	Tun	USA1	USA2	Val1	

Tabla 30. Distancias genéticas de Nei entre las 21 poblaciones analizadas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Componente de la varianza	P	% de variación
Todas las poblaciones				
-1 grupo				
Entre poblaciones	19	0,587	< 0,001	8,45
Entre individuos de la misma población	380	6,354	< 0,001	91,55
-2 grupos: América (USA) / resto				
Entre grupos	1	0,264	< 0,001	3,69
Entre pobla. dentro de grupos	18	0,537	< 0,001	7,50
Entre individuos de la misma población	380	6,354	< 0,001	88,81
-2 grupos: África (Tun) / resto				
Entre grupos	1	0,587	< 0,001	7,86
Entre pobla. dentro de grupos	18	0,528	< 0,001	7,07
Entre individuos de la misma población	380	6,354	< 0,001	85,07
-2 grupos: Norte del Mediterráneo (España, Por, Gre, Ita) / resto				
Entre grupos	1	0,288	< 0,001	4,03
Entre pobla. dentro de grupos	18	0,490	< 0,001	6,87
Entre individuos de la misma población	380	6,354	< 0,001	89,1
-2 grupos: España y Portugal / resto				
Entre grupos	1	0,249	< 0,001	3,52
Entre pobla. dentro de grupos	18	0,476	< 0,001	6,73
Entre individuos de la misma población	380	6,354	< 0,001	89,7
-3 grupos: América (USA) / África (Tun) / resto				
Entre grupos	2	0,424	< 0,001	5,85
Entre pobla. dentro de grupos	17	0,469	< 0,001	6,47
Entre individuos de la misma población	380	6,354	< 0,001	87,69
-4 grupos: Europa, Asia (Isr), África (Tun), América (USA)				
Entre grupos	3	0,364	< 0,001	5,08
Entre pobla. dentro de grupos	16	0,454	< 0,001	6,34
Entre individuos de la misma población	380	6,354	< 0,001	88,59
Poblaciones españolas y de Portugal				
-1 grupo				
Entre poblaciones	13	0,685	< 0,001	7,72
Entre individuos de la misma población	266	8,189	< 0,001	92,28

Tabla 31. Resultados del análisis molecular de la varianza (AMOVA).

	Todas las poblaciones		Área mediterránea	
		<i>Nm</i>		<i>Nm</i>
F_{ST} (Wright)	0,081±0,023	2,8	0,053±0,020	4,5
θ (Weir y Cockerham)	0,124±0,033	1,8	0,097±0,030	2,3
F_{ST} (Lynch y Milligan)	0,250±0,054	0,7	0,086±0,026	2,7

Tabla 32. Valores del estadístico F_{ST} y estimas de Nm en las poblaciones de *Bactrocera oleae*.



Figura 1. Hembra de la especie *Anastrepha ludens*.
Fotografía procedente de la página web de la Universidad de Florida
(<http://creatures.ifas.ufl.edu>)



Figura 2. Hembra de la especie *Anastrepha suspensa*.
Fotografía procedente de la página web de la Universidad de Florida
(<http://creatures.ifas.ufl.edu>)



Figura 3. Hembra de la especie *Bactrocera cucurbitae*.
Fotografía procedente de la página web de la Universidad de Florida
(<http://creatures.ifas.ufl.edu>)

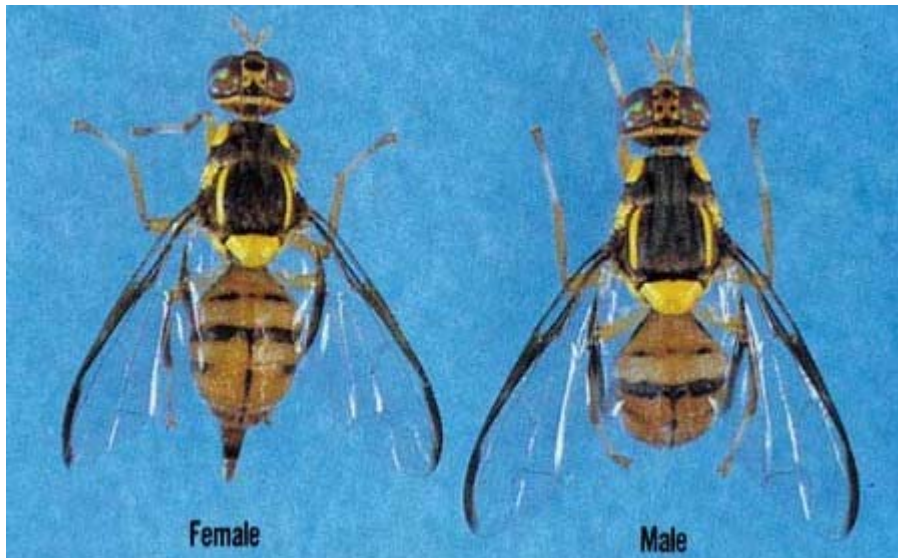


Figura 4. Hembra (a la izquierda) y macho (a la derecha) de la especie *Bactrocera dorsalis*.
Fotografía procedente de la página web de la Universidad de Florida
(<http://creatures.ifas.ufl.edu>)



Figura 5. Hembra de la especie *Bactrocera latifrons*.
Fotografía procedente de la página web de la Universidad de Florida
(<http://creatures.ifas.ufl.edu>)



Figura 6. Machos de las especies *Bactrocera tryoni*
(izquierda) y *Bactrocera neohumeralis* (derecha).
Fotografía procedente de la página web de la Universidad de Sydney
(<http://www.bio.usyd.edu.au/fruitfly>)



Figura 7. Hembras de las especies *Bactrocera zonata* (izquierda) y *Dacus ciliatus* (derecha).
Fotografía procedente de la página web del Museo de Historia Natural de Londres
(<http://www.iaea.or.at>)



Figura 8. Hembra de la especie *Ceratitis capitata*.
Fotografía procedente de la página web de la Universidad de Florida
(<http://creatures.ifas.ufl.edu>)



Figura 9. Hembra de la especie *Neoceratitis cyanescens*.
Fotografía procedente de la página web del Cirad francés
(<http://www.cirad.fr>)



Figura 10. Hembra de la especie *Rhagoletis cerasi*.
Fotografía procedente de la página web del HYPPZ francés
(<http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ>)



Figura 11. Hembra de la especie *Bactrocera oleae*.
Fotografía procedente de la página web de la Universidad de Florida
(<http://creatures.ifas.ufl.edu>)



Figura 12. Macho de la especie *Bactrocera oleae*.
Fotografía procedente de la página web de la Universidad de Florida
(<http://creatures.ifas.ufl.edu>)



Figura 13. Aceituna con el orificio producido por la salida de una larva de la especie *Bactrocera oleae*.



Figura 14. Vista del interior de una aceituna infestada.

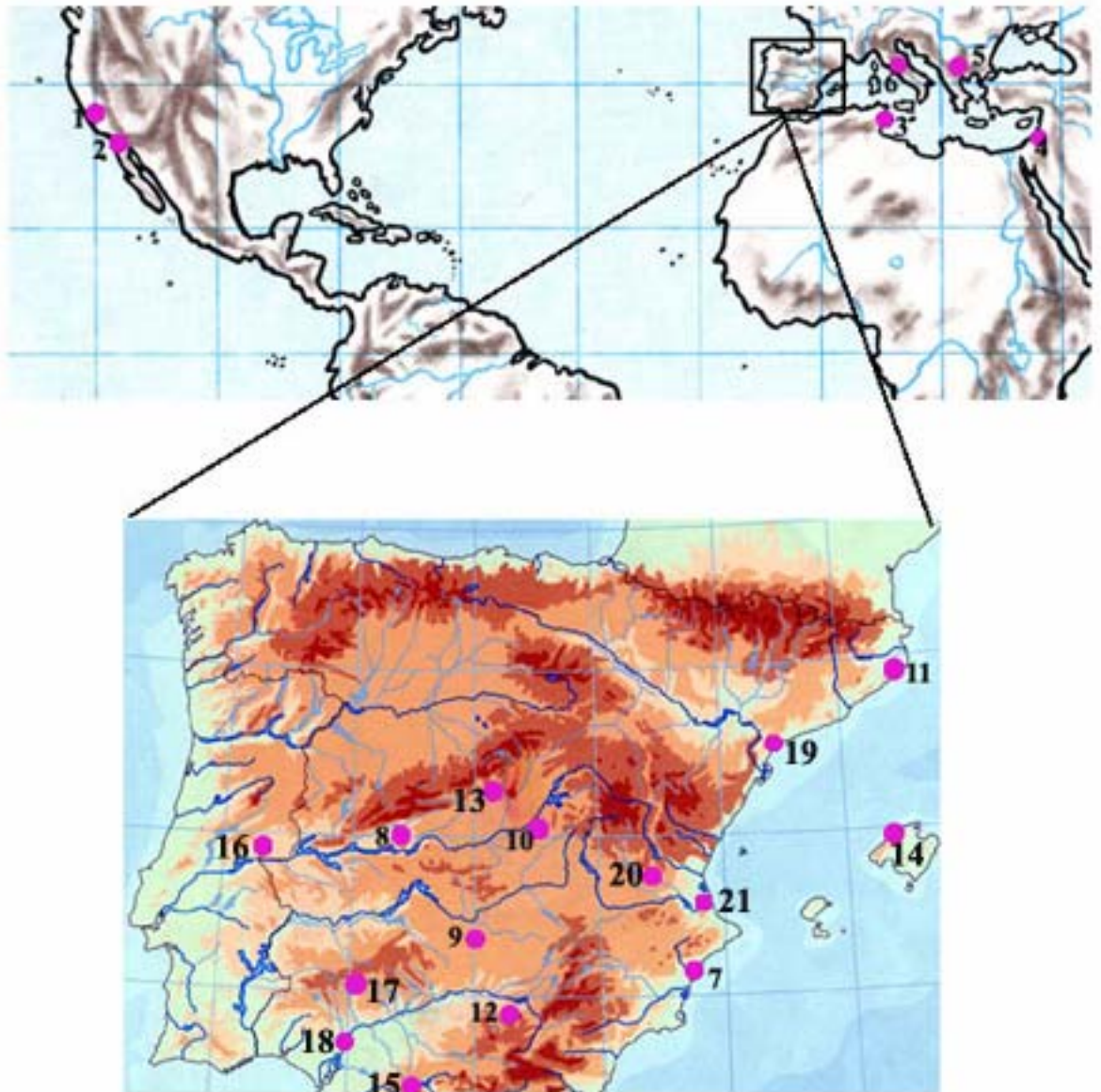


Figura 15. Situación de las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* estudiadas.

Los números corresponden a las siguientes poblaciones:

- | | | |
|--------|--------|---------|
| 1-USA1 | 8-Cac | 15-Mlg |
| 2-USA2 | 9-Ciu | 16-Por |
| 3-Tun | 10-Cue | 17-Sev1 |
| 4-Isr | 11-Ger | 18-Sev2 |
| 5-Gre | 12-Jae | 19-Tar |
| 6-Ita | 13-Mad | 20-Val1 |
| 7-Ali | 14-Mal | 21-Val2 |

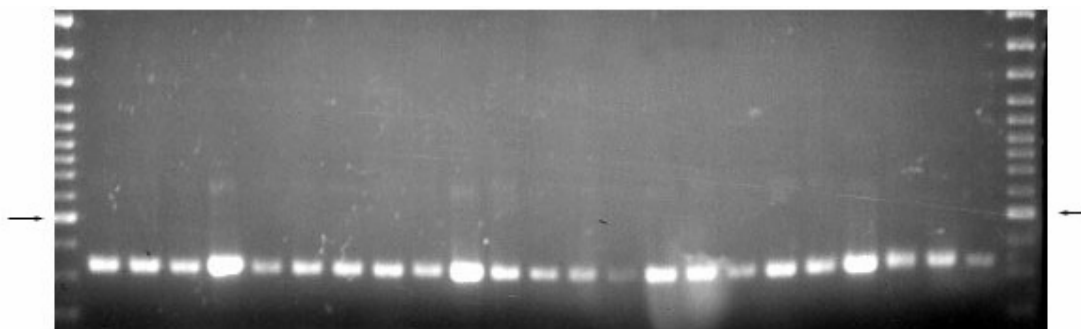


Figura 16. Productos de amplificación de la secuencia de mtDNA de cada una de las especies estudiadas. Carriles 1 y 25: Marcador escalera de peso molecular de 100 pb; las flechas indican la banda de 500pb. Carriles 2 a 24: *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha serpentina*, *Anastrepha striata*, *Anastrepha suspensa*, *Bactrocera cacuminata*, *Bactrocera cucurbitae*, *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera ludens*, *Bactrocera neohumeralis*, *Bactrocera oleae*, *Bactrocera tryoni*, *Bactrocera zonata*, *Ceratitis capitata*, *Caeratitis cosyra*, *Ceratitis rosa* (Cr y Cf), *Dacus ciliatus*, *Dacus demmerezi*, *Neoceratitis cyanescens*, *Rhagoletis cerasi*, *Rhagoletis pomonella* y *Toxotrypana curvicauda*.

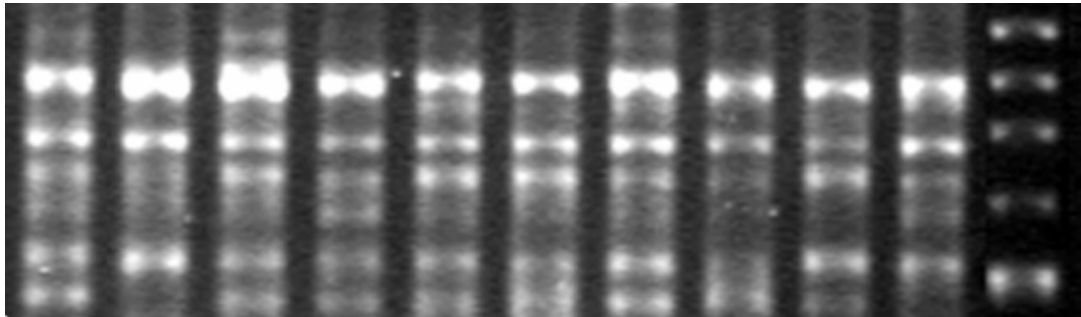
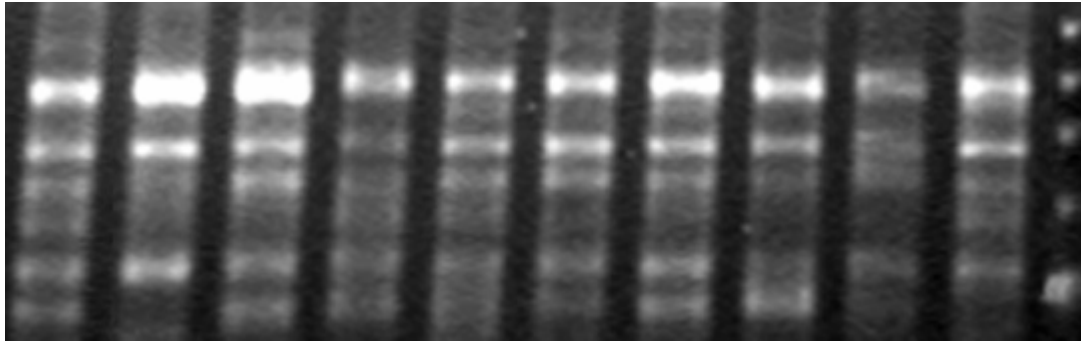


Figura 17. Ejemplo de reproducibilidad. Patrón de RAPD de la población de Málaga empleando el cebador OPC18. Imágenes resultantes de dos reacciones de amplificación diferentes visualizadas en dos geles de agarosa distintos.

Posición	1				50
Al	-AGAAGATCC	TTATGTACTA	GTTGGACAAA	TTTTAACAGT	AGTTTACTTC
Ao	-.....C..G..	.A.....
As	-.....C..C.....
Asp	-.....C..T..T
Ast	-.....C..	...C...C..T
Bca	-.....A..T..	..A.....	.C.....T..	.A.....
Bc	-.....	G..C..C..	..A..G...TA.	TA.C.....
Bdh	-.....T..	..A.....	.C.....T.C	.A.....
Bdm	-.....A..T..	..A.....	.C.....T..	.A.....
Bl	-.....G..A.....	.C.....TA.	TA.....T..
Bnh	-.....A..T..	..A..T...	.C.....T..	.A.C.....
Bnm	-.....A..T..	..A..T...	.C.....T..	.A.C.....
Bo	-.....A..	...C..T..	..A.....	.CC.....TA.	CA.....T..T
Bt1	-.....A..T..	..A..T...	.C.....T..	.A.C.....
Bt2	-.....A..T..	..A..T...	.C.....T..	.A.C.....
Bz	-.....A..T..	..A..T...	.C.....T..T..
Cc	-T.....A..TT..	ACA..T...A.....T..T
Ccs1	-T.....A..TT..	AC...C...A.....
Ccs2	-T.....A..TT..	AC...C...A.....
Cfh	-T.....A..TT..	ACA..T...T..
Cfm	-T.....A..	...C..TT..	ACA..T...T..
Crh	-T.....A..	...C..TT..	ACA..TTT..T..
Crm	-T.....A..	...C..TT..	ACA..T...T..
Dc	-.....A..TT..T..	TA.....
Dd	-.....A..T..	..A..T...TA.	TA.C..T..
Nc	-T.....A..T..	..A.....C	.C.....A.	TA.....
Rc1	AGAG.A...T..	..C..T...A.C..T..T
Rc2	AGAG.A...T..	..C.....A.C..T..T
Rp	-....A.C..	...C..T..	..A.....A.....T..T
Tc	T.....A..	...C..T..	A.....T...	T..C.....T
Dy	-T.....A..T..	A.....TA.	TA.....T..T

Figura 18 (posiciones 1 a 50). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes a las 22 especies objeto de estudio y a la especie fuera de grupo *Drosophila yakuba*. En aquellos casos en los que la secuencia de los dos individuos de la misma especie analizados eran idénticas, ésta sólo se representa una vez.

El punto (.) indica que el nucleótido en la posición indicada es el mismo que el de la secuencia de la primera fila; el guión (-) indica que en la posición indicada hay un hueco.

Posición	51					100
Al	TTATACTACA	TTATTAATCC	ACTAATTAAT	AAATGATGAG	ATA----	ATT
Ao	.C.....C...	-----
AsT...C...	-----
AspT..T.G....	-----C.
AstT...C..G....	-----C.
Bca	C.G..T....	.C.....C..	.T..G.A...C.----	.C
Bc	C.T..T..T.C..G....	-----C
Bdh	..G..T....C..	.T..G.A...C.----	...
Bdm	..G..T....C..	.T..G.A...C.----	...
B1	C.C..T..T.G.A...C.----	CC
BnhT..T.C..C..	CT..G.A...C.----	C.
BnmT..T.C..C..	CT..G.A...C.----	C.
BoT..T.C..	.T.....	-----
Bt1T..T.C..C..	CT..G.A...C.----	C.
Bt2T..T.C..C..	CT..G.A...C.----	C.
Bz	C.....T....T..G.A...	-----C.
CcT....	.C..C..C..	.T.....	-----C.
Ccs1T..T.C..	.T.....	-----
Ccs2T..T.C..	.T.....	-----
CfhT..T.	.C.....	...TG....	-----C.
CfmT..T.	.C.....C..	...TG....C.----	C.
CrhT..T.	.C.....C..	...TG....C.----	C.
CrmT..T.	.C.....C..	...TG....C.----	C.
DcT..T.C..C..C	-----
DdT..T.C..C..	TT.....C	-----CC
Nc	C.....T....	.CG....C..	.T.....	-----A.
Rc1T..T.	...A....	...G....	AACT.A.	
Rc2T..T.	...A....	...G....	AACT.A.	
RpT..T.A.....	-----C.
Tc	A.....T..T.	-----
DyT..TT	.A.....C..	...G...CA	-----

Figura 18 (continuación; posiciones 51 a 100). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes a las 22 especies objeto de estudio y a la especie fuera de grupo *Drosophila yakuba*. En aquellos casos en los que la secuencia de los dos individuos de la misma especie analizados eran idénticas, ésta sólo se representa una vez.

El punto (.) indica que el nucleótido en la posición indicada es el mismo que el de la secuencia de la primera fila; el guión (-) indica que en la posición indicada hay un hueco.

Posición	101			150
A1	TAATTAATTA	-----	GTTAATGAGC	TTGAACA--A GCATATGTTT
Ao	-----T.--.....
AsC..	-------.....
Asp	-----T.--.....
Ast	AC--TAATTAT.--.....
Bca	-------.....
BcC..C..	-----T.--.....
Bdh	-------..G.....
Bdm	-------..G.....
Bl	-----T.--.....
Bnh	-------..G.....
Bnm	-------..G.....
Bo	-----	..C.....--..CG.....
Bt1	-------..G.....
Bt2	-------..G.....
Bz	-----	..C.....--..G.....
CcC..	-----	..C.....T.--.....
Ccs1	-------.....
Ccs2	-----T.--.....
CfhC..	-----T.--.....
CfmC..	-----T.--.....
CrhC..	-----T.--.....
CrnC..	-----T.--.....
DcC..	-----T.--.....
Dd	..C.....C..	-------.....
Nc	A---TTATTAT.--.....
Rc1	AAATTAACTAA.--.....
Rc2	AAATTAACTAA.--.....
Rp	AACTTAATAACA.TA.....
Tc	...C.T....	AA--TAA---T.--.....
Dy	..T.A.....	AT--TAATTA-C-A..G.....

Figura 18 (continuación; posiciones 101 a 150). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes al fragmento de mtDNA analizado en las 22 especies objeto de estudio y a la especie fuera de grupo *Drosophila yakuba*. En aquellos casos en los que la secuencia de los dos individuos de la misma especie analizados eran idénticas, ésta sólo se representa una vez. El punto (.) indica que el nucleótido en la posición indicada es el mismo que el de la secuencia de la primera fila; el guión (-) indica que en la posición indicada hay un hueco.

Posición	151					200
A1	TGAAAACATA	ATATAGGAAC	AAAAATTTCC	TATTAAC'TTT	A----	CTAAA
Ao
As
Asp
Ast
BcaG...A..-	TC..CC..T.G.....
BcG...A..-	TC.....T.G.....	T
BdhG...A..-	TC..CC..T.G.....
BdmG...A..-	TC..CC..T.G.....
B1G...A..A	TC..CC..T.	T..
BnhG...A..-	TC..CC..T.G.....
BnmG...A..-	TC..CC..T.G.....
BoC.	.G...A..-	TT..CC..T.G.....
Bt1G...A..-	TC..CC..T.G.....
Bt2G...A..-	TC..CC..T.G.....
BzG...A..-	TC..CC..T.G.....
CcG...A..-	T...A..T.G.....
Ccs1G...A..-	TC...A..T.
Ccs2G...A..-	TC...A..T.
CfhG...A..-	TT...G..T.
CfmG...A..-	TT...G..T.
CrhG...A..-	TT...G..T.
CrmG...A..-	TT...G..T.
DcG...A..-	TC..CC..T.A	--TA	...T
DdG...A..-	TC..CC..T.	ATTA	...T
NcG...A..-A..T.
Rc1G...AA..-	TT.....TT
Rc2G...AA..-	TT.....TT
RpG...A..-	TTC.....T.
TcA..T	.T.--.T.
DyG...A.T-	TT...-.T.	T--TA

Figura 18 (continuación; posiciones 151 a 200). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes al fragmento de mtDNA analizado en las 22 especies objeto de estudio y a la especie fuera de grupo *Drosophila yakuba*. En aquellos casos en los que la secuencia de los dos individuos de la misma especie analizados eran idénticas, ésta sólo se representa una vez.

El punto (.) indica que el nucleótido en la posición indicada es el mismo que el de la secuencia de la primera fila; el guión (-) indica que en la posición indicada hay un hueco.

Posición	201					250
A1	ATCAATTAAC	AATATATAAT	ATATTAAAAA	TAATTTAACT	CCAATAAAAA	
Ao	
As	
Asp	...T.....	..C.....T..	...C...T.	
AstA...	.C..C..T..T.	
Bca	T.TT.....	C.C.....	.A..C..C.T	...C..T.ACT..	
Bc	T.TT.....	C.C..G...C	.A.....T..A.T..	
Bdh	T.TT.....	C.C.....	.A..C..C.T	...C..T.ACT..	
Bdm	T.TT.....	C.C.....	.A..C..C.T	...C..T.ACT..	
Bl	T.TT.....	C.C.....	.A..C..C..	..G...T.G.T..	
Bnh	T.TT.....	C.C.....	.A..C..T..	..G...T.ACT..	
Bnm	T.TT.....	C.C.....	.G..C..T..	..G...T.ACT..	
Bo	TAA.....	C.....	.A..C..C..ACT.C..	
Bt1	T.TT.....	C.C.....	.A..C..T..	..G...T.ACT..	
Bt2	T.TT.....	C.C.....	.G..C..T..	..G...T.ACT..	
Bz	TAAT.....	C.C.....	.A..C..C..	...C..T.ACT..	
Cc	..T.....	C.C.....C	TA..A.TT..AA	
Ccs1	.AA.....	C.C.....C	TA..A.TT..AA	
Ccs2	.AA.....	C.C.....C	TA..A.TT..AA	
Cfh	T.T.....	C.C.....TC	TA..A.CT..A.	
Cfm	T.T.....	C.C.....TC	TA..A.CT..A.	
Crh	T.T.....	C.C.....TC	TA..A.CT..A.	
Crn	T.T.....	C.C.....TC	TA..A.CT..A.	
Dc	T.TT.....	C.....	.A.CC..T..AAT..	
Dd	T.TT.....	C.C.....	TA.AC..T.GA.T..	
Nc	..T...C...	C.C...A..C	TA..A.GT..G.AA	
Rc1	.AA.....	..C..TA...	TA.....T..A.T....	
Rc2	.AA.....	..C..TA...	TA.....T..A.T....	
Rp	T.T.....	C.C..TA...	.A.....T..C.AA	
Tc	..T.....A..A..T..	C.....A	
Dy	.AA....C..	...A.A..G	.A.A...T..	A.T....AC	

Figura 18 (continuación; posiciones 201 a 250). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes al fragmento de mtDNA analizado en las 22 especies objeto de estudio y a la especie fuera de grupo *Drosophila yakuba*. En aquellos casos en los que la secuencia de los dos individuos de la misma especie analizados eran idénticas, ésta sólo se representa una vez. El punto (.) indica que el nucleótido en la posición indicada es el mismo que el de la secuencia de la primera fila; el guión (-) indica que en la posición indicada hay un hueco.

Posición	251					300
Al	ATAATAAATA	ATTTAAAGAA	AAAGGTAAAA	AACACTTTCA	AGCTAAATAT	
Ao
As
AspC..T..C...C
AstC..T..	..T.....
BcaA.T..T.....C
BcA.T..T.....C.....
BdhA.	G.....T..T.....
BdmA.	G.....T..T.....
B1A.T..	..C.....T.....
BnhA.T..T.....
BnmA.T..T.....
Bo	..C...A.T..T.....
Bt1A.T..T.....C
Bt2A.T..T.....
BzA.	..C..T..T.....C
CcT..TT.....	T..C.....
Ccs1T..TT.....
Ccs2T..TT.....
CfhT..TT.....	T.....
CfmT..TT.....	T.....
CrhT..TT.....	T.....
CrmT..TT.....	T.....
Dc	..C...A.C..	..C.....	..T.TT.....	C.....
Dd	.C.....A.C..	..T.....TT.....
NcT..TT..C..	..C.....
Rc1	.C.....T.....	..C.....
Rc2	.C.....	G.....T.....	..C.....
RpC..T..T.....
TcT.....T.....
DyT.A.....T.....

Figura 18 (continuación; posiciones 251 a 300). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes al fragmento de mtDNA analizado en las 22 especies objeto de estudio y a la especie fuera de grupo *Drosophila yakuba*. En aquellos casos en los que la secuencia de los dos individuos de la misma especie analizados eran idénticas, ésta sólo se representa una vez. El punto (.) indica que el nucleótido en la posición indicada es el mismo que el de la secuencia de la primera fila; el guión (-) indica que en la posición indicada hay un hueco.

Posición	301	308
A1	ATTAATTT	
Ao	
As	
Asp	..C.....	
Ast	
Bca	
Bc	
Bdh	
Bdm	
B1	..A.G...	
Bnh	
Bnm	
Bo	..C.....	
Bt1	
Bt2	
BzG...	
Cc	
Ccs1T	
Ccs2	
Cfh	
Cfm	
Crh	
Crm	
Dc	
Dd	
Nc	
Rc1	..C.....	
Rc2	..C.....	
Rp	
Tc	
Dy	

Figura 18 (continuación; posiciones 301 a 308). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes al fragmento de mtDNA analizado en las 22 especies objeto de estudio y a la especie fuera de grupo *Drosophila yakuba*. En aquellos casos en los que la secuencia de los dos individuos de la misma especie analizados eran idénticas, ésta sólo se representa una vez. El punto (.) indica que el nucleótido en la posición indicada es el mismo que el de la secuencia de la primera fila; el guión (-) indica que en la posición indicada hay un hueco.

Posición	... 345	378
Al	EDPYVLVGQILTVVYFLYYIINPLINKKWDNLIN-	
Ao	EDPYVLVGQILTVIYFSYYIINPLINKKWDNLIN-	
As	EDPYVLVGQILTVVYFLYYIINPLINKKWDNLIN-	
Asp	EDPYVLVGQILTVVYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Ast	EDPYVLVGQILTVVYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Bca	EEPYVLVGQILTVIYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Bc	EDPYVLVGQILTIIYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Bdm	EEPYVLVGQILTVIYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Bdh	EDPYVLVGQILTAIYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
B1	EEPYVLVGQILTIIYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Bnm	EEPYVLVGQILTVIYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Bnh	EEPYVLVGQILTVIYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Bo	EEPYVLVGQILTIIYFLYYIINPLINKKWDNLIN-	
Bt1	EEPYVLVGQILTVIYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Bt2	EEPYVLVGQILTVIYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Bz	EEPYVLVGQILTVVYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Cc	EEPYVLTGQILTVIYFLYYIINPLINKKWDNLIN-	
Ccs1	EEPYVLTGQILTVIYFLYYIINPLINKKWDNLIN-	
Ccs2	EEPYVLTGQILTVIYFLYYIINPLINKKWDNLIN-	
Cfh	EEPYVLTGQILTVVYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Cfm	EEPYVLTGQILTVVYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Crh	EEPYVLTGQILTVVYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Crm	EEPYVLTGLILTVVYFLYYIINPLVNKKWDNLIN-	
Dc	EEPYVLVGQILTVIYFLYYIINPLINKKWDNLIN-	
Dd	EEPYVLVGQILTIIYFLYYIINPLINKKWDNLIN-	
Nc	EEPYVLVGQLLTIYFLYYIVNPLINKKWDKLIN-	
Rc1	SNPYVLVGQILTVIYFLYYIMNPLVNKKWDKLINL	
Rc2	SNPYVLVGQILTVIYFLYYIMNPLVNKKWDKLINL	
Rp	ENPYVLVGQILTVIYFLYYIINPMINKKWDNLIN-	
Tc	EEPYVLIGQILTVVYFMYIINPLINKKWDNLTY-	
Dy	EEPYVLIGQILTIIYFLYYLINPLVTKKWDNLINL-	

Figura 19. Secuencias de aminoácidos correspondientes al fragmento analizado de Cytb alineadas en las 22 especies estudiadas y en la especie fuera de grupo *Drosophila yakuba*. En la primera fila se indica la posición que ocupa el aminoácido respecto a la secuencia de esta proteína en *Drosophila yakuba*.

	Posición	...281	324
Al		KLMYLAWKCFLPFSLNYLLFFIGVKLFLMYYMLLIDFSKVN	SKF-
Ao		KLMYLAWKCFLPFSLNYLLFFIGVKLFLMYYMLLIDFSKVN	SKF-
As		KLMYLAWKCFLPFSLNYLLFFIGVKLFLMYYMLLIDFSKVN	SKF-
Asp		KLMYLAWKCFLPFSLNYLLFFIGIKLLLMYMMLMDFSKVN	SKF-
Ast		KLMYLAWKCFLPFSLNYLLFFIGIKLLLMYFMLLIDFSKVN	SKF-
Bca		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGLKLMLIYYMWLMKFSKVN	SKV-
Bc		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGFKLLLICYMWLMKISKVN	SKF-
Bdh		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGLKLMLIYYMWLMKFSKVN	SKV-
Bdm		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGLKLMLIYYMWLMKFSKVN	SKV-
B1		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGLKLMLIYYMWLMKLSKVN	SKV-
Bnm		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGLKLMLIYYMWLMKFSKVN	SKV-
Bnh		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGLKLMLIYYMWLMKFSKVN	SKV-
Bo		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLVIGFKLLIYYMWLILFSKVN	SKV-
Bt1		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGLKLMLIYYMWLMKFSKVN	SKV-
Bt2		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGLKLMLIYYMWLMKFSKVN	SKV-
Bz		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGLKLMLIYYMWLMKFSKVN	SKV-
Cc		KLMYLAWKSFLPFSLNYLLFFIGFKLLIISYMWLINF	SKVNSNF-
Ccs1		KLMYLAWKSFLPFSLNYLLFFIGFKLLIISYMWLIFF	SKVNSNF-
Ccs2		KLKYLAWKSFLPFSLNYLLFFIGFKLLIISYMWLIFF	SKVNSNF-
Cfh		KLMYLAWKSFLPFSLNYLLFFIGFKLLVISYMWLIKFSKVN	SNF-
Cfm		KLMYLAWKSFLPFSLNYLLFFIGFKLLVISYMWLIKFSKVN	SNF-
Crh		KLMYLAWKSFLPFSLNYLLFFIGFKLLVISYMWLIKFSKVN	SNF-
Crm		KLMYLAWKSFLPFSLNYLLFFIGFKLLVISYMWLIKFSKVN	SNF-
Dc		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGFKLLLVYYMWLMKISKLMESL	
Dd		KLMYLAWKSFLPFSLNFFLLFIIGFKLLLVNYMWLMKISN--SKGW	
Nc		KLMYLAWKSFLPFSLNYLLFFIGFKLLIISFMWLINF	SKVNSNF-
Rc1		KLMYLAWKCFLPFSLNYLLFLIGFKLLLINLMLLIFFSKVN	NKKF-
Rc2		KLMYLAWKCFLPSSLNYYLLFLIGFKLLLINLMLLIFFSKVN	NKKF-
Rp		KLMYLAWKCFLPFSLNYLLFFIGLKLMLIYLMWLIFSKVN	SKL-
Tc		KLMYLAWKCFLPFSLNYLLFFIGVKLLFIYYMLLINF	SKVNSNY-
Dy		KLMYLAWKCFLSFLSNYYLLFFIGFKILLFSLLWIFFSKKLMEN-	

Figura 20. Secuencias de aminoácidos correspondientes al fragmento analizado de ND1 alineadas en las 22 especies estudiadas y en la especie fuera de grupo *Drosophila yakuba*. En la primera fila se indica la posición que ocupa el aminoácido respecto a la secuencia de esta proteína en *Drosophila yakuba*.

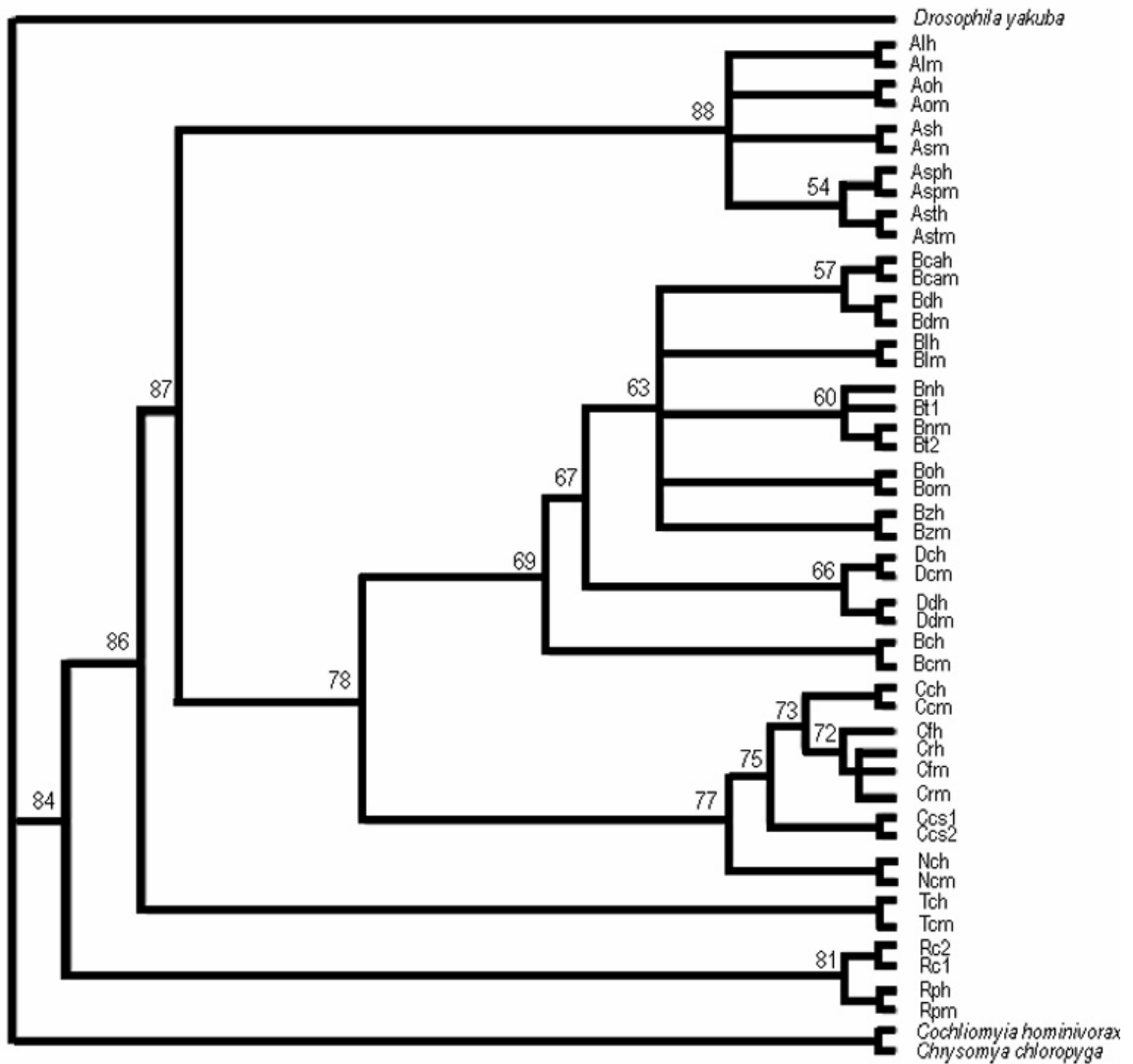


Figura 21. Árbol consenso (*strict consensus tree*) de los 10 mejores árboles obtenidos por el método de máxima parsimonia. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap*. La nomenclatura utilizada para designar las especies se muestra en la Tabla 1.

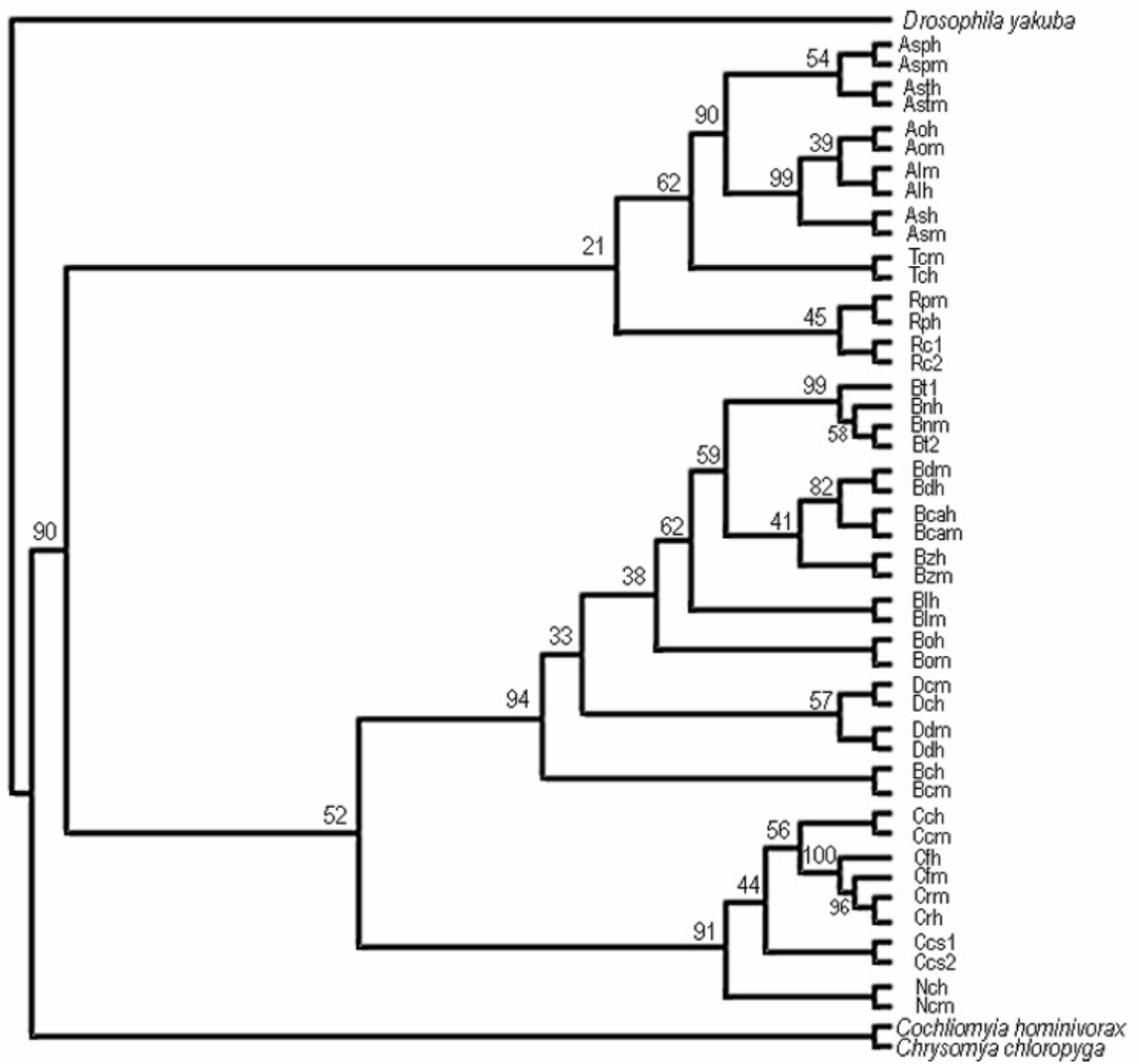


Figura 22. Árbol consenso (*majority rule consensus tree*) de los árboles obtenidos por el método del vecino más próximo. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap*. La nomenclatura utilizada para designar las especies se muestra en la Tabla 1.

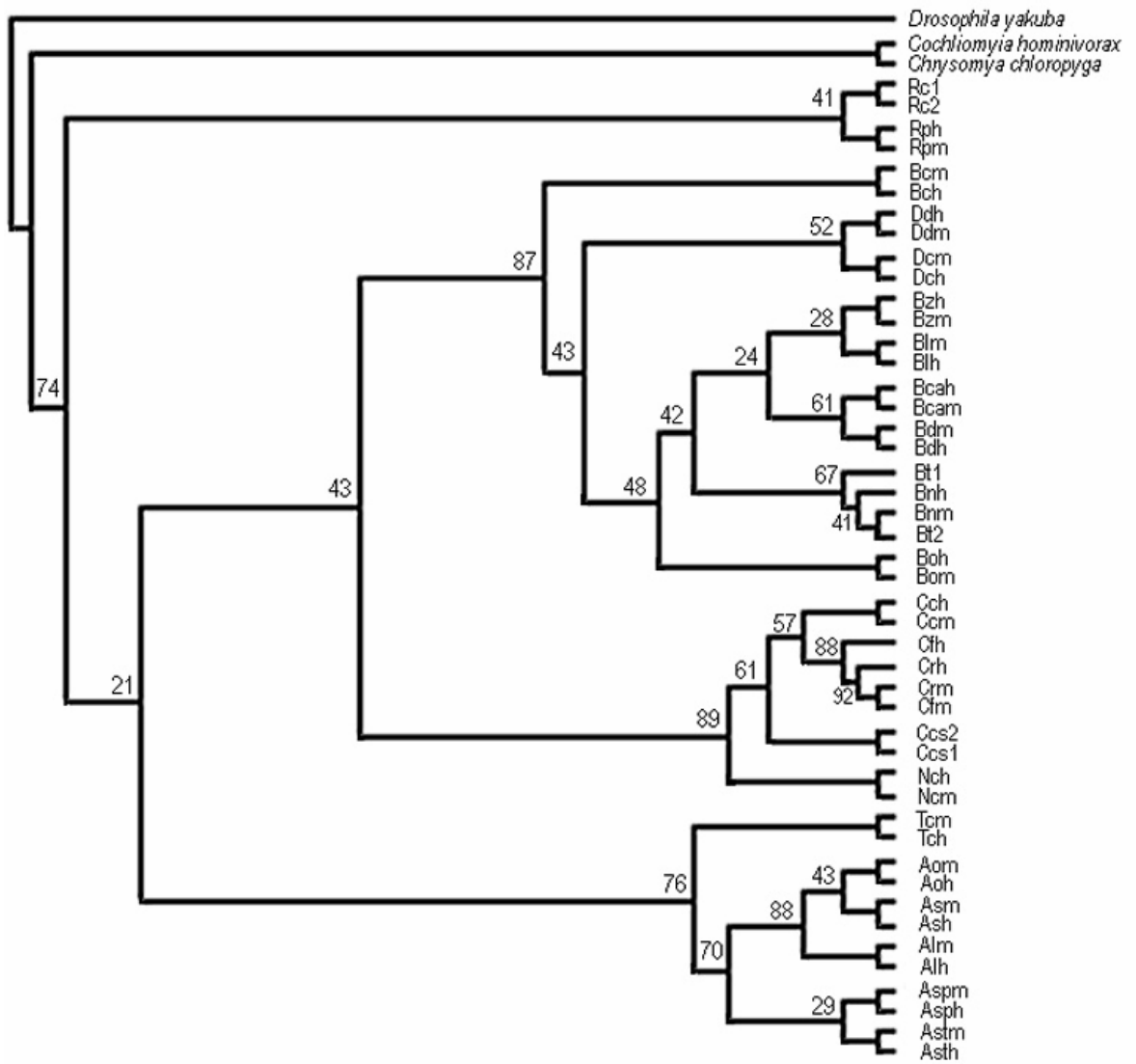


Figura 23. Árbol consenso (*majority rule consensus tree*) de los árboles obtenidos por el método de máxima verosimilitud. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap*. La nomenclatura utilizada para designar las especies se muestra en la Tabla 1.

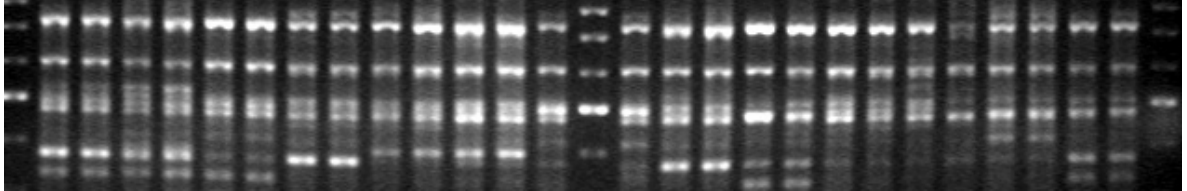


Figura 24. Perfiles de RAPDs obtenidos utilizando el cebador OPA-02 en la especie *Bactrocera oleae*. Marcador escalera de peso molecular de 100 pb; la banda más intensa es la de 500 pb.

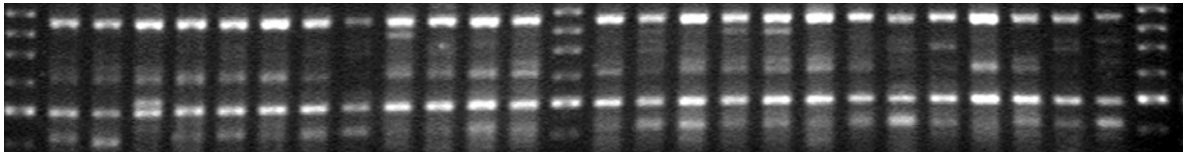


Figura 25. Perfiles de RAPDs obtenidos utilizando el cebador OPA-07 en la especie *Bactrocera oleae*. Marcador escalera de peso molecular de 100 pb; la banda más intensa es la de 500 pb.

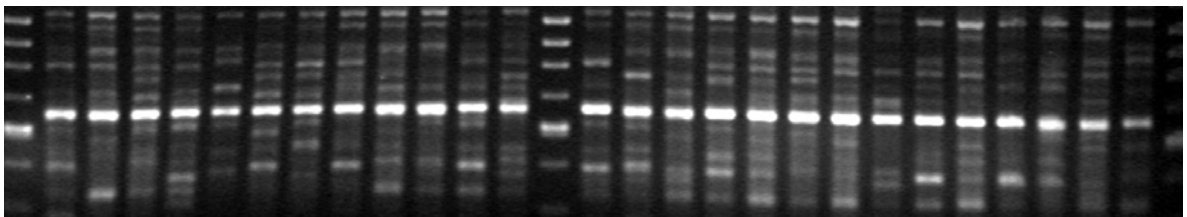
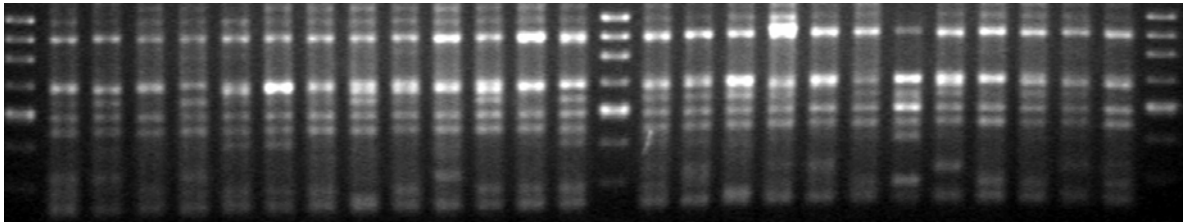


Figura 26. Perfiles de RAPDs obtenidos utilizando el cebador OPA-17 en la especie *Bactrocera oleae*. Marcador escalera de peso molecular de 100 pb; la banda más intensa es la de 500 pb.



Figuras 27. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC-05 en la especie *Bactrocera oleae*. Marcador escalera de peso molecular de 100 pb; la banda más intensa es la de 500 pb.

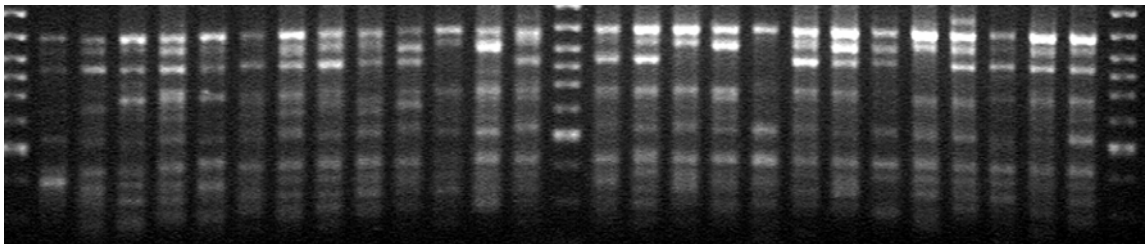


Figura 28. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC-06 en la especie *Bactrocera oleae*. Marcador escalera de peso molecular de 100 pb; la banda más intensa es la de 500 pb.

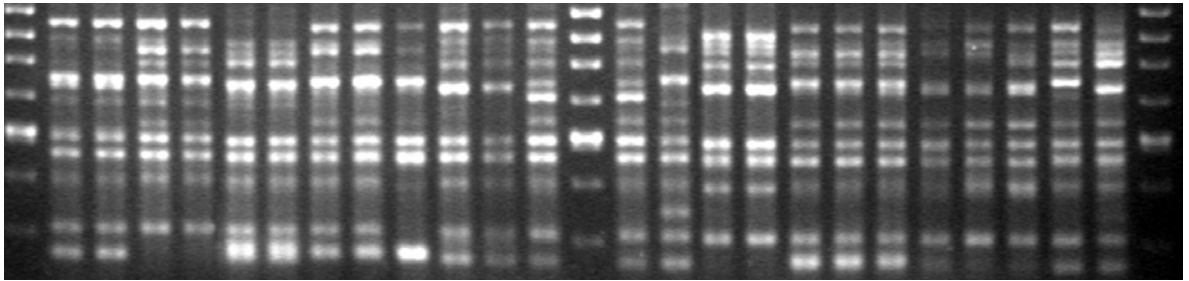


Figura 29. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC-11 en la especie *Bactrocera oleae*. Marcador escalera de peso molecular de 100 pb; la banda más intensa es la de 500 pb.

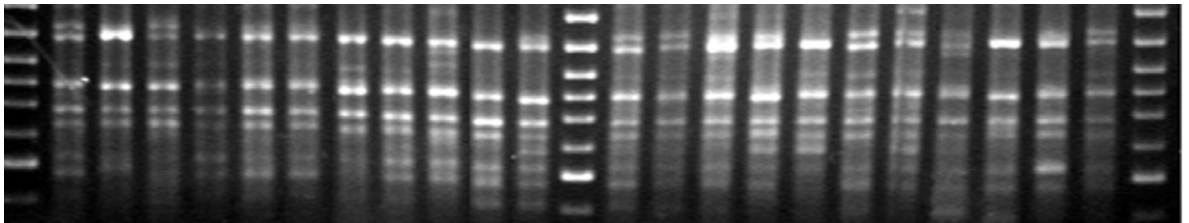


Figura 30. Perfiles de RAPD obtenidos utilizando el cebador OPC-18 en la especie *Bactrocera oleae*. Marcador escalera de peso molecular de 100 pb; la banda más intensa es la de 500 pb.

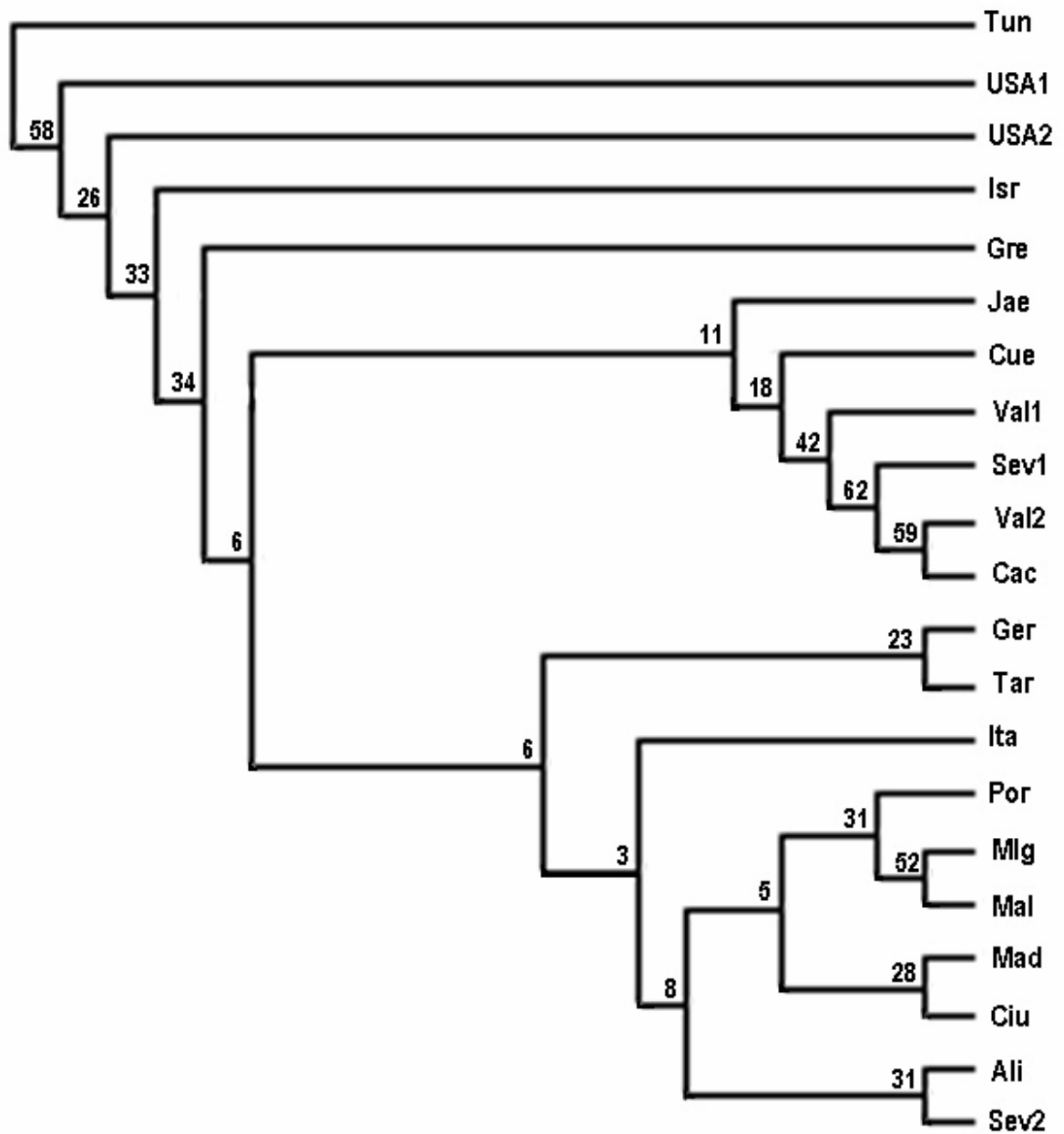


Figura 31. Dendrograma elaborado mediante el método del vecino más próximo a partir de las distancias de Nei entre las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* estudiadas. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap*.

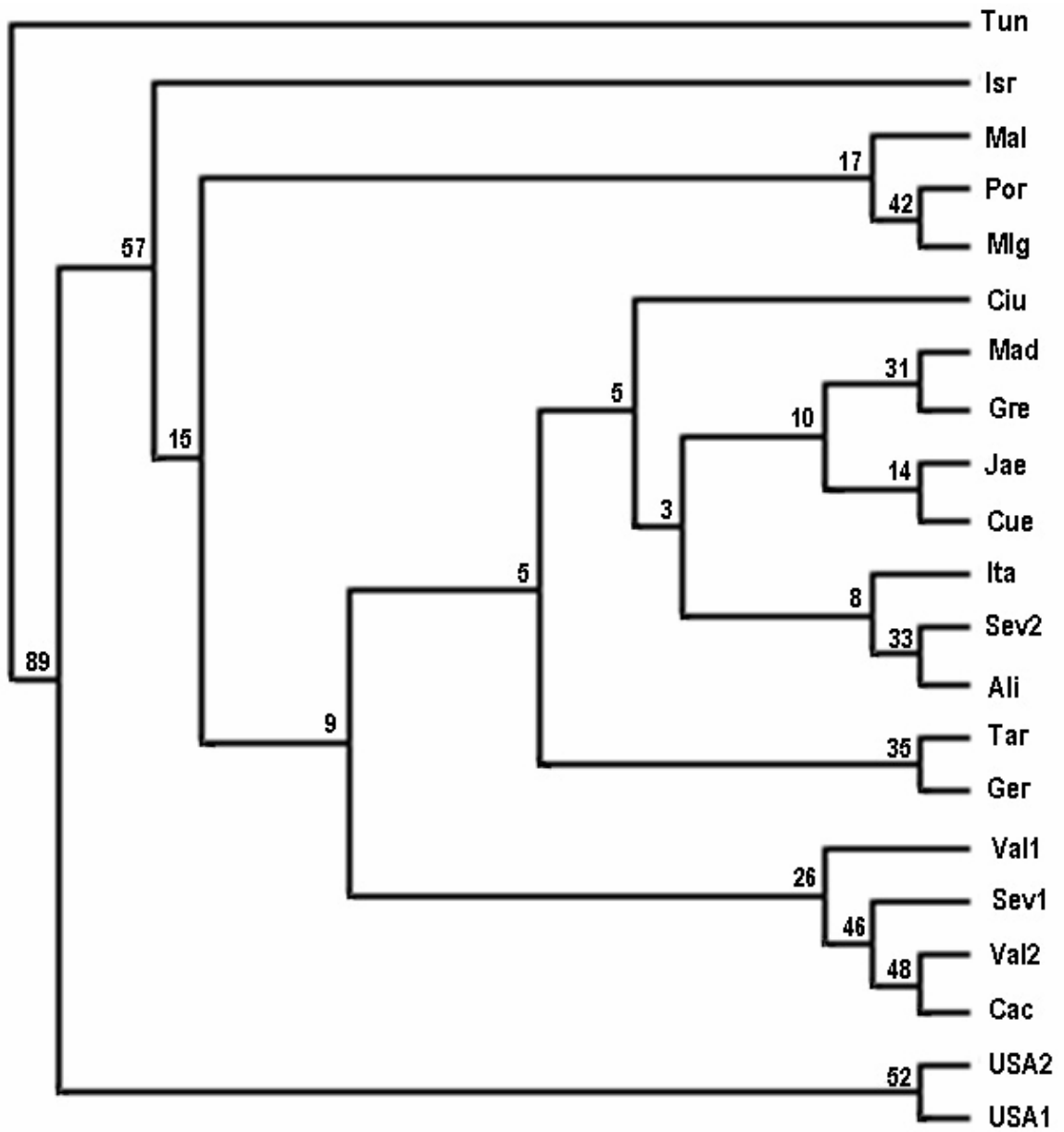


Figura 32. Dendrograma elaborado mediante el método UPGMA a partir de las distancias de Nei entre las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* estudiadas. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap*.

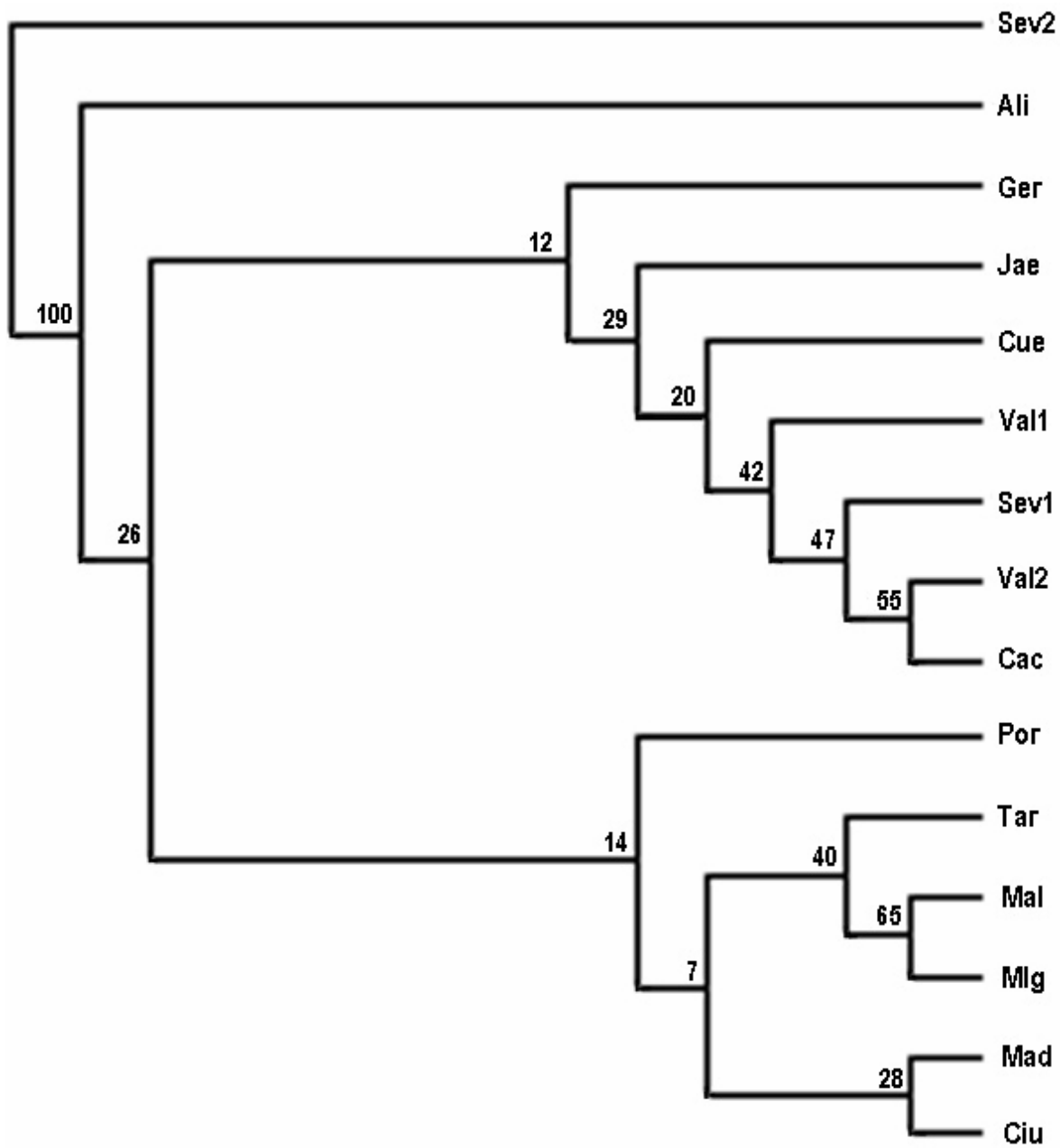


Figura 33. Dendrograma elaborado por el método del vecino más próximo a partir de las distancias de Nei entre las 15 poblaciones de la especie *Bactrocera oleae* procedentes de España y Portugal. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap*.

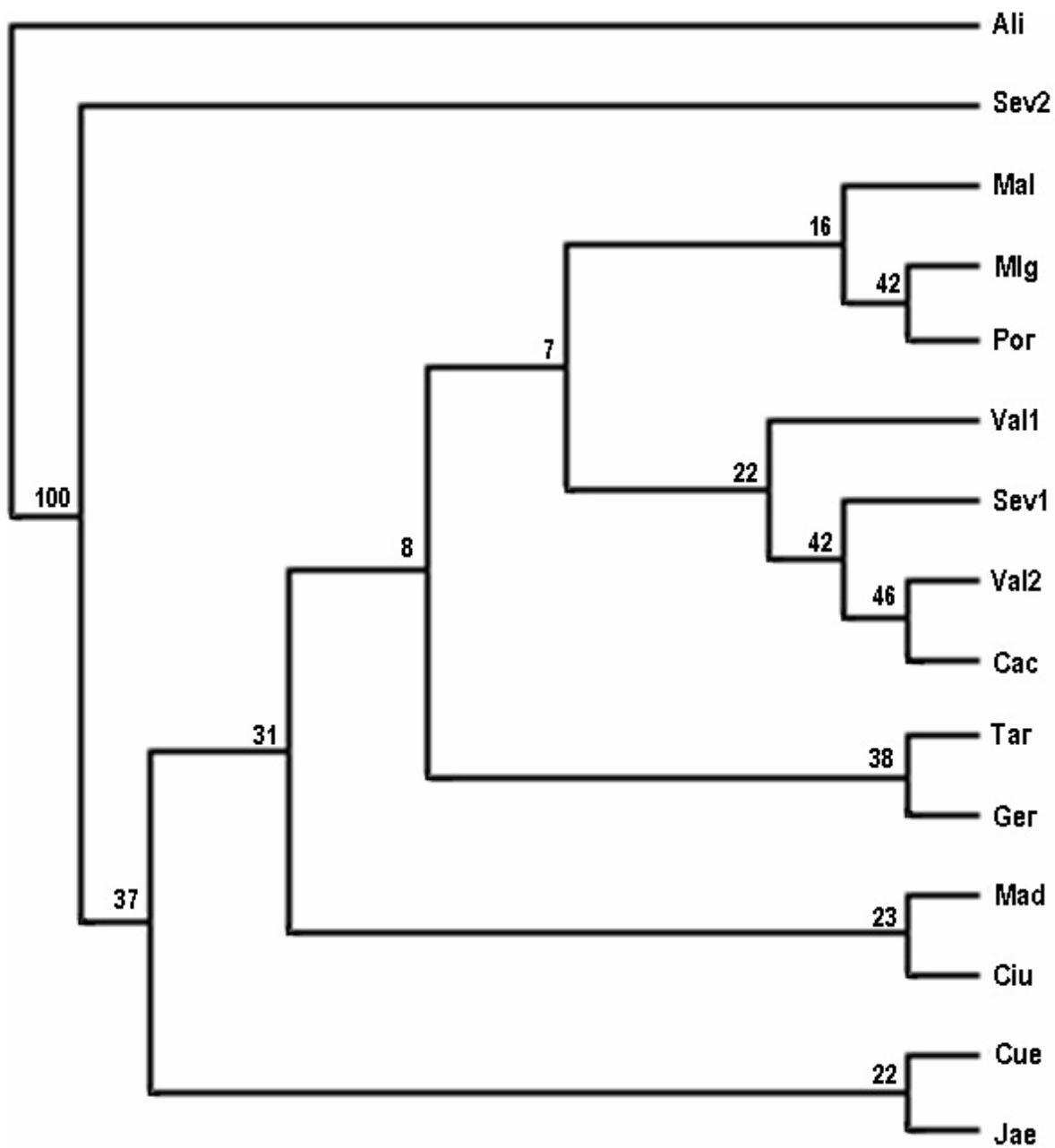


Figura 34. Dendrograma elaborado por el método UPGMA a partir de las distancias de Nei entre las 15 poblaciones de la especie *Bactrocera oleae* procedentes de España y Portugal. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap*.

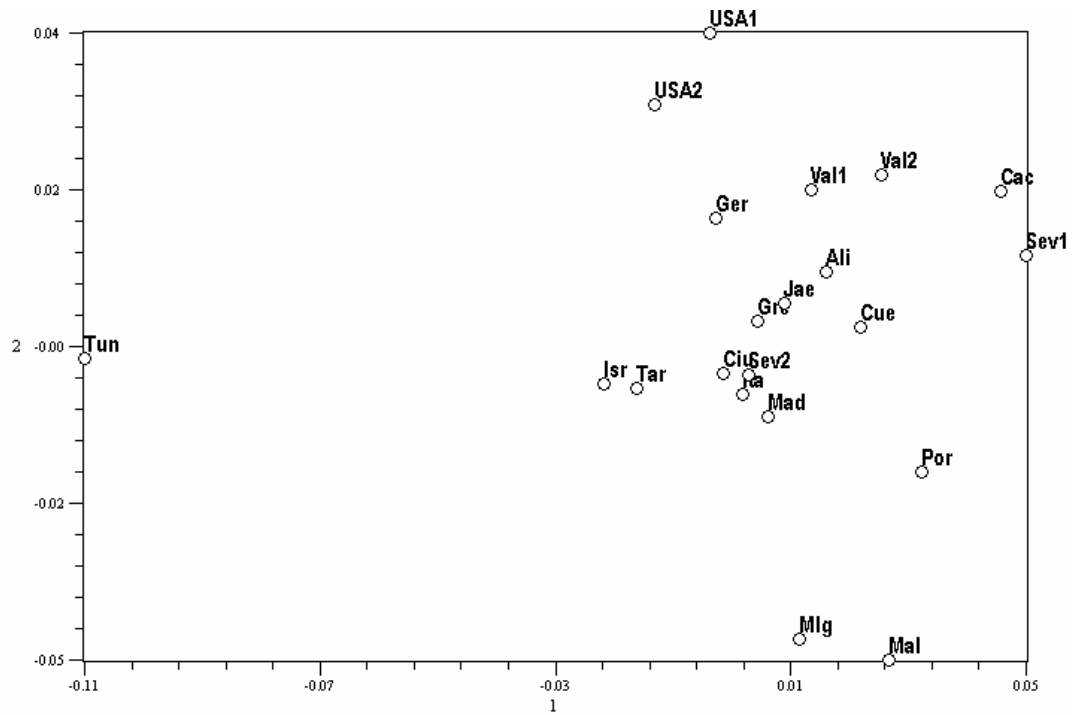


Figura 35 a. Representación gráfica en 2 dimensiones del análisis de coordenadas principales de las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* estudiadas.

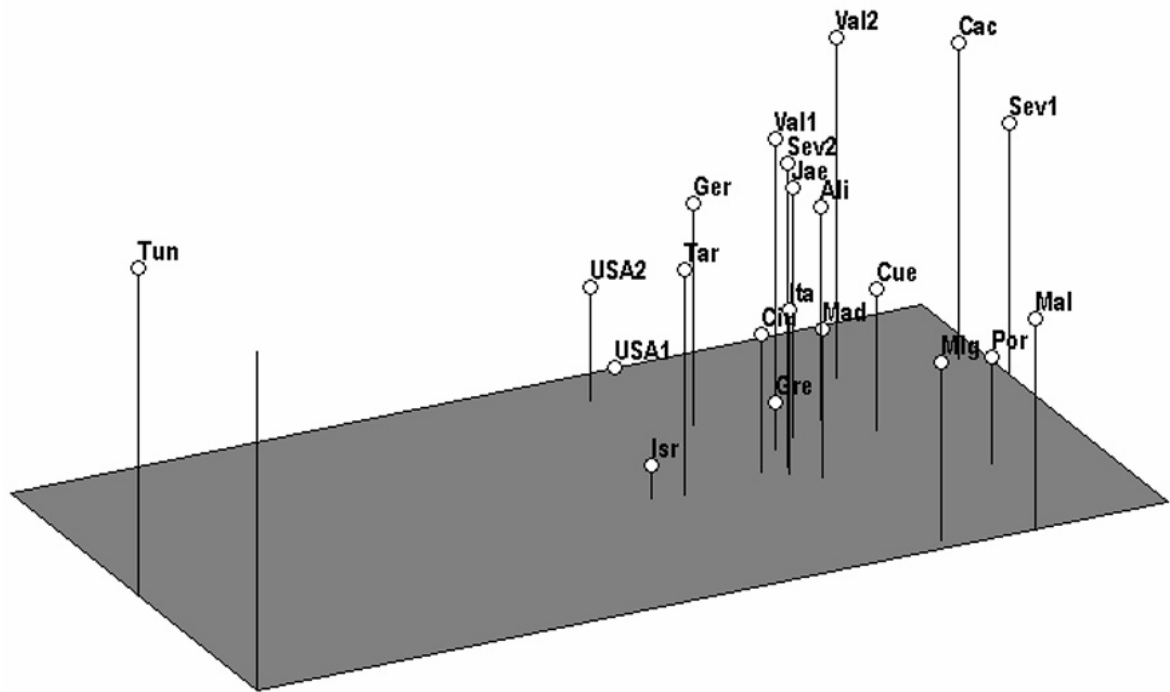


Figura 35 b. Representación gráfica en 3 dimensiones del análisis de coordenadas principales de las 21 poblaciones de *Bactrocera oleae* estudiadas.

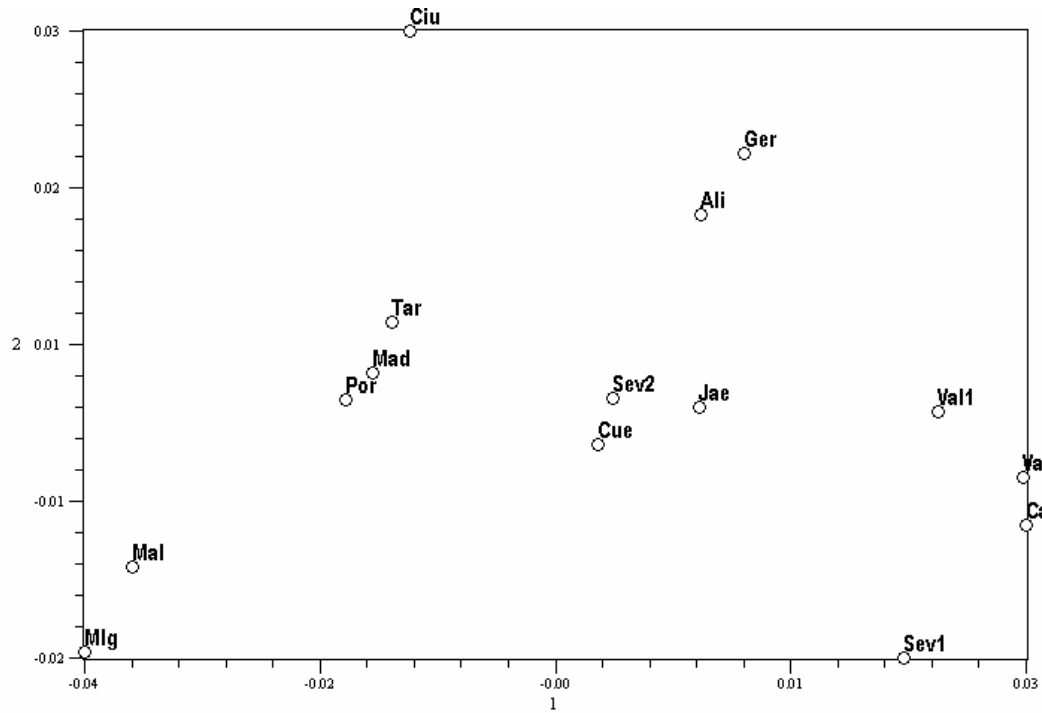


Figura 36 a. Representación gráfica en 2 dimensiones del análisis de coordenadas principales de las 15 poblaciones de *Bactrocera oleae* procedentes de España y Portugal.

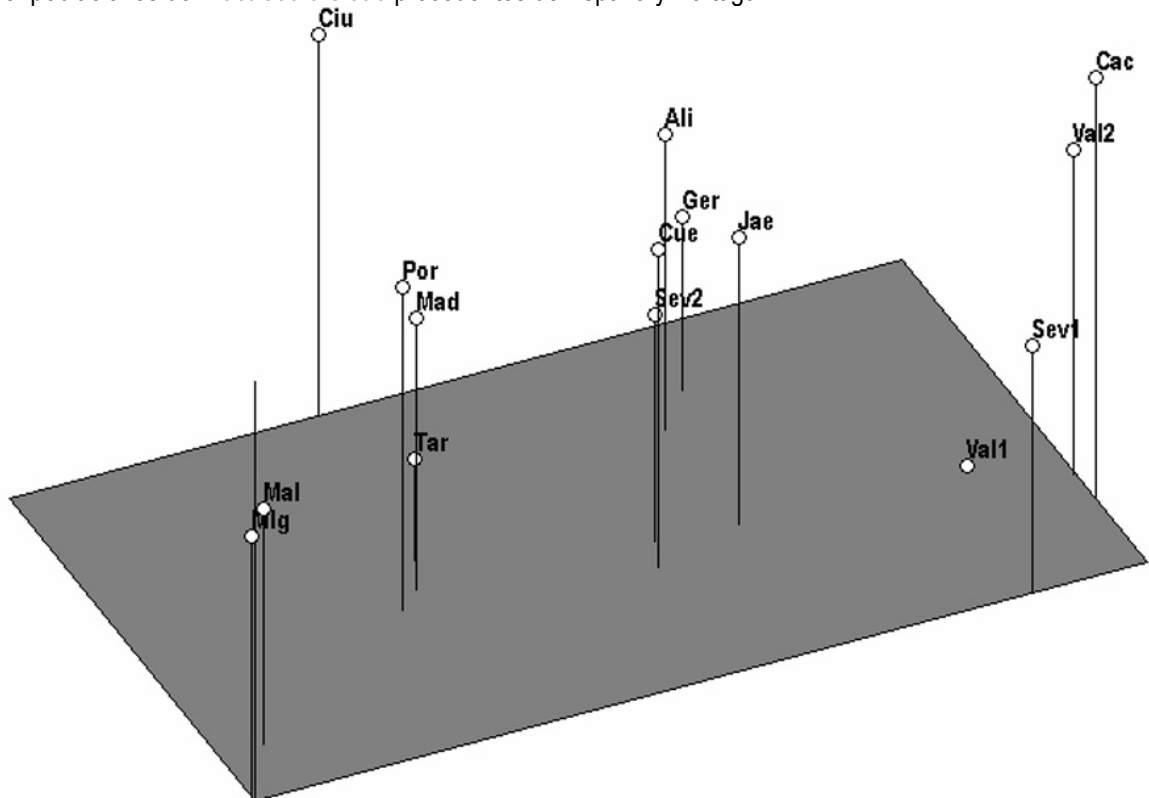


Figura 36 b. Representación gráfica en 3 dimensiones del análisis de coordenadas principales de las 15 poblaciones de *Bactrocera oleae* procedentes de España y Portugal.