

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**VARIABILIDAD ISOENZIMÁTICA DE TRES ESPECIES DE *Diaphania*
(LEPIDOPTERA) EN VENEZUELA.**

Oona S. Delgado
Antonio Díaz (Tutor)

Maracay, Octubre de 2004

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**VARIABILIDAD ISOENZIMÁTICA DE TRES ESPECIES DE *Diaphania*
(LEPIDOPTERA) EN VENEZUELA.**

Oona S. Delgado
Antonio Díaz (Tutor)

Trabajo presentado como parte de los requisitos para optar al título de
Ingeniero Agrónomo Mención Fitotecnia que otorga la
Universidad Central de Venezuela

Maracay, Octubre de 2004

Nosotros los abajo firmantes, miembros del jurado Examinador del Trabajo de Grado titulado VARIABILIDAD ISOENZIMATICA DE TRES ESPECIES DE *Diaphania* (LEPIDOPTERA) EN VENEZUELA, cuyo autor es la bachiller Oona S. Delgado, certificamos que lo hemos leído y que en nuestra opinión reúne las condiciones necesarias de adecuada presentación y es enteramente satisfactorio en alcance y calidad como Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniera Agrónomo Mención Fitotecnia.

Antonio Díaz P.
C.I. 8.614.066
Tutor – Coordinador

Catalina Ramis
C.I. 5.614.038
Jurado Principal

José Clavijo
C.I. 4.566.574
Jurado Principal

Rosalía Velásquez
C.I. 7.199.183
Jurado Suplente

A mi mamá
y
a mi tía Leydda

"El mérito que acepta el silencio como la cosa más natural del mundo es el más alto aplauso."

Emerson

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me dio la fuerza, valentía, corazón e inteligencia suficiente para transitar este camino.

A mi tutor Antonio, por confiar en mí desde el principio y permitirme caminar para aprender.

A José A. Clavijo, por el respaldo y la confianza que me ha brindado en mis triunfos y mis fracasos, sin fallar.

A Catalina Ramis, por sus sugerencias y apoyo en los momentos de locura.

Muy especialmente deseo agradecer al Ing^o Quintín Arias quien me ha acompañado desinteresadamente desde los estresantes días y noches de colecta hasta los momentos de hacer “rayitas”, soportando con mucha paciencia mis malos ratos.

A Flory por toda su confianza y apoyo. A mi familia que siempre me ayudó a alcanzar mis objetivos.

A mis grandes amigos, Alfonso “Saki” (por tu constancia a través de todos estos años), Edith (tu amistad es única y original), Darja, Aymara y Mercedes (mis amigas de siempre, nunca me abandonaron), Silvana, Manuel, Luis Alexander, John Lattke (por su paciencia y solidaridad), Ronald, Carlitos “Chiguirum” (por esos cantos de libertad) y David.

Al personal del MIZA, LGM y CIBA, quienes prestaron sus equipos, materiales e instalaciones para que ejecutara las evaluaciones y procesara los resultados.

A todas las personas del Instituto de Zoología Agrícola que me han ayudado y dado fuerzas, en especial Rosita y Milagros. A Carlos Laucho y Dumas Conde por haber facilitado mi estadía en Rancho Grande como en familia.

A las personas del Instituto de Genética que han colaborado conmigo y me han brindado su amistad, en especial a Arancha, Marilú, Julia y por supuesto Miguel (por su gran ayuda en el laboratorio).

A los que han contribuido de alguna manera con mi crecimiento académico y personal: Marina García, Maria Sheuat, Jesús Viloría y Humberto Moratinos.

RESUMEN

Las plantas de la familia Cucurbitaceae son atacadas por algunos lepidópteros del género *Diaphania*, entre ellos se encuentran *D. hyalinata*, *D. indica* y *D. nitidalis*. *D. hyalinata* y *D. indica* presentan semejanzas morfológicas en estado larval, sin embargo en estado adulto pueden ser diferenciadas por caracteres morfológicos, entre los que se encuentra el órgano anepisternal que sugiere cercanía en sus líneas evolutivas. *D. nitidalis*, no presenta similitud morfológica con *D. hyalinata* ni con *D. indica*. Sin embargo, es reconocida como la plaga de mayor importancia económica y está presente en varias zonas de Venezuela. Las colectas se realizaron en la Estación Biológica “Dr. Alberto Fernández Yépez”, Campo Experimental de Agronomía, Edo. Aragua y el Poblado de San Javier, Edo. Yaracuy. A partir de la adaptación de un protocolo isoenzimático para los lepidópteros del género, con los resultados obtenidos de los loci **Mdh** - 1 y **Got** - 1, se establecieron semejanzas genéticas entre *D. hyalinata*, *D. nitidalis* y *D. indica* y su relación con otras especies del género, revelando que existe un mayor grado de similitud morfológica y genética entre *D. hyalinata* y *D. indica* que con otras especies. Se cuantificó la diversidad genética de algunas especies del género, resultando *D. hyalinata* como la especie con mayor variabilidad genética ($A= 6,5$; $H= 0,72$). Resultó mayor la variabilidad genética dentro de las especies *D. indica*, *D. nitidalis*, *D. euryzonalis*, *D. fumosalis* y *D. oleosalis* que entre ellas ($Gst = 29,8\%$; $1-Gst = 71\%$). No se logró caracterizar la estructura genética de *D. nitidalis* proveniente de tres localidades Venezolanas debido a un polimorfismo estable, planteándose como ventaja adaptativa la hipótesis de alelos letales en la especie. Esta investigación representa el primer estudio molecular del género y es parte de las líneas de investigación del MIZA y CIBA.

PALABRAS CLAVES: *DIAPHANIA*/ LEPIDOPTERA/ ISOENZIMAS/ CUCURBITACEAE/ SEMEJANZAS/ VARIABILIDAD GENÉTICA/ POLIMORFISMO ESTABLE/

ABSTRACT

Plants of the family Cucurbitaceae are attacked by moths of the genus *Diaphania*, amongst them *D. hyalinata*, *D. indica*, and *D. nitidalis*, the last regarded as the most important pest of the three. *D. hyalinata* and *D. indica* present such morphological similarity as larvae that they can not be separated, adults, however, can be differentiated by morphological characters such the anepisternal organ, genitals and male metatibiae, suggesting proximity in their evolutionary lines. *D. nitidalis* is morphologically distinct either from *D. hyalinata* or *D. indica*, and along with other species seems to form a group within the genus. Specimens were collected in the “Dr. Alberto Fernández Yépez” Biological Station, the Experimental Agronomy Fields, both in Aragua State and the town of San Javier, Yaracuy, State.

An allozyme electrophoresis protocol for Lepidoptera of the genus was adapted, and using loci **Mdh** - 1 and **Got**-1, genetic similarity among *D. hyalinata*, *D. nitidalis* and *D. indica* was established as well as their relations with other species of the genus.

A larger grade of morphological and genetic similarity exists among *D. hyalinata* and *D. indica* than with other species. Genetic diversity of some species of the genus was quantified, *D. hyalinata* ranked as the species with most genetic variability ($A= 6,5$; $H= 0,72$). Genetic variability within *D. hyalinata*, *D. indica*, *D. nitidalis*, *D. euryzonalis*, *D. fumosalis*, and *D. oleosalis* was greater than that amongst them ($Gst= 29,8\%$; $1-Gst= 71\%$). It was not possible to characterize the genetic structure of *D. nitidalis* from the three sites due to a stable polymorphism, which could be due to lethal alleles. This investigation represents the first molecular study of the genus and is the result of a research partnership between the MIZA and CIBA.

KEYWORD: *DIAPHANIA* / LEPIDOPTERA / ALLOZYMES / CUCURBITACEAE / LIKENESS / GENETIC VARIABILITY / STABLE POLYMORPHISM /

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características geográficas, climáticas y topográficas de las localidades de colecta del género <i>Diaphania</i>	13
Cuadro 2. Lista de especies colectadas pertenecientes al género <i>Diaphania</i> , número de individuos, sexo, fechas y localidades.	14
Cuadro 3. Especies del género <i>Diaphania</i> utilizadas para ajustar el protocolo electroforético.....	15
Cuadro 4. Soluciones extractoras evaluadas para ajustar el protocolo electroforético de isoenzimas de ejemplares del género <i>Diaphania</i> . .	16
Cuadro 5. Formulación de tampones para geles de almidón y para electrodos....	18
Cuadro 6. Composición de las recetas de revelación de enzimas para los individuos del género <i>Diaphania</i>	19
Cuadro 7. Grupos basados en semejanzas morfológicas de especies del género <i>Diaphania</i> colectadas en las localidades bajo estudio.	26
Cuadro 8. Distancia génica de Nei (1978) para cinco especies del género <i>Diaphania</i> colectadas en tres localidades de Venezuela.	29
Cuadro 9. Índice de Diversidad Génica de Nei (1973) para seis especies del género <i>Diaphania</i>	29
Cuadro 10. Frecuencias alélicas para Mdh - 1 de seis especies del género <i>Diaphania</i> colectadas en tres localidades de Venezuela.	31
Cuadro 11. Frecuencias alélicas para Got – 1 de seis especies del género <i>Diaphania</i> colectadas en tres localidades de Venezuela.	31
Cuadro 12. Conteos genotípicos del locus Mdh - 1 de las especies del género <i>Diaphania</i> colectadas en tres localidades de Venezuela.	32
Cuadro 13. Conteos genotípicos del locus Got - 1 de las especies del género <i>Diaphania</i> colectadas en tres localidades de Venezuela.	33
Cuadro 13. <i>Continuación</i>	34
Cuadro 14. Alelos presentes en los loci Mdh – 1 y Got – 1, número promedio de alelos por locus (A), diversidad génica de Nei (1973) (H),	

heterocigocidad observada (Ho) y Homocigocidad observada (1-Ho) de las especies del género <i>Diaphania</i> colectadas en tres localidades de Venezuela.	36
Cuadro 15. Frecuencias alélicas y genotípicas de <i>D. nitidalis</i> para los loci Mdh – 1 y Got - 1 por localidad.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Dendrograma según el método UPGMA basado en la Distancia Génica de Rogers (Wright, 1978) para seis especies del género *Diaphania*.... 25
- Figura 2.** Dendrograma derivado de la Distancia Genica de Prevosti (Wright, 1978) por el método Neighbor-joining, representando a los 96 individuos del género *Diaphania* colectados en las tres localidades de Venezuela.....30
- Figura 3.** Señalización de localidades de colecta de las especies del género *Diaphania* y gráficos de distribución de porcentaje para genotipos de la especie *D. nitidalis* en el locus **Got** – 1.....39
- Figura 4.** Hipótesis de la herencia de letales balanceados para la especie *Diaphania nitidalis*.....40
- Figura 5.** Hipótesis de la herencia de letales balanceados con probabilidad de una baja tasa de recombinación para la especie *Diaphania nitidalis*....40

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Zimograma del sistema isoenzimático **Mdh** - 1 para los individuos del género *Diaphania* colectados en las tres localidades de Venezuela.....50
- Anexo 2.** Zimograma del sistema isoenzimático **Got** - 1 para los individuos del género *Diaphania* colectados en las tres localidades de Venezuela.....54

INTRODUCCIÓN

A escala mundial las especies cucurbitáceas ocupan un importante lugar para los consumidores, ya que se usan en la preparación de jugos, postres, sopas o para su consumo fresco, de allí deriva la importancia de un fruto de calidad y en buen estado. Esto puede verse afectado por la incidencia de insectos plagas en el campo, lo que no sólo representa pérdidas en materia económica para el productor agrícola, sino también la disminución en la oferta para su consumo. Entre los insectos plagas de importancia a escala mundial que producen lesiones tanto al follaje como a los frutos, se encuentran las larvas de algunos lepidópteros pertenecientes a la familia Crambidae, particularmente a tres especies del género *Diaphania*, como son: *D. hyalinata* (L.), *D. nitidalis* (Cramer) y *D. indica* Saunders (Clavijo *et al*, 1995; Bertorelli y Clavijo, 1995; Gamboa, 2000).

La taxonomía de las especies del género *Diaphania* ha sido establecida basándose en características morfológicas. Los individuos de *D. hyalinata* y *D. indica* son similares morfológicamente, principalmente a nivel larval, donde hasta ahora es imposible diferenciarlas. En fase adulta ambas especies presentan caracteres que sugieren cercanía en sus líneas evolutivas (Clavijo, 1990), lo cual no ha sido estudiado. Por otro lado, *D. nitidalis* es una especie que presenta semejanzas morfológicas con otras especies del género en fase adulta. Se encuentra totalmente separada a nivel morfológico de *D. hyalinata* y *D. indica*, en estado larval y en estado adulto.

En búsqueda de complementar la información taxonómica con respecto a las especies de este género, nace la idea de conocer si las diferencias moleculares entre especies proporcionan un ordenamiento que sea similar al encontrado a nivel morfológico, mejorando así, la información con respecto a las especies de este género. Por otra parte, se busca analizar las posibles semejanzas a nivel genético que *D. hyalinata* y *D. indica* puedan tener y las relaciones que presenten con otras especies del grupo. Otro punto de interés es conocer si existe variabilidad entre diferentes localidades del país donde se

encuentra *D. nitidalis*. La posibilidad de hallar variabilidad genética en distintas poblaciones, podría indicar la potencialidad de evolución y adaptación, el mantenimiento del acervo de la diversidad genética y su posible manejo integrado, así como la posible relación de la variabilidad genética y la geografía (Meffe & Carroll, 1994).

Para satisfacer dichas inquietudes, se analizó la variación isoenzimática en geles de almidón, debido a que la información isoenzimática ha sido usada para conocer la separación genética que puede existir entre distintas especies y poblaciones, e igualmente puede revelar si las mismas constituyen un mismo acervo genético o si pertenece a grupos distintos (Quicke, 1993).

Para realizar las colectas de los individuos se eligieron tres localidades del país, con el fin de obtener individuos provenientes de distintos ecosistemas. Estas localidades fueron seleccionadas por la variabilidad de condiciones topográficas, climáticas y ecológicas, aparte del fácil acceso que presentan. Estas fueron: La Estación Biológica "Dr. Alberto Fernández Yépez" (Rancho Grande) en el Parque Nacional Henri Pittier en el estado Aragua, ubicada cerca de un paso migratorio de diversas especies de aves e insectos, incluyendo los lepidópteros del género *Diaphania*, sitio que presenta poca perturbación ecológica; el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, localizado en un ecosistema agrícola en el valle del río Güey, en donde se siembran diversos cultivos anuales, y el poblado de San Javier, zona rural en el estado Yaracuy, donde se desarrollan actividades netamente agrícolas y que en sus cercanías se siembran cucurbitáceas durante la mitad del año.

Esta investigación es la primera de tipo molecular que busca caracterizar la variación genética del género *Diaphania*, que incluye especies reconocidas como plagas agrícolas a nivel mundial. Este estudio, también es un aporte novedoso de información que complementa la ya existente a nivel morfológico y que forma parte de las líneas de investigación del Museo del Instituto de Zoología Agrícola "Francisco Fernández Yépez" (MIZA) y del Centro de Investigación en Biotecnología Agrícola (CIBA), de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

OBJETIVOS

GENERAL:

Caracterizar la variabilidad genética de las especies *Diaphania hyalinata*, *D. nitidalis* y *D. indica*, colectadas en algunas localidades venezolanas.

ESPECÍFICOS:

1. Adaptar un protocolo de electroforesis de isoenzimas para lepidópteros del género *Diaphania* (Lepidoptera: Crambidae).
2. Establecer semejanzas genéticas entre las especies *D. hyalinata*, *D. nitidalis* y *D. indica* y su relación con otras especies del género.
3. Cuantificar la diversidad genética de algunas especies del género *Diaphania*.
4. Caracterizar la estructura genética de tres poblaciones geográficas de *D. nitidalis*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aspectos generales

Las plantas pertenecientes a la familia Cucurbitaceae, como melón, pepino, auyama y calabacín se ven afectadas por especies del género *Diaphania*, entre las cuales se encuentran *D. hyalinata*, *D. nitidalis* y *D. indica*, todas plagas de importancia económica en esos cultivos (Clavijo *et al*, 1995).

Dentro del género, *D. nitidalis* es considerada la plaga de mayor importancia en el Continente Americano, causando daños desde el sureste de Norteamérica hasta el norte de Argentina. En Venezuela esta presente en Amazonas, Anzoátegui, Aragua, Barinas, Bolívar, Mérida, Yaracuy, entre otros Estados y en altitudes que oscilan desde 0 a 1.800 m, y durante todo el año (Clavijo, 1990; Arias y Clavijo, 2001).

D. hyalinata tiene casi la misma distribución geográfica que va desde Canadá hasta América del Sur, pasando por las islas del Caribe; sin embargo, su impacto económico no es tan marcado como en la primera (Clavijo *et al*, 1995; Gamboa, 2000). En Venezuela, *D. hyalinata* ha sido colectada en los estados Amazonas, Aragua, Bolívar, Carabobo, Falcón, Guayana y Lara en altitudes desde 160 a 2.300 m, con presencia todo el año (Clavijo, 1990; Arias y Clavijo, 2001).

D. indica es una especie presente en casi todas las zonas tropicales del mundo, incluyendo el Continente Americano, con distribución errática, y causando daños económicos muy serios fuera de nuestro hemisferio (Clavijo *et al*, 1995). En nuestro país, ha sido reportada como plaga en una plantación comercial de melón en el Estado Anzoátegui (Bertorelli y Clavijo, 1995). *D. indica* se ha colectado hasta el momento, en Aragua, Anzoátegui, Distrito Federal, Lara y en el Archipiélago Las Aves, en altitudes de 0 a 450 m, todo el año. Las otras especies del género están reportadas principalmente para el estado Aragua, en su mayoría con presencia durante todo el año (Clavijo, 1990; Arias y Clavijo, 2001).

Sistemática del género *Diaphania*

Los lepidópteros del género *Diaphania* comprenden un grupo poco estudiado (Clavijo, 1990; Arias y Clavijo, 2001). Su taxonomía, como ocurre en la mayoría de los seres vivos, se basa en las características morfológicas. No hay ninguna investigación relacionada con el análisis de isoenzimas u otro marcador molecular para establecer semejanzas o estructura poblacional de algunos de estos lepidópteros, siendo ésta la primera investigación a nivel molecular en el género.

El género *Diaphania* tiene alrededor de 100 especies en la región Neotropical, siendo reportadas para Venezuela 38 especies, lo cual representa un 43,2% del total de especies señaladas (Munroe, 1995; Clavijo, 1990; Arias y Clavijo, 2001).

El género está dividido en tres grupos relacionados, "*hyalinata*" con 35 especies, "*fumosalis*" con dos especies y "*auricollis*" con una especie; sin embargo, son grupos que necesitan un estudio para establecer sus relaciones filogenéticas, sobre todo para el grupo "*hyalinata*", el cual se piensa que podría no ser monofilético (Arias y Clavijo, 2001).

En cuanto a las especies de interés para esta investigación, sólo se tiene conocimiento de las diferencias en caracteres morfológicos, tales como el diseño alar, modificación de tarsos anteriores y espuelas de las tibias posteriores de los machos, la forma de la genitalia masculina y femenina y la constitución del órgano anepisternal en los machos, entre otros (Clavijo, 1990). *D. hyalinata* y *D. indica* son especies con un diseño alar bastante similar (Clavijo, 1990; Clavijo *et al*, 1995), aunque con suficientes y claras diferencias morfológicas en su estado adulto, que las permite diferenciar sin problema alguno. En fase larval dichas especies son muy similares, por lo que son frecuentemente confundidas, por tanto para su separación, hay que basarse en los otros caracteres arriba señalados cuando los individuos están en fase adulta. *D. nitidalis* es una especie que presenta caracteres similares en su fase adulta a otras especies cercanas del

género, pero muy diferentes a *D. hyalinata* y *D. indica*, tanto los adultos como las larvas (Clavijo *et al*, 1995).

A pesar de que en este trabajo se busca conocer las relaciones entre *Diaphania hyalinata*, *D. nitidalis* y *D. indica*, el estudio preliminar de otras especies pudiese dar una idea de la sistemática del grupo.

Los individuos pertenecientes al “**Grupo hyalinata**” poseen un patrón de coloración blanco y castaño de claro a oscuro, el diseño alar es igualmente blanco con bandas castañas en el margen costal y apical, en algunas especies el blanco esta muy reducido. Este grupo se divide en “**hyalinata (abdomen blanco)**” cuyos individuos poseen los tergos del abdomen blancos con los segmentos apicales y/o preapicales castaño y “**hyalinata (abdomen negro)**” donde los individuos poseen tergos castaño claro a oscuro y con los tergos apicales y/o preapicales castaño. El “**Grupo nitidalis**” las especies de este grupo presentan un diseño alar amarillo y castaño o castaño oscuro. En algunas especies, el castaño abarca toda la superficie del ala. El “**Grupo fumosalis**” son ejemplares de coloración castaño claro, en ambas alas y que presenta dos ventanas preapicales blanco translucido (Clavijo, 1990; J. Clavijo y Q. Arias comunicación personal).

Biología molecular de lepidópteros

El campo de la biología molecular se ha extendido enormemente en los últimos años y muchos entomólogos desean aprovechar esta tecnología, que es un nuevo nivel de resolución para el estudio de los sistemas ecológicos y la taxonomía de insectos. Las isoenzimas son marcadores moleculares ampliamente usados en la taxonomía, genética de poblaciones, resistencia a insecticidas en plagas de interés económico y de importancia médica, mapeo cromosómico, entre otros. Las isoenzimas han sido de utilidad para cuantificar y caracterizar la estructura de la variabilidad genética en diversas especies de insectos. Sin duda, ha contribuido en varios estudios a definir las relaciones y la variabilidad genética, tanto de individuos como de poblaciones (Loxdale & Lushai, 1998).

La diversidad genética puede detectarse a escala molecular a partir de las proteínas que codifican los genes. Los diferentes tipos de alelos que pueden estar presentes en una especie o población, dan idea de las variaciones que tienen los nucleótidos. La variabilidad genética determina la forma en que una especie interactúa con su ambiente y con otras especies y es producto de su historia evolutiva. Esta puede ser cuantificada a través de índices, que miden la riqueza alélica de una especie o la distribución de las frecuencias alélicas. La riqueza alélica que posee una especie puede ser determinada, por ejemplo, a partir del cálculo del número promedio de alelos por locus (A). La distribución de las frecuencias alélicas o uniformidad, puede determinarse a partir de varios índices, sin embargo, los índices de diversidad génica de Nei (1973, 1978) suelen ser los más utilizados (Díaz, 2002; Moreno, 2001; Ayala, 1980).

La distancia genética entre dos secuencias, individuos o taxa es un estimado cuantitativo de cuan diferente son genéticamente. Cuando la distancia genética es baja, la semejanza genética es alta y viceversa (Avice, 1994). La semejanza es un parámetro de importancia en todo estudio de caracterización genética entre dos taxa específicos (Díaz, 1997). Existen diversas distancias génicas, que se originan a partir de una matriz de datos compuestas por valores de semejanzas, algunas de ellas son: la distancia génica de Nei (1973), la distancia génica de Rogers (Wright, 1978) y la distancia génica de Prevosti (Wright, 1978).

El estudio de cierto número de proteínas que se eligen sin conocer si son o no distintas en ambas poblaciones, permite cuantificar el grado de diferenciación genética observada, que a su vez indicaría el grado de diferenciación de las poblaciones, a nivel de genoma (Dobzhansky *et al*, 1980). Las isoenzimas han permitido la comparación entre los agrupamientos genéticos y la clasificación taxonómica actual, la cual está basada en caracteres morfológicos. Las diferencias genéticas que pueden ser detectadas mediante dicha técnica, son independientes de las diferencias morfológicas entre especies y últimamente se ha utilizado para medir la diferenciación genética de especies morfológicamente similares y que se

encuentran íntimamente emparentadas en diversos grupos de individuos, plantas, invertebrados y vertebrados aportando datos valiosos acerca de relaciones filogenéticas (Quicke,1993; Dobzhansky *et al*, 1980).

Las isoenzimas han podido resolver incertidumbres en cuanto a los problemas sistemáticos en el orden Lepidoptera, llegando a verificar o descartar suposiciones en donde se había asignado por morfología, ciertos individuos a familias, géneros, especies, etc, (Johnson *et al*, 1996; Shapiro & Geiger, 1989; Hagen & Scriber, 1991; Pashley, 1983).

Hay ejemplos del uso de isoenzimas en familias del orden Lepidoptera en los que se han reafirmado ideas a partir de los resultados obtenidos, como es el caso de la familia Pieridae, donde se propuso según la morfología de los individuos, que dos tribus Anthocharini y Pierini pertenecían a la subfamilia Pierinae (Geiger,1980).

Otro ejemplo que podemos mencionar es el de una población de *Coenonympha tullia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae), en el norte de California USA, la cual presentaba características morfológicas que hacían sospechar que podría ser una nueva subespecie. Esta población se comparó electroforéticamente con individuos de las otras subespecies conocidas, como *C. t. eryngii*, *C. t. eunomia*, y *C. t. californica*. Los resultados genéticos justificaron su separación en una nueva subespecie, *Coenonympha tullia yontocket* (Porter & Mattoon,1989).

Las mediciones de la variabilidad dentro de poblaciones son importantes para evaluar teorías acerca de la naturaleza de las fuerzas que actúan sobre la variación genética, que a su vez es responsable por los cambios evolutivos. Estos cambios en la frecuencia de los genes y en especial la pérdida de ellos son importantes en la biología conservacionista. La variabilidad genética que puedan presentar individuos de una población, es indicativo de la heterocigosidad y de la capacidad adaptativa que pueda tener la especie para poblar otras regiones geográficas (Meffe & Carroll,1994). En el contexto agrícola, como especies plagas,

esto puede significar la adaptación a diferentes condiciones que pueden perjudicar la producción de un determinado cultivo.

Las isoenzimas han servido para esclarecer si existen cruces de individuos provenientes de diferentes poblaciones de zonas específicas y también utilizadas para conocer la diferenciación genética basándose en la especificidad de hospederos (Johnson *et al*, 1996; Shapiro *et al*, 1989; Porter & Mueller, 1998; Smith & Glenn, 1995; Kelley *et al*, 2000). La variabilidad genética en poblaciones de insectos ha sido frecuentemente estudiada a través del uso de isoenzimas, como ocurre con lepidópteros, áfidos y coleópteros, entre otros (Bader, 1998; Loxdale *et al*, 1998; Meglécz *et al*, 1998; Johannensen *et al*, 1996).

En lepidópteros como *Aglais urticae*, se discernieron dudas acerca de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones en el tiempo y espacio; lográndose determinar que la variación dentro de poblaciones era de un 70% y entre poblaciones era de 30% (Vandewoestijne *et al*, 1999).

Un estudio isoenzimático de las poblaciones centrales, periféricas y separadas de la especie *Coenonympha hero* en el Norte y Centro de Europa, permitió afirmar las ideas acerca de la variabilidad y diferenciación genética que se tenían al respecto. Evidenciándose que la variabilidad genética en las poblaciones periféricas y separadas es más baja que en la población central. La población periférica resultó ser la más diferenciada de las todas poblaciones (Cassel & Tammaru, 2002).

El estudio de poblaciones europeas y africanas de *Helicoverpa armigera* mediante el uso de la electroforesis de isoenzimas, reveló la existencia de diferenciación genética en las regiones de Francia y Portugal, esto se atribuyó a la diapausa de los individuos en el período de invierno. Para las poblaciones africanas se observó una baja diferenciación genética y no fue determinada la estructura genética. Esta situación fue explicada por el ciclo anual de colonización que realizan y la alta habilidad de vuelo de estos lepidópteros (Nibouche *et al*, 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localidades de colecta

Se realizó una serie de colectas de individuos de las especies *Diaphania hyalinata*, *D. nitidalis* y *D. indica* en tres localidades de Venezuela; estas fueron: la Estación Biológica “Dr. Alberto Fernández Yépez” (Rancho Grande, Parque Nacional Henri Pittier), Estado Aragua; Campo Experimental de la Facultad de Agronomía - UCV, Estado Aragua y San Javier, Estado Yaracuy. Las capturas de *D. hyalinata*, *D. nitidalis* y *D. indica* estuvieron sujetas a las condiciones climáticas que se presentaron en el período de evaluaciones, las cuales se vieron particularmente afectadas por lluvias muy irregulares. Las localidades de colecta seleccionadas se encuentran en Estados donde se reportan las especies de interés.

La Estación Biológica “Dr. Alberto Fernández Yépez” (conocida también como Rancho Grande) en el Parque Nacional Henri Pittier, presenta la particularidad de estar muy cerca del paso migratorio de diversas especies de lepidópteros y otros órdenes de insectos, por lo que presenta una condición favorable para la colecta de una gama de individuos pertenecientes al género. Esto aumenta la posibilidad de capturar especímenes provenientes de diferentes zonas dentro del Parque y de zonas cercanas.

El Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, presenta condiciones climáticas y topográficas diferentes a las de la Estación Biológica “Dr. Alberto Fernández Yépez”. Presenta características similares a las de un agro-ecosistema, a pesar de encontrarse muy cercano al Parque Nacional Henri Pittier (pie de cerro). Estacionalmente son sembradas algunas especies de cucurbitáceas y otros cultivos de interés agronómico, estando presentes las especies de *Diaphania* bajo estudio. Otra razón de incluir esta localidad, es el interés de conocer si existe algún aislamiento reproductivo de naturaleza geográfica entre las poblaciones de la Estación Biológica y del Campo experimental de FAGRO, a pesar de que se cree que estos

lepidópteros tienen una alta capacidad de desplazamiento (J. Clavijo comunicación personal).

La región próxima al poblado de San Javier, ubicada en el Estado Yaracuy, es una zona netamente agrícola, cuyos ecosistemas naturales han sido totalmente intervenidos. Está ubicada en un valle, en donde hay producción de cucurbitáceas la mitad del año, lo que favorece la presencia de algunas de las especies de mayor daño económico en estos cultivos, en especial la de *D. nitidalis*, aunque, se podrían encontrar las otras dos especies que incluye nuestro estudio. Esta zona se encuentra alejada de la Estación Biológica Rancho Grande y del Campo Experimental FAGRO por más de 147 Km, lo que pudiese ser una barrera física para la migración de estos lepidópteros, aspecto hasta ahora no estudiado.

Colecta de los individuos

Las colectas fueron realizadas desde Julio de 2003 hasta Junio de 2004. En FAGRO y San Javier no fue posible coleccionar mayor cantidad de individuos por especie. Se capturaron tanto hembras como machos (Cuadro 2). La mayoría de los individuos de las diferentes especies se capturaron en fase adulta, para poder agilizar el reconocimiento de la especie y el sexado de los mismos. Sin embargo, en algunos casos fue necesaria la cría de larvas de *D. indica* y *D. nitidalis*, debido a la falta de individuos en fase adulta en el momento de colecta.

Se capturaron los ejemplares utilizando la trampa de luz, que consistió en un bombillo de luz de vapor de mercurio de 250 vatios y una lona blanca para proyectar la luz de dicho bombillo. Esta trampa fue instalada en lugares donde su presencia no fuera obstaculizada por la vegetación y tomando en cuenta las fases lunares, para facilitar la captura de los individuos (Vieira, 1994; Phillips, 2003).

Para preservar la actividad de las enzimas, los individuos recién colectados fueron mantenidos a temperaturas de -4 °C durante el transporte al laboratorio por menos de 5 horas. Los individuos fueron transportados en viales plásticos colocados en envases térmicos con hielo o compresas frías, para luego ser almacenados a -22 °C por un período no mayor de 10 días hasta ser procesados.

Esta metodología se aplicó en los adultos colectados en la Estación Biológica “Rancho Grande” y en el Campo Experimental FAGRO.

Las larvas colectadas en campo fueron llevadas al laboratorio con el sustrato en donde se encontraron (flores y frutos), siendo criadas por un período de 3 semanas hasta emerger el adulto. Igualmente fueron identificados y sexados. Luego éstos se sometieron a la temperatura de -22 °C hasta ser procesados, por un período no mayor de 10 días.

De igual manera, se tuvo interés en capturar otras especies pertenecientes al género *Diaphania* para conocer de manera preliminar las relaciones genéticas entre éstas y las tres especies antes mencionadas (Cuadro 2). En función de las especies colectadas se realizó una clasificación secundaria de los grandes grupos basada en la morfología (Clavijo, 1990; J. Clavijo y Q. Arias comunicación personal) con el fin práctico de compararla con los agrupamientos genéticos generados por el polimorfismo isoenzimático. Esta clasificación ubicó a los individuos colectados en “**Grupo hyalinata (abdomen blanco)**”, “**Grupo hyalinata (abdomen negro)**”, “**Grupo fumosalis**” y “**Grupo nitidalis**”.

Las especies fueron identificadas a partir de una clave pictórica de las especies de *Diaphania* (Arias y Clavijo, 2001) y sexadas por entomólogos con experiencia en este grupo de lepidópteros que laboran en el Museo del Instituto de Zoología Agrícola “Francisco Fernández Yépez” (MIZA).

Cuadro 1. Características geográficas, climáticas y topográficas de las localidades de colecta del género *Diaphania*.

Zonas de colecta	Altitud (m.s.n.m)	Coordenadas	Precip. media anual (mm)	Temp. media anual (°C)	Orografía	Zonas de vida según Holdridge
Estación Biológica "Dr. Alberto Fernández Yépez"	1.087	N 10°21'02" W 67°40'59"	135,88	21,1	Cordillera de la Costa	Bosque húmedo tropical
Campo Experimental FAGRO	436	N 10°15' W 67°39'	100,75	24,5	Valle de Aragua	Bosque seco tropical
San Javier	427	N 10°23'15,7" W 68°40'26,6"	1.226,5	27,0	Valles de Yaracuy	Bosque seco tropical

Fuente: República Bolivariana de Venezuela. Servicio de meteorología de la aviación, 2003; Vieira, 1994; Marcano y Landínez, 1997; Holdridge, 1978.

Cuadro 2. Lista de especies colectadas pertenecientes al género *Diaphania*, localidades, número de individuos, sexo y fechas de colecta.

Localidad	Especie	Nº de individuos		Fechas de colecta
		♀	♂	
Campo Experimental - FAGRO	<i>D. hyalinata</i>	-	2	13/III/2004 y 09/V/2004
	<i>D. indica</i>	2	4	
	<i>D. nitidalis</i>	2	4	
San Javier	<i>D. nitidalis</i>	4	7	23/IV/2004
Estación Biológica	<i>D. hyalinata</i>	2	5	08/VII/2003 al 10/VII/2004
	<i>D. nitidalis</i>	20	7	
	<i>D. clavata</i>	-	1	
	<i>D. elegans</i>	1	1	
	<i>D. eumeusalis</i>	-	2	
	<i>D. euryzonalis</i>	2	6	
	<i>D. fumosalis</i>	2	7	
	<i>D. hemiecitralsis</i>	-	1	
	<i>D. lucidalis</i>	-	1	
	<i>D. magdalenae</i>	-	1	
	<i>D. oeditornalis</i>	-	1	
	<i>D. oleosalis</i>	4	4	
<i>D. plumbidorsalis</i>	-	1		

Ajuste del protocolo electroforético

Las pruebas electroforéticas fueron realizadas en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación en Biotecnología Agrícola (CIBA), Instituto de Genética, de la Facultad de Agronomía – UCV.

Para realizar el ajuste del protocolo electroforético se hicieron una serie de colectas en la Estación Biológica, donde se capturaron diversas especies para ser procesadas (Cuadro 3). De esta manera fue posible detectar el mayor número de bandas polimórficas y evaluar objetivamente la expresión y separación de las bandas.

Cuadro 3. Especies del género *Diaphania* utilizadas para ajustar el protocolo electroforético.

Especies de <i>Diaphania</i>	Cantidad de individuos procesados
<i>D. albianalis</i>	2
<i>D. eumeusalis</i>	23
<i>D. fuligalis</i>	5
<i>D. fumosalis</i>	3
<i>D. hyalinata</i>	30
<i>D. nitidalis</i>	8
<i>D. oleosalis</i>	16

Extracción

Primeramente se probaron distintos tejidos, soluciones extractoras, proporciones tejido : tampón y enzimas.

Para realizar la extracción de proteínas se escogió aquel tejido que suministrara suficiente extracto para poder evaluar los diferentes sistemas enzimáticos. Este tejido debía ser lo suficientemente práctico para disectar y macerar, de allí que se escogieron dos tipos de tejidos: tórax más el abdomen y solamente tórax.

Para realizar la electroforesis de isoenzimas fue necesario definir el tampón de extracción y para lo cual se probaron dos soluciones: Tris HCl pH 8,0 0,1 M y Tris Borato EDTA 0,1 M pH 9,0 (Cuadro 4).

De acuerdo con el peso promedio de cinco individuos (± 20 mg) de *Diaphania hyalinata* y *D. nitidalis* se determinó la cantidad de tampón de extracción. A partir de allí se evaluaron las proporciones 1:3 y 1:4 (Tejido: Tampón de extracción).

Cuadro 4. Soluciones extractoras evaluadas para ajustar el protocolo electroforético de isoenzimas de ejemplares del género *Diaphania*.

		Solución extractora	
		Tris HCl 0,1 M pH 8,0	Tris Borato EDTA 0,1 M pH 9,0
Reactivos	12,11 g Tris	12,11 g Tris	
	HCl 37% pH 8,0 para ajuste de pH.		37,22 g EDTA
	1 l de Agua destilada		61,8 g Ácido Bórico 1 l de Agua destilada

Los individuos fueron macerados separadamente en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) de 0,5 ml. Cada muestra se centrifugó por un período de 1 minuto. Los papeles Whatman # 3 fueron impregnados con el extracto y

luego colocados en el gel previamente preparado. La disección del insecto, macerado, centrifugado y colocación en gel se realizó en un intervalo de temperaturas de 12° C a 15° C.

Corrida electroforética

Para la corrida electroforética se utilizaron geles de almidón hidrolizado de papa (Sigma Chemical Co.) al 12% (p/v). Los tampones gel – electrodos evaluados fueron Histidina Citrato pH 5,7 y Morfolina Citrato pH 6,1 (Cuadro 5).

Revelado de sistemas enzimáticos

Se evaluaron un total de trece enzimas, cuyas composiciones de los tampones de revelación se ajustaron para los ejemplares del género *Diaphania* (Cuadro 6), a partir de las composiciones estandarizadas del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Genética, Facultad de Agronomía – UCV.

La revelación se realizó luego de colocar los geles en cada sistema y sometido a una temperatura 38 °C en estufa.

La movilidad relativa (**M.r.**= migración de banda /migración de banda patrón) de cada alelo, fue calculada a partir de una banda fija perteneciente a un patrón. Para **Mdh** fue utilizada *Canavalia ensiformis* Cultivar Tovar y para **Got** se utilizó como patrón, la banda inferior del patrón más frecuente de la especie *D. nitidalis*.

Cuadro 5. Formulación de tampones para geles de almidón y para electrodos.

Tampones	Preparación	Condiciones de corrida
Solución madre Morfolina Citrato 0,04 M pH 6,1	1 l Agua destilada; 7,68 (g) Ácido Cítrico; ajustar el pH a 6,1 con Morfolina Citrato.	
Morfolina Citrato 0,04 M pH 6,1 (Gel)	Dilución 1:20 de la solución madre de Morfolina Citrato pH 6,1 (14,3 ml) para un volumen final de 300 (ml).	Amperaje: 35 mA. Precorrida: 20 min. Corrida: 5 h.
Morfolina Citrato 0,04 M pH 6,1 (Electrodos)	150 (ml) de solución madre de MC a cada electrodo.	
Histidina Citrato 0,005 M pH 5,7 (Gel)	500 (ml) Agua destilada; 0,433 (g) DL-Histidina; ajustar con Ácido Cítrico 0,3 M. Utilizar para el gel solo 300 (ml).	Voltaje: 180–240 V. Precorrida: 20 min. Corrida: 4 h.
Tris Citrato 0,1 M pH 7,0 (Electrodos)	500 (ml) Agua destilada; 6,25 (ml) Ácido Cítrico 0,3 M; ajustar con sol. Tris HCl 0,1 M pH 8,0. Aplicando 200 (ml) a cada electrodo.	

Cuadro 6. Composición de las recetas de revelación de enzimas para los individuos del género *Diaphania*.

Enzimas	E.C.	Composición
<i>ACP</i> Fosfatasa ácida	3.1.3.2	2 ml MgCl ₂ 10%, 50 mg α-Naphtyl Ácido fosfato, 25 mg Fast garnet GBC, 10 ml Acetato de sodio pH 5,5 1 M, 40 ml Agua destilada.
<i>ADH</i> Alcohol deshidrogenada	1.1.1.1	4 ml Etanol, 10 mg NAD, 50 ml Tris 0,1 M pH 8,0, 1 ml MTT, 3 mg PMS.
<i>α -Est</i> Alfa esterasa	3.1.1.1	25 mg Fast Blue RR, 1 ml α-Naphtyl acetato, 50 ml Tampón fosfato 0,1 M pH 6,3.
<i>β -Est</i> Beta esterasa	3.1.1.1	25 mg Fast Blue RR, 1 ml α-Naphtyl acetato, 50 ml Tampón fosfato pH 6,3.
<i>CAT</i> Catalasa	1.11.1.6	50 ml agua+ 0,75 g Yoduro de K, 11,6 ml H ₂ O ₂ 3%, 38,4 ml Agua.
<i>MDH</i> Málato deshidrogenasa	1.1.1.37	3 ml Solución L – Malato; 1000 µl MTT; 1000 µl NAD; 300 µl PMS; 47 ml Tris HCl 0,1 M pH 8,0.
<i>ME</i> Enzima málica	1.1.1.40	9 ml Solución malato, 2 ml MgCl ₂ 10%, 8 mg NADP, 41 ml Tris 0,1 M pH 8,0, 1 ml MTT, 3 mg PMS.
<i>PGM</i> Fosfoglucomutasa	2.7.5.1	15 mg Glucosa 6-P-deshidrogenasa, 50 mg Glucosa 1-fosfato, 2 ml MgCl ₂ 10%, 10 mg NADP, 1 ml MTT, 3 mg PMS, 50 ml Tris 0,1 M pH 8,0.
<i>PGI</i> Fosfoglucosa isomerasa	5.3.1.9	40 mg Fructosa 6 fosfato, 20 mg Glucosa 6-F-deshidrogenasa, 8 mg NADP, 50 ml Tris 0,1 M pH 8,0, 1 ml MTT, 3 mg PMS.
<i>G6PD</i> Glucosa – 6 – fosfato deshidrogenasa	1.1.1.49	15 mg Ácido 6 fosfogluconico, 2 ml MgCl ₂ , 8 mg NADP, 50 ml Tris 0,1 M pH 8,0, 1 ml MTT, 3 mg PMS.
<i>GOT</i> Glutamato oxalacetato transaminasa	2.6.1.1	5 mg Piridoxal 5- fosfato; 100 mg Fast Blue BB; 50 ml Tampón GOT [6,05 g Trizma base; 0,5 g Ácido α- Cetoglutárico; 1 g Ácido Aspártico, en 500 ml de Agua destilada].
<i>IDH</i> Isocitrato Deshidrogenasa	1.1.1.42	50 mg Ácido Isocítrico; 2000 (µl) MgCl ₂ 10%; 80 (µl) NADP; 1000 (µl) MTT; 300 (µl) PMS; 50 ml Tris HCl 0,1 M pH 8,0.
<i>PER</i> Peroxidasa	1.11.1.7	25 mg Carbazol, 2 ml nn- dimethyl formamida, 50 mg CaCl ₂ , 250 µl H ₂ O ₂ 3%, 50 ml Acetato de sodio pH 5,5.

Análisis estadísticos

Para cada sistema isoenzimático, se registró cada banda según su presencia y fuerza de revelación. Se infirió el modo de herencia del polimorfismo isoenzimático, debido a que no existe información para el género, lo que permitió caracterizar el genotipo de cada individuo. A cada banda se le designó una codificación alfabética, en forma progresiva a partir del ánodo. Se calcularon las frecuencias alélicas de *D. hyalinata*, *D. indica*, *D. nitidalis*, *D. euryzonalis*, *D. oleosalis* y *D. fumosalis*. Con estas frecuencias alélicas se realizó una matriz de Distancias Génicas de Rogers (Wright, 1978) $d_{ij} = [(1/2\lambda) \sum_k (X_{ki} - X_{kj})^2]^{1/2}$, $\lambda = N^{\circ}$ de loci, X_{ki} = frecuencia de k-ésimo alelo de la i-ésima especie, X_{kj} = frecuencia de k-ésimo alelo del j-ésima especie. Se utilizó esta distancia, ya que permitió la comparación entre especies a pesar de que algunas no comparten alelos, siendo una de las más utilizadas por su simplicidad (Swofford *et al*, 1996; Avise, 1994; Futuyma, 1986). Esta matriz se usó para graficar las relaciones genéticas entre especies con el dendrograma UPGMA.

Se realizó el cálculo de la matriz de Distancias Génicas de Nei (1978) basándose en la siguiente fórmula,

$$d_{ij} = \sum_k X_{ki} X_{kj} / \{ [(2N_i \sum X_{ki}^2 - \lambda) / (2N_i - 1)] [(2N_j \sum X_{kj}^2 - \lambda) / (2N_j - 1)] \}^{1/2}$$

$\lambda = N^{\circ}$ de loci; X_{ki} = frecuencia de k-ésimo alelo de la i-ésima especie, X_{kj} = frecuencia de k-ésimo alelo de la j-ésima especie; N_i = número de individuos de la i-ésima especie, N_j = número de individuos de la j-ésima especie.

Dicha distancia fue calculada para todas las comparaciones apareadas entre las seis especies anteriormente mencionadas, a excepción de las comparaciones de *D. nitidalis* – *D. indica* y *D. fumosalis* – *D. indica* por no poseer alelos comunes entre sí.

Para estas especies se hizo el cálculo de la Diversidad Génica de Nei (1973) $H = 1 - \sum p_i^2$ y se calcularon los componentes de diversidad génica total de las especies $H_T = 1 - \sum \bar{p}_i^2$, \bar{p}_i^2 = Frecuencia alélica promedio en todas las especies.

$H_s = \sum_r [1 - \sum p_{ri}^2] / S$; S = número de especies, $r = r$ -ésima especie, $i = i$ -ésimo alelo (diversidad génica dentro de las especies), $D_{ST} = H_T - H_s$ (diversidad génica entre especies) y $G_{ST} = D_{ST} / H_T$ (proporción de la diversidad génica total debida a la diferencia entre especies). Para estas especies se realizaron los cálculos para determinar la heterocigosidad observada (**Ho**) y homocigosidad observada (**1-Ho**). También se determinó la riqueza alélica a través del número promedio de alelos por locus **A = N° alelos / N° total de loci**.

Para todos los individuos de las catorce especies se realizó el cálculo de la matriz de Distancia Génica de Prevosti (Wright, 1978) $d_{ij} = (1/2\lambda) (\sum_k |X_{ki} - X_{kj}|)$, donde: λ = N°. de loci, X_{ki} = frecuencia de k-ésimo alelo del i-ésimo individuo, X_{kj} = frecuencia de k-ésimo alelo del j-ésimo individuo. Con el fin de establecer relaciones genéticas entre todas las especies, se utilizó una adaptación de esta distancia para poder ser aplicada a registros por individuos. A cada individuo se le asignó una codificación, que se basó en los siguientes criterios: a) Si era homocigoto, se le asignó una frecuencia alélica igual a 1 para el alelo respectivo. b) Si era heterocigoto, se le asignó una frecuencia alélica igual a 0,5 para cada uno de los dos alelos. Dichos valores se asignaron de igual manera para cada locus. A partir de esta matriz se obtuvo un árbol aditivo no enraizado derivado del algoritmo Neighbor – Joining. Todos los cálculos de distancias y los árboles UPGMA y Neighbor - Joining, se hicieron con el programa NTSYS-pc. 1990. Versión 1.60.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS PARA LEPIDÓPTEROS DEL GÉNERO *Diaphania*.

Luego de evaluar los tratamientos tórax + abdomen y solamente tórax, se decidió tomar este último, ya que proporcionó una buena cantidad de extracto y permitió una buena revelación de las bandas. Con esta decisión se disiparon dudas sobre el efecto del estado reproductivo de las hembras, en cuanto a si poseían o no huevos y también la posibilidad de la interferencia de microorganismos albergados en el abdomen para las funciones de degradación del alimento (Wigglesworth, 1974).

Se usaron indistintamente hembras y machos al no observarse patrones electroforéticos que pudieran sugerir una herencia ligada al sexo. Se asumió por tanto, que estos patrones isoenzimáticos no estaban codificados por genes ligados al sexo, debido a que se obtuvieron genotipos heterocigotos, tanto en hembras como en machos.

El tampón de extracción escogido fue Tris HCl pH 8,0 y la proporción de tejido: tampón 1:3, ya que se presentó buen revelado y buena cantidad de extracto.

De los trece sistemas enzimáticos probados, sólo nueve presentaron bandas de registro objetivo. La combinación sistema isoenzimático – tampón electrodo que dieron mejor resolución de bandas fueron: ***Idh***, ***Me***, ***Mdh***, ***Pgd***, ***Got***, **α -*Est*** con Morfolina Citrato pH 6,1 y la combinación ***Pgi***, ***Adh*** y ***Pgm*** con Histidina Citrato pH 5,7.

Sin embargo, por problemas de reproducibilidad de las bandas en distintas corridas (no todas las enzimas fueron constantes al momento del revelado), se eliminaron siete sistemas: ***Idh***, ***Me***, ***Pgd***, **α -*Est***; ***Pgi***, ***Adh*** y ***Pgm***. Esto sugiere la importancia que tiene para la expresión de las bandas, el tener a disposición

equipos para el mantenimiento de las muestras a temperatura por debajo de -22 °C. Otra posible explicación a los problemas de reproducibilidad es la modificación de la actividad de los sistemas, debido al desarrollo ontogenético de los individuos. Sin embargo, para corroborar esta idea sería conveniente realizar una serie de pruebas isoenzimáticas con individuos provenientes de crías de laboratorio y colectados con trampas de luz, para comparar sí la actividad enzimática es o no modificada por el período de tiempo que tenga el individuo como adulto.

Finalmente se escogieron las enzimas **Mdh** y **Got**, pues con ellas se obtuvo el registro de las bandas para los 96 individuos procesados, representantes de 14 especies (Anexo 1 y 2). Se interpretó el polimorfismo isoenzimático según la acción de un locus (**Mdh** – 1) con nueve alelos en total; esta enzima mostró patrones acordes con una estructura cuaternaria dimérica. Se registró variación isoenzimática que no pudo ser interpretada genéticamente. Para **Got** también se interpretó un sólo locus (**Got** – 1) con quince alelos en total con una estructura cuaternaria monomérica.

En los zimogramas (Anexo 1 y 2) se abrevió el nombre de cada especie de la siguiente manera: *D. hyalinata* (hya), *D. indica* (ind), *D. nitidalis* (nit), *D. clavata* (cla), *D. elegans* (ele), *D. eumeusalis* (eum), *D. euryzonalis* (euz), *D. fumosalis* (fum), *D. hemiecitrals* (hem), *D. lucidalis* (luc), *D. magdalena* (mag), *D. oeditornalis* (oed), *D. oleosalis* (ole) y *D. plumbidorsalis* (plu).

RELACIONES GENÉTICAS DEL GÉNERO *Diaphania*

Las especies *D. hyalinata* y *D. indica* presentaron un mayor grado de semejanzas tanto morfológicas como genéticas entre sí. En la Figura 1 puede observarse que ambas especies se encuentran agrupadas en un mismo ramal. Por otro lado, *D. nitidalis* que es la especie más divergente de las tres, se encuentra en un grupo separado lo cual indica que posee mayor distancia genética para estos loci. Todas estas agrupaciones concuerdan con las realizadas a nivel morfológico (Cuadro 7), por tanto en estas tres especies se mantienen las ideas previas con respecto a las relaciones de este grupo (Clavijo, 1990).

También se observaron las agrupaciones de estas tres especies con *D. euryzonalis*, *D. oleosalis* y *D. fumosalis*. Las especies *D. hyalinata*, *D. indica* y *D. euryzonalis* poseen características morfológicas comunes primeramente por poseer abdomen blanco, de allí su ubicación en el “**Grupo hyalinata (abdomen blanco)**”. *D. nitidalis* y *D. oleosalis* están ubicadas en el “**Grupo nitidalis**” y *D. fumosalis* en el “**Grupo fumosalis**”. Sin embargo en este dendrograma, se observa una concordancia parcial con el agrupamiento morfológico, ya que *D. nitidalis* y *D. fumosalis* se encuentran en un mismo ramal. Este dendrograma sugiere que la diferenciación genética entre las especies representativas de estos dos últimos grupos no es tan grande como la que se observa entre el “**Grupo hyalinata (abdomen blanco)**” y estos.

La matriz de distancias génicas de Nei (1978) presenta las sustituciones alélicas que existen entre *D. hyalinata*, *D. indica*, *D. nitidalis*, *D. euryzonalis*, *D. fumosalis* y *D. oleosalis* (Cuadro 8). Cabe destacar que para el cálculo de dicha matriz no fue posible estimar los valores de *D. nitidalis* - *D. indica* y *D. fumosalis* - *D. indica*, por no presentar alelos compartidos. En promedio existen más de una sustitución alélica por locus, con un rango de variación que va desde 11 sustituciones alélicas por cada 100 loci hasta más de una sustitución por locus. Estos valores son similares a los encontrados en un estudio realizado en especies morfológicamente distinguibles del grupo *Drosophila willistoni*, hallándose que

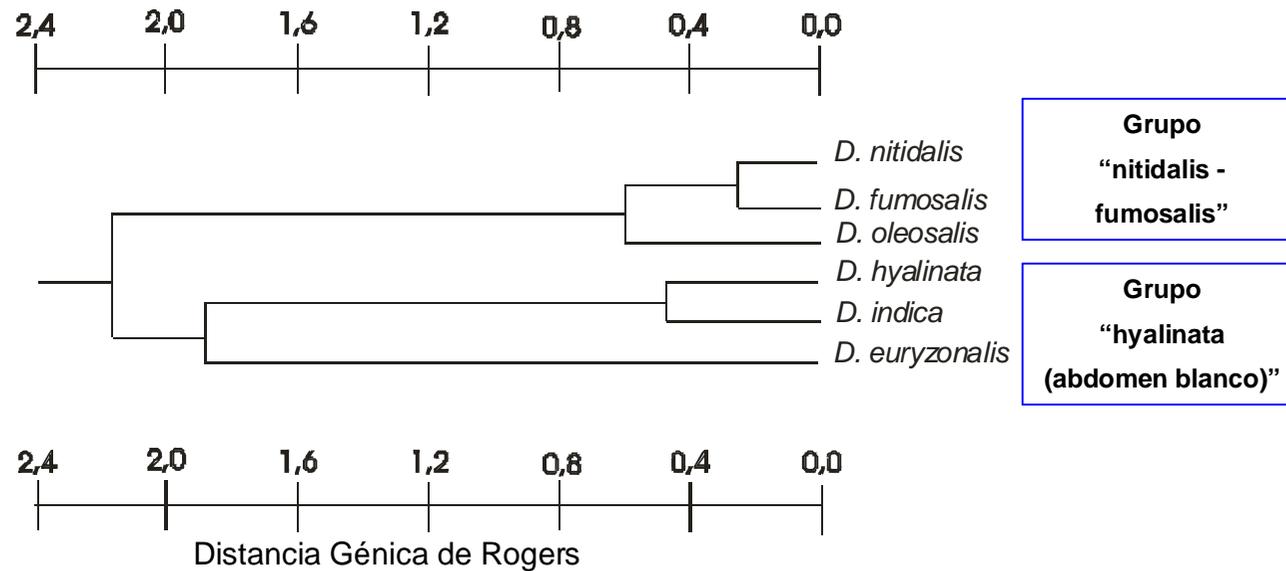


Figura 1. Dendrograma según el método UPGMA basado en la Distancia Génica de Rogers (Wright, 1978) para seis especies del género *Diaphania*.

Cuadro 7. Grupos basados en semejanzas morfológicas de especies del género *Diaphania* colectadas en las localidades bajo estudio.

Agrupaciones y especies	Descripción morfológica
Grupo fumosalis	
<i>D. fumosalis</i>	Ejemplares de coloración castaño claro, al igual que el ala anterior y que presenta dos ventanas preapicales blanco translucido
Grupo hyalinata (abdomen blanco)	
<i>D. hyalinata</i>	Ejemplares con tergos del abdomen blancos y segmentos apicales y/o preapicales castaño
<i>D. indica</i>	
<i>D. euryzonalis</i>	
<i>D. magdalenae</i>	
Grupo hyalinata (abdomen negro)	
<i>D. elegans</i>	Ejemplares con tergos castaño claro a oscuro y con los tergos apicales y/o preapicales castaños
<i>D. lucidalis</i>	
<i>D. oeditornalis</i>	
<i>D. plumbidorsalis</i>	
Grupo nitidalis	
<i>D. nitidalis</i>	Ejemplares con diseño alar amarillo y castaño o castaño oscuro
<i>D. eumeusalis</i>	
<i>D. oleosalis</i>	
<i>D. hemicitralis</i>	
<i>D. clavata</i>	

diferían entre sí en promedio por más de una sustitución alélica por locus $D= 1,058$ (Ayala, 1980). A pesar de que estos valores son preliminares por evaluarse poca cantidad de loci, puede notarse que existe una gran variabilidad entre las especies pertenecientes a ramales distintos $\bar{D}= 2,5$ en comparación con la variabilidad entre especies de un mismo ramal $\bar{D}= 0,23$ (“**Grupo nitidalis**” – “**Grupo fumosalis**”) y $\bar{D}= 1,52$ (“**Grupo hyalinata (abdomen blanco)**”).

En el Cuadro 9 puede observarse el valor de G_{st} entre las seis especies del género *Diaphania*, revelando que existe una diferencia génica promedio del 29,8%. Esto significa que hay un escaso número de alelos no compartidos entre especies, específicamente para los alelos del locus *Mdh* – 1 (*c, h, i*) y del locus *Got* – 1 (*d, g, h, j, m*) (Cuadro 10 y 11).

Para varias de las especies evaluadas sólo se pudo disponer de un individuo. Sin embargo, fue posible ubicar a estos individuos en grupos a los cuales pertenecen según sus características morfológicas (Figura 2). Deben tomarse con cautela estos agrupamientos debido a la gran variabilidad alélica que presentan otras especies con más de seis individuos analizados, ya que muchos alelos pueden no estar representados en estos individuos, es decir, sería necesario evaluar una mayor cantidad de individuos para afirmar su agrupación en el dendrograma.

Puede verse que no hay solapamiento de los agrupamientos de los individuos de las especies *D. hyalinata* y *D. indica*. Estas se mantuvieron juntas entre sí y separadas de *D. nitidalis*, concordando con las investigaciones realizadas a nivel morfológico (Clavijo, 1990), donde se establece la cercanía de las dos primeras especies mencionadas y la ubicación de *D. nitidalis* separada de éstas. Esto indica que los genotipos de esos dos grandes grupos “**Grupo hyalinata**” y “**Grupo nitidalis - fumosalis**” tienden a ser más diferentes entre individuos de grupos distintos que entre individuos de un mismo grupo, tal como lo indica la Figura 2.

Como otro punto de la investigación se trató de detectar la existencia de marcadores taxonómicos para las especies del género *Diaphania*. Un marcador

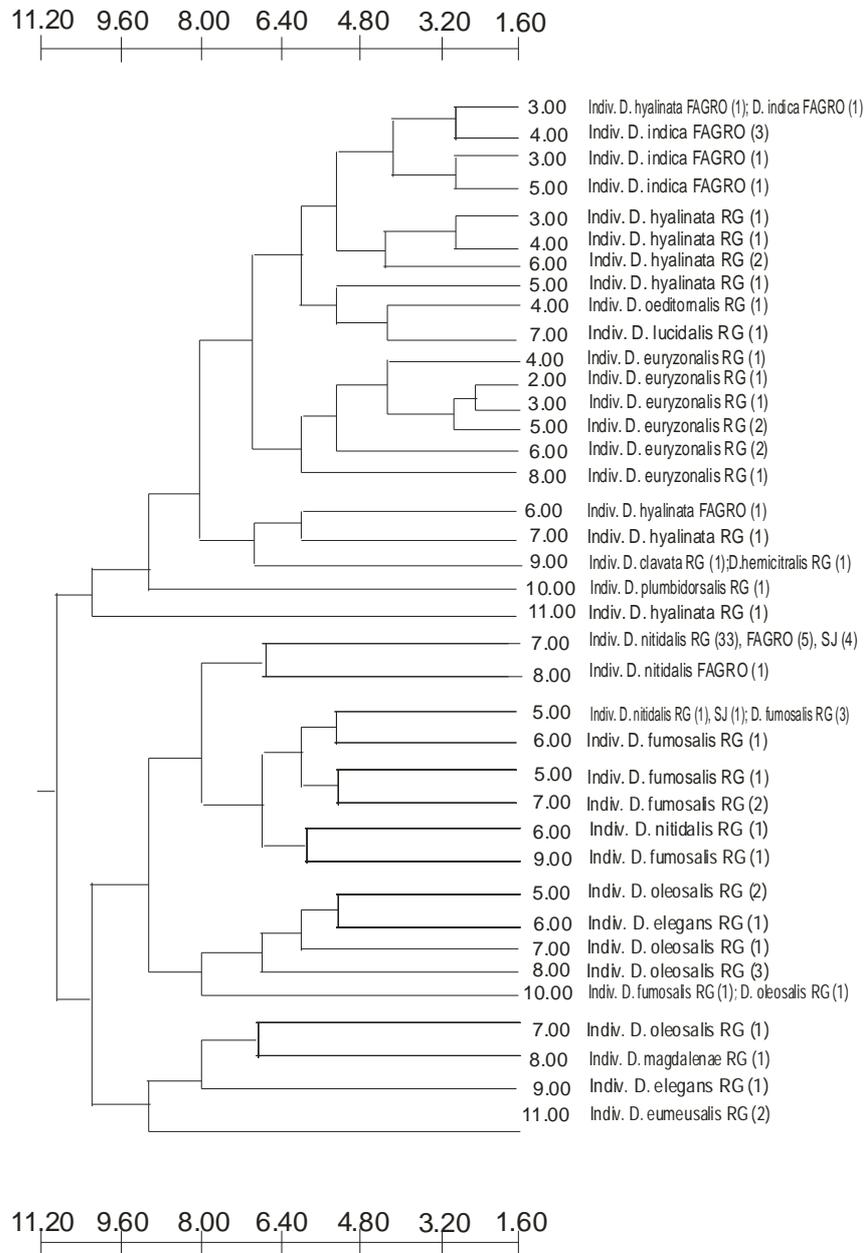
taxonómico debe ser un alelo fijado (presente en 100% de los individuos con una frecuencia alélica = 1) y no presentarse en las otras especies. De acuerdo a ello, ningún alelo presenta dicha característica. Para las seis especies con una cantidad mayor o igual a 6 individuos se observan alelos que pudieran servir como marcadores taxonómicos, pero al comparar estas especies con el resto se observa que comparten alelos. Por otro lado, algunas especies en las que se evaluó un sólo individuo, presentan alelos no compartidos pero puede ser que la especie presente variabilidad que no se haya detectado (Cuadro 12 y 13).

Cuadro 8. Distancia génica de Nei (1978) para seis especies del género *Diaphania* colectadas en tres localidades de Venezuela.

Especies	<i>D. nitidalis</i>	<i>D. hyalinata</i>	<i>D. indica</i>	<i>D. euryzonalis</i>	<i>D. fumosalis</i>	<i>D. oleosalis</i>
<i>D. nitidalis</i>	0					
<i>D. hyalinata</i>	1,7719	0				
<i>D. indica</i>	-	0,2381	0			
<i>D. euryzonalis</i>	3,8371	1,9543	2,3871	0		
<i>D. fumosalis</i>	0,1189	2,0049	-	3,3905	0	
<i>D. oleosalis</i>	0,3055	1,8721	2,4104	2,6262	0,2632	0

Cuadro 9. Índice de Diversidad Génica de Nei (1973) para seis especies del género *Diaphania*.

Locus	Ht	Hs	Dst	Gst
<i>Mdh</i> -1	0,443802	0,2046		
<i>Got</i> - 1	0,77563	0,65148		
Prom.	0,610	0,428	0,182	0,298



Grupo "hyalinata"

Grupo "nitidalis" - "fumosalis"

Distancia Génica de Prevosti

() = N° de individuos en esa rama.

Figura 2. Dendrograma derivado de la Distancia Génica de Prevosti (Wright, 1978) por el método Neighbor-joining, representando a los 96 individuos del género *Diaphania* colectados en las tres localidades de Venezuela.

Cuadro 12. Conteos genotípicos del locus *Mdh* - 1 de las especies del género *Diaphania* colectadas en tres localidades de Venezuela.

Especies	Nº ind	Localidad	Genotipos										
			<i>ac</i>	<i>bb</i>	<i>bh</i>	<i>bi</i>	<i>cc</i>	<i>cf</i>	<i>ci</i>	<i>dh</i>	<i>ee</i>	<i>gg</i>	<i>hh</i>
<i>D. hyalinata</i>	2	FAGRO				1			1				
<i>D. indica</i>	6						2		4				
<i>D. nitidalis</i>	6											6	
<i>D. nitidalis</i>	13	San Javier									13		
<i>D. hyalinata</i>	7	Estación Biológica			1	1			5				
<i>D. nitidalis</i>	27											27	
<i>D. clavata</i>	1			1									
<i>D. elegans</i>	2											2	
<i>D. eumeusalis</i>	2												2
<i>D. euryzonalis</i>	8										8		
<i>D. fumosalis</i>	9								1			8	
<i>D. hemicitralis</i>	1			1									
<i>D. lucidalis</i>	1			1									
<i>D. magdalенаe</i>	1										1		
<i>D. oeditornalis</i>	1							1					
<i>D. oleosalis</i>	8											8	
<i>D. plumbidorsalis</i>	1						1						

Cuadro 13. Conteos genotípicos del locus **Got** - 1 de las especies del género *Diaphania* colectadas en tres localidades de Venezuela.

Especies	Nº ind	Localidad	Genotipos																
			aa	bb	bg	cd	ch	cj	dd	dh	dj	dk	ek	em	ff	gg	gi	gj	gk
<i>D. hyalinata</i>	2	FAGRO												1					
<i>D. indica</i>	6									4									
<i>D. nitidalis</i>	6																		
<i>D. nitidalis</i>	13	San Javier																	
<i>D. hyalinata</i>	7	Estación Biológica							1			1				1	2	1	
<i>D. nitidalis</i>	27																		
<i>D. clavata</i>	1																		
<i>D. elegans</i>	2				1					1									
<i>D. eumeusalis</i>	2			2															
<i>D. euryzonalis</i>	8			2							1				1	1		2	
<i>D. fumosalis</i>	9												1						
<i>D. hemicitralis</i>	1																		
<i>D. lucidalis</i>	1																		
<i>D. magdalенаe</i>	1														1				

VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL GÉNERO *Diaphania*

En el Cuadro 14 puede notarse que *D. hyalinata* se destaca como la especie con mayor variabilidad genética comparada con las especies *D. indica*, *D. nitidalis*, *D. euryzonalis*, *D. fumosalis* y *D. oleosalis*. *D. hyalinata* presenta un número de alelos promedio por locus $A = 6,5$ lo cual señala que esta especie posee una gran riqueza alélica. Por otro lado, el índice de diversidad génica de Nei (1973) (H) indica que existe una probabilidad de 0,72 de encontrar dos alelos distintos en esta especie, siendo la mayor probabilidad entre las citadas especies. Las otras especies presentan probabilidades de encontrar alelos distintos en un rango que oscila desde 44 % hasta 26%. Esta situación explica los valores obtenidos para el coeficiente de diferenciación genética G_{ST} (Cuadro 9), indicando que existe 71% ($1 - G_{ST} = 0,71$) de probabilidad de encontrar alelos distintos dentro de las especies ó también puede interpretarse como el porcentaje de la diversidad génica total conseguida dentro de las especies.

Por otra parte, en las quince especies evaluadas se obtuvieron varios genotipos para ambos loci (Cuadro 12 y 13). Se observan individuos de distintas especies que poseen un mismo genotipo e individuos de la misma especie con diferentes genotipos. Esto señala que el género *Diaphania* presenta una gran variabilidad genética. Por tanto, es arriesgado asumir para las especies con un sólo individuo que el genotipo que presentaron es el único que posee esa especie. La información genotípica obtenida es un basamento para las futuras investigaciones isoenzimáticas que se realicen del género.

Cuadro 14. Alelos presentes en los loci *Mdh* – 1 y *Got* – 1, número promedio de alelos por locus (**A**), diversidad génica de Nei (1973) (**H**), heterocigocidad observada (**Ho**) y Homocigocidad observada (**1-Ho**) de las especies del género *Diaphania* colectadas en tres localidades de Venezuela.

Especies	Nº indiv.	<i>Mdh</i> - 1	<i>Got</i> - 1	A	H	Ho	1-Ho
<i>D. hyalinata</i>	9	<i>b c h i</i>	<i>d e f g h i j k m</i>	6,5	0,72	1,0	0
<i>D. indica</i>	6	<i>c i</i>	<i>d j</i>	2	0,44	0,67	0,33
<i>D. nitidalis</i>	46	<i>h</i>	<i>k l m n</i>	2,5	0,26	0,47	0,52
<i>D. clavata</i>	1	<i>b</i>	<i>i</i>	-	-	-	-
<i>D. elegans</i>	1	<i>h</i>	<i>b d g j</i>	-	-	-	-
<i>D. eumeusalis</i>	2	<i>h i</i>	<i>b</i>	-	-	-	-
<i>D. euryzonalis</i>	8	<i>g</i>	<i>a d g h i j k</i>	4	0,41	0,12	0,88
<i>D. fumosalis</i>	9	<i>d h</i>	<i>e h l m o</i>	3,5	0,35	0,33	0,67
<i>D. hemicitralis</i>	1	<i>b</i>	<i>i</i>	-	-	-	-
<i>D. lucidalis</i>	1	<i>a c</i>	<i>h k</i>	-	-	-	-
<i>D. magdalenae</i>	1	<i>e</i>	<i>g</i>	-	-	-	-
<i>D. oeditornalis</i>	1	<i>c f</i>	<i>h j</i>	-	-	-	-
<i>D. oleosalis</i>	8	<i>h</i>	<i>c d g h o</i>	3	0,35	0,25	0,75
<i>D. plumbidorsalis</i>	1	<i>c</i>	<i>c j</i>	-	-	-	-

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Diaphania nitidalis*

Para el locus **Mdh** – 1 se obtuvo un sólo genotipo en los 46 individuos evaluados pertenecientes a las tres poblaciones, el cual fue designado “hh”. Por lo tanto, no se observó variación ni dentro ni entre localidades.

Para el locus **Got** - 1 la especie presentó polimorfismo (Cuadro 15). El heterocigoto “km” estuvo presente en 42 individuos, representando un 92% de toda la población (Figura 3). Este comportamiento se podría explicar mediante un polimorfismo estable, basado en la hipótesis de que se está en presencia de una inversión cromosómica con un sistema doble de alelos letales en posición trans. Dentro de dicha inversión, se encontraría el locus de la **Got-1** en condición heterocigótica “km” (Figura 4). No se producirían gametas recombinantes dentro de la inversión cromosómica, quedando estos alelos permanentemente ligados. En base a esto se especula la existencia de un par de cromosomas con dos alelos letales. Cuando ocurre la condición homocigota recesiva de los alelos “rr” y “ll”, la condición es letal. La presencia de los alelos “rr” y “ll” tendrían coeficiente de selección igual a 1,0 (muerte del individuo) y la presencia de “R₋” y “L₋” con coeficiente de selección igual a cero. Por tanto en un cromosoma que presente los alelos “L, k, r” y su homólogo “L, k, r”, por estar la presencia del homocigoto recesivo “rr” provocará la muerte del individuo. Si se esta en presencia del homocigoto recesivo “l, m, R” y su homólogo “l, m, R” de igual manera los individuos morirán. En este planteamiento se asume que los individuos “l, m, R / L, k, r” son los únicos que sobrevivirían.

Es probable que ocurra una baja tasa de recombinación que genere la gameta con los alelos “L, m, R” en un cromosoma. En este caso, el individuo homocigoto para “mm” sería viable para los loci L y R, lo cual explicaría la presencia de 2 individuos con este genotipo (Figura 5).

Cuadro 15. Frecuencias alélicas y genotípicas de *D. nitidalis* para los loci **Mdh** – 1 y **Got** - 1 por localidad.

Localidad	Nº individuos	Frecuencias									
		Mdh - 1		Got - 1							
		Alélicas	Genotípicas	Alélicas				Genotípicas			
		<i>h</i>	<i>hh</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>km</i>	<i>kn</i>	<i>ll</i>	<i>mm</i>
FAGRO	6	1	1	0,5	0	0,416	0,083	0,83	0,17	0	0
Estación Biológica	27	1	1	0,462	0,04	0,5	0	0,92	0	0,04	0,04
San Javier	13	1	1	0,46	0	0,54	0	0,92	0	0	0,08

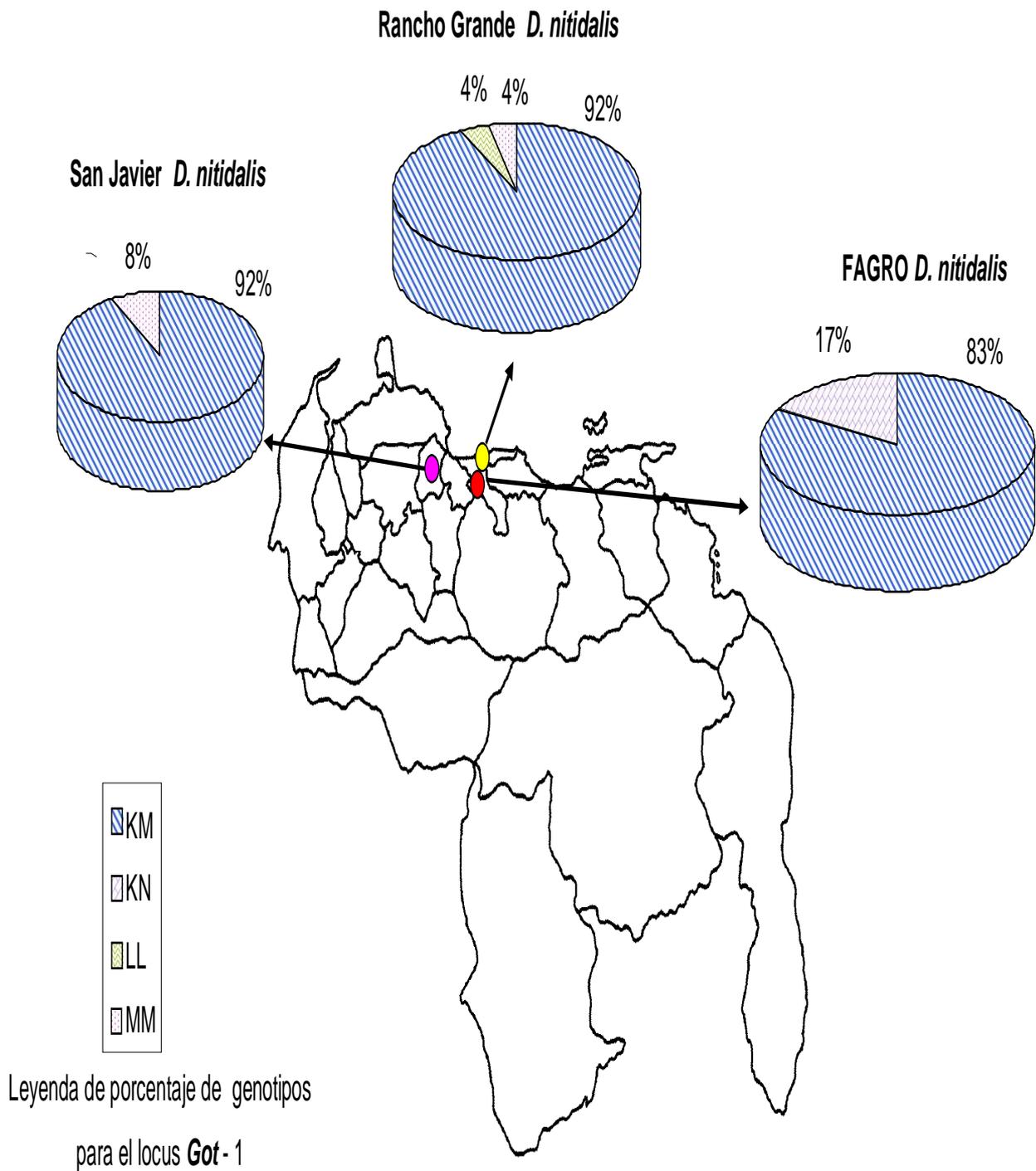


Figura 3. Señalización de localidades de colecta de las especies del género *Diaphania* y gráficos de distribución de porcentaje para genotipos de la especie *D. nitidalis* en el locus *Got*-1.

♂ Gametas	♀ Gametas	
	<i>L K r</i>	<i>I M R</i>
<i>L K r</i>	<i>L K r</i>	<i>I M R</i>
	<i>L K r</i> (mueren)	<i>L K r</i> (viven)
<i>I M R</i>	<i>L K r</i>	<i>I M R</i>
	<i>I M R</i> (viven)	<i>I M R</i> (mueren)

Figura 4. Hipótesis de la herencia de letales balanceados para la especie *Diaphania nitidalis*.

♂ Gametas	♀ Gametas	
	<i>L m R</i>	<i>I k r</i>
<i>L m R</i>	<i>L m R</i>	<i>I k r</i>
	<i>L m R</i> (viven)	<i>L m R</i> (viven)
<i>I k r</i>	<i>L m R</i>	<i>I k r</i>
	<i>I k r</i> (viven)	<i>I k r</i> (mueren)

Figura 5. Hipótesis de la herencia de letales balanceados con probabilidad de una baja tasa de recombinación para la especie *Diaphania nitidalis*.

En *Drosophila pseudoobscura*, *D. melanogaster* y en otras especies del género, se han encontrado inversiones cromosómicas que favorecen a los heterocigotos más que a homocigotos produciendo un aumento de la viabilidad y fecundidad. De igual manera en los dípteros *Cnephia mutata*, *Lonchoptera dubia*, *Limnophyes virgo*, en himenópteros de la especie *Devorgilla canescens* y en ortópteros de la especie *Moraba virgo*, se ha reportado polimorfismo estable a causa de alelos letales conservados por inversiones cromosómicas (Carson, 1967; Futuyma, 1986).

El polimorfismo estable o balanceado es frecuentemente visto en la naturaleza, donde individuos heterocigotos son más frecuentes en las poblaciones que los homocigotos, lo cual ocurre como consecuencia de la fijación de alelos que presentan algún tipo de ventaja adaptativa. En líneas generales varias formas de selección natural pueden lograr el mantenimiento de polimorfismo estable o balanceado, por ejemplo sí hay competencia por diferentes recursos para los cuales diferentes genotipos son diferencialmente adaptados, la selección tiene un componente de frecuencias dependientes que ayuda a estabilizar el polimorfismo. Un ejemplo de polimorfismo estable es el de *Tisbe reticulata* copépodo marino cuyo polimorfismo es uno de los mejores casos de superioridad de los heterocigotos y que en esta especie los efectos de sobrevivencia que posee un gen puede no deberse a una manifestación obvia morfológica. Otras posibles explicaciones para el polimorfismo estable son la selección a favor de los heterocigotos y el efecto “*hitchhiking*” (Ayala, 1980; Futuyma, 1986).

CONCLUSIÓN

- ✓ Se ajustó un protocolo de isoenzimas para los lepidópteros del género *Diaphania*. Las combinación sistema isoenzimático – tampón electrodo con mejores resultados fueron: ***Idh, Me, Mdh, Pgd, Got, α- Est*** con Morfolina Citrato pH 6,1 y la combinación ***Pgi, Adh y Pgm*** con Histidina Citrato pH 5,7. Por problemas de reproducibilidad, sólo dos de estas enzimas ***Mdh*** y ***Got*** permitieron analizar los 96 individuos pertenecientes a las catorce especies del género provenientes de distintas las localidades de colecta. Se registró actividad enzimática para dos loci: ***Mdh*** – 1 y ***Got*** – 1.
- ✓ Fue posible establecer relaciones de semejanzas genética entre *D. hyalinata*, *D. indica* y *D. nitidalis*, las cuales concuerdan con la hipótesis planteada en función de la morfología. Se encontró mayor grado de semejanzas genéticas entre *D. hyalinata* y *D. indica*, que con *D. nitidalis*.
- ✓ El análisis de frecuencia alélicas agrupó a las especies *D. hyalinata*, *D. indica* y *D. euryzonalis* en una rama del dendrograma y las otras en otro ramal. Estos agrupamientos coinciden con las agrupaciones según los grupos morfológicos establecidos para esta investigación.
- ✓ Se observaron dos grandes grupos en el dendrograma de distancias génicas de Prevosti, ubicando a la mayoría de los individuos del “**Grupo hyalinata**” en un mismo ramal y los individuos de los grupos “**fumosalis**” y “**nitidalis**” en otro. A pesar del poco número de individuos evaluados en algunas especies, las semejanzas genéticas concuerdan con las semejanzas morfológicas previamente establecidas en este trabajo.
- ✓ La variabilidad génica total de las especies *D. indica*, *D. nitidalis*, *D. euryzonalis*, *D. fumosalis* y *D. oleosalis*. *D. hyalinata*, se descompuso en un 29,8% entre especies y 71% dentro especies. Estas diferencias genéticas fueron mayores entre especies de grupos morfológicos distintos que entre especies dentro de un mismo grupo, a juzgar por los valores promedios de la distancia génica de Nei.

- ✓ No fue posible caracterizar la estructura genética de *D. nitidalis* con el locus **Mdh** – 1 debido a que fue monomórfico. Para el locus **Got** – 1 existe polimorfismo, sin embargo no fue factible determinar la estructura poblacional. Esto se debe a la similitud de las frecuencias alélicas en las tres poblaciones. Dicha situación puede ser motivada por condiciones que favorezcan a los heterocigotos, como podría ser la existencia de alelos letales preservados en la especie por una inversión cromosómica.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ARIAS, Q. y CLAVIJO, J. A. 2001. Clave pictórica de las especies *Diaphania* Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE). Entomotropica. Vol. 16(1):1-13
- AVISE, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall. USA. 511 p.
- AYALA, F. 1980. Evolución molecular. Ediciones Omega. Barcelona. 285 p.
- BADER, J.M. 1998. Measuring genetic variability in natural populations by allozyme electrophoresis. Tested studies for laboratory teaching. Proceedings of the 19th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).19:25 - 42.
- BERTORELLI, M. y CLAVIJO, J. 1995. *Diaphania indica* (Saunders) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE): Plaga en una plantación comercial de melón, *Cucumis melo* L., en el estado Anzoátegui, Venezuela. Agronomía Tropical. 46(2): 233 - 235.
- CARSON, H. 1967. Permanent heterocigosity. En: Evolutionary biology Vol I. Dobzhansky, T.; Heckt, M.; Steere, W. (Eds). North-Holland Publishing Company. Amsterdam. 143 – 168.
- CASSEL, A & TAMMARU, T. 2002. Allozyme variability in central, peripheral and isolated populations scare heath (*Coenonympha hero*: LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE); implications for conservation. Conservation genetics. 00:1 -11.
- CLAVIJO, J. 1990. Systematics of black and white species of the genus *Diaphania* Hübner (1818) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE: PYRAUSTINAE). [Ph D Diss] Montreal McGill University. 276 p.
- CLAVIJO, J.; MUNROE, E. y ARIAS, Q. 1995. El género *Diaphania* Hübner (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE): clave para las especies de importancia económica. Agronomía Tropical. 45(3): 347 - 358.

- DÍAZ, A. J. 1997. Metodología electroforética, interpretación genética y diversidad isoenzimática en el ajonjolí (*Sesamun indicum* L.). Tesis de grado para optar al título de *Magíster Scientiarum* en Agronomía. Maracay. Universidad Central de Venezuela. 162 p.
- DÍAZ, A. J. 2002. Marcadores moleculares: Estadística básica. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 84 p.
- DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.; STEBBINS, L. & VALENTINE, M. 1980. Evolution. Universidad de California. Ediciones Omega S.A. 450 p.
- FUTUYMA, D. 1986. Evolutionary biology. 2 ed. Sinauer Associates. 600 p.
- GAMBOA, M. G. 2000. Insectos plagas asociados a las cucurbitáceas en Venezuela con énfasis en el cultivo del melón, *Cucumis melo* (L.). Tesis Ingeniero Agrónomo. Maracay, Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 106 p.
- GEIGER, H. 1980. Enzyme electrophoretic studies on the genetic relationships of pierid butterflies (LEPIDOPTERA: PIERIDAE) I. European taxa. Journal of Research on the Lepidoptera. 19(4):181-195.
- HAGEN, R. H. & SCRIBER, J.M. 1991. Systematics of the *Papilio glaucus* and *Papilio troilus* species groups (LEPIDOPTERA: PAPILIONIDAE): inferences from allozymes. Annals Entomology Society American. 84: 380 – 395.
- HOLDRIGE, L. 1978. Ecología en zonas de vida. Organización de Estados Americanos (OEA). Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (San José de Costa Rica). 60 p.
- JOHANNENSEN, J.; VEITH, M. & SEITZ, A. 1996. Population genetic structure of the butterfly *Melitaea didyma* (NYMPHALIDAE) along a northern distribution range border. Molecular ecology. 5: 259-267.
- JOHNSON, K.; SNIDER, D. & SCRIBER, J. 1996. Estimates of genetic differentiation among *Callosamia* species and *Hyalophora cecropia* (SATURNIIDAE) using allozyme electrophoresis. Journal of the Lepidopterists' Society. 50 (3): 217-225.

- KELLEY, S.; FARRELL, B. & MITTON, J. 2000. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. *Heredity*. 84:218-227.
- LOXDALE, H. D. & LUSHAI, G. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*. (E.E.U.U.) 88: 577 – 600.
- LOXDALE, H.D.;BROOKES, C.P.; WYNNE, I.R. & CLARK S.J. 1998. Genetic variability within and between English populations of the damson-hop aphid, *Phorodon humuli* (HEMIPTERA: APHIDIDAE) with special reference to esterases associated with insecticide resistance. *Bulletin of Entomological Research*. (E.E.U.U.) 88: 513 – 5265.
- MARCANO F. Y LANDÍNEZ N. 1997. Labranza y sistemas de siembra para la producción del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en un aquíc ustropepts del estado Yaracuy. *Bioagro*. 9(3): 86-94.
- MEFFE, G.K. & CARROLL,C.R. 1994. Principles of conservation biology. 1º ed. SINAUER ASSOCIATES,INC. USA. 600 p.
- MEGLÉCZ, E.; PECSENYE, K.;VARGA, Z.& SOLIGNAO, M. 1998. Comparison of differentiation pattern at allozyme and microsatellite loci in *Parnassius mnemosyne* (LEPIDOPTERA) populations. *Hereditas* 128:95 – 103.
- MORENO, C. E. 2001 Métodos para medir la biodiversidad. M &T- Manuales y tesis SEA. Zaragoza. Vol. 1. 84 p.
- MUNROE, E. 1995. Pyraustinae. En: Heppner, editor. Atlas of Neotropical Lepidoptera, Checklist Part II. Gainesville (Florida): Association for Tropical Lepidoptera; Scient Publ. 53 – 79.
- NEI, M. 1973. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 105: 385 – 398 [8,10].
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NIBOUCHE, S.; BUÉS, R.; TOUBON, J. F.& POITOUT, S. 1998. Allozyme polymorphism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

- (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): comparison of African and European populations. *Heredity*. 80:438 – 445.
- NTSYS-pc. 1990. Versión 1.60. Applied Biostatistics, Inc.
 - PASHLEY, D. P. 1983. Biosystematic study in Tortricidae (LEPIDOPTERA), with a note on evolutionary rates of allozymes. *Annals Entomology Society American*. 76:139 – 148.
 - PHILLIPS, E. ¿Cuál es la relación de las mariposas nocturnas y la luna? (24 de Julio de 2004). INBio. Septiembre 2003. [On line] <http://www.cientec.or.cr/ambiente/mariposa.html>
 - PORTER, A. & MATTOON, S. 1989. A new subspecies of *Coenonympha tullia* (Müller) (NYMPHALIDAE: SATYRINAE) confined to the coastal dunes of Northern California. *Journal of the Lepidopterists' Society*
 - PORTER, A. & MUELLER, J. 1998. Partial genetic isolation between *Phyciodes tharos* and *P. cocyta* (NYMPHALIDAE). *Journal of the Lepidopterists' Society*. 52(2):182-205.
 - QUICKE, D.L.J. 1993. Principles and techniques of contemporary taxonomy. 1 ed. E.E.U.U., Blackie academic & Professional. 550 p.
 - REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA. Servicio de meteorología de la aviación. (5 de Enero de 2003). Resumen climatológico año 1991, Estación: Maracay. [on line]. <http://www.meteorologia.mil.ve/climatologia/resumen.html>
 - SHAPIRO, A. & GEIGER, H. 1989. Electrophoretic comparisons of vicariant *Vanesa*: genetic differentiation between *V. annabella* and *V. carye* (NYMPHALIDAE) since the great american interchange. *Journal of the Lepidopterists' Society*. 43(2):81-82.
 - SMITH, D. & GLENN, T. 1995. Allozyme polymorphisms in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*. 86:12-16.
 - SWOFFORD, D.; OLSEN, G.; WADDELL, P & HILLIS, D. 1996. Phylogenetic inference. En: *Molecular systematics*. 2 ed. Sinauer Associates. 655 p.

- VANDEWOESTIJNE, S.; NÉVE, G. & BAGUETTE, M. 1999. Spatial and temporal population genetic structure of butterfly *Aglais urticae* L. (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE). *Molecular Ecology*. 8: 1539 – 1543.
- VIEIRA, M. 1994. Estudio de las fluctuaciones poblacionales de algunas de las especies del género *Diaphania* (Hübner) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE: PYRAUSTINAE) en Rancho Grande, P.N.H.P., Estado Aragua, Venezuela. Tesis Ingeniero Agrónomo. Maracay, Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 108 p.
- WIGGLESWORTH, V. B. 1974. *Insect Physiology*. 7 ed. Chapman and Hall. London. 166 p.
- WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*, Vol. 4. Variability within and among populations. U. Chicago Press. Chicago.

ANEXOS

M.r.

1

0.83

0.65

0.5

0.48

0.46

0.37

0.35

0.32

0.26

0.2

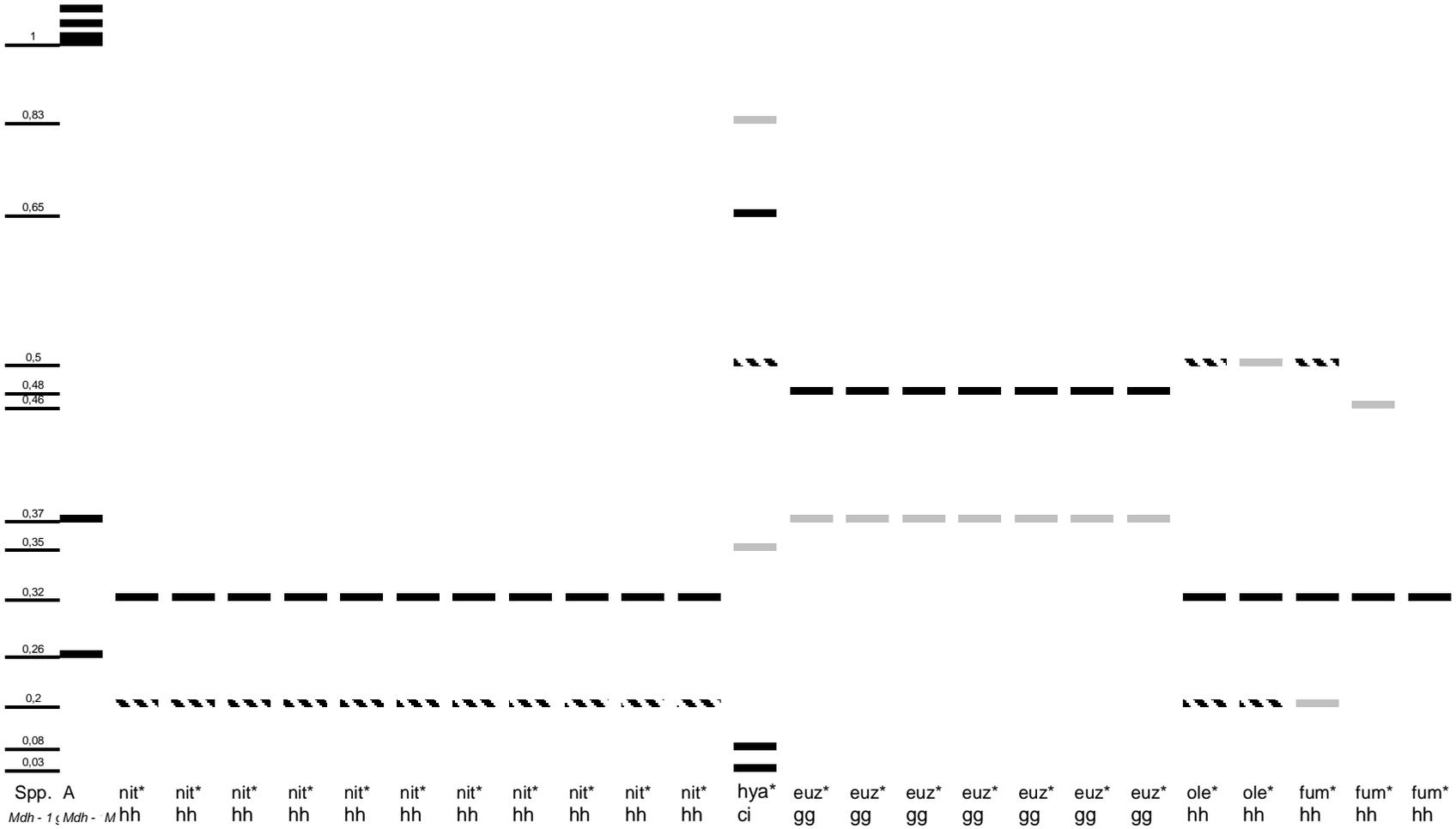
0.08

0.03

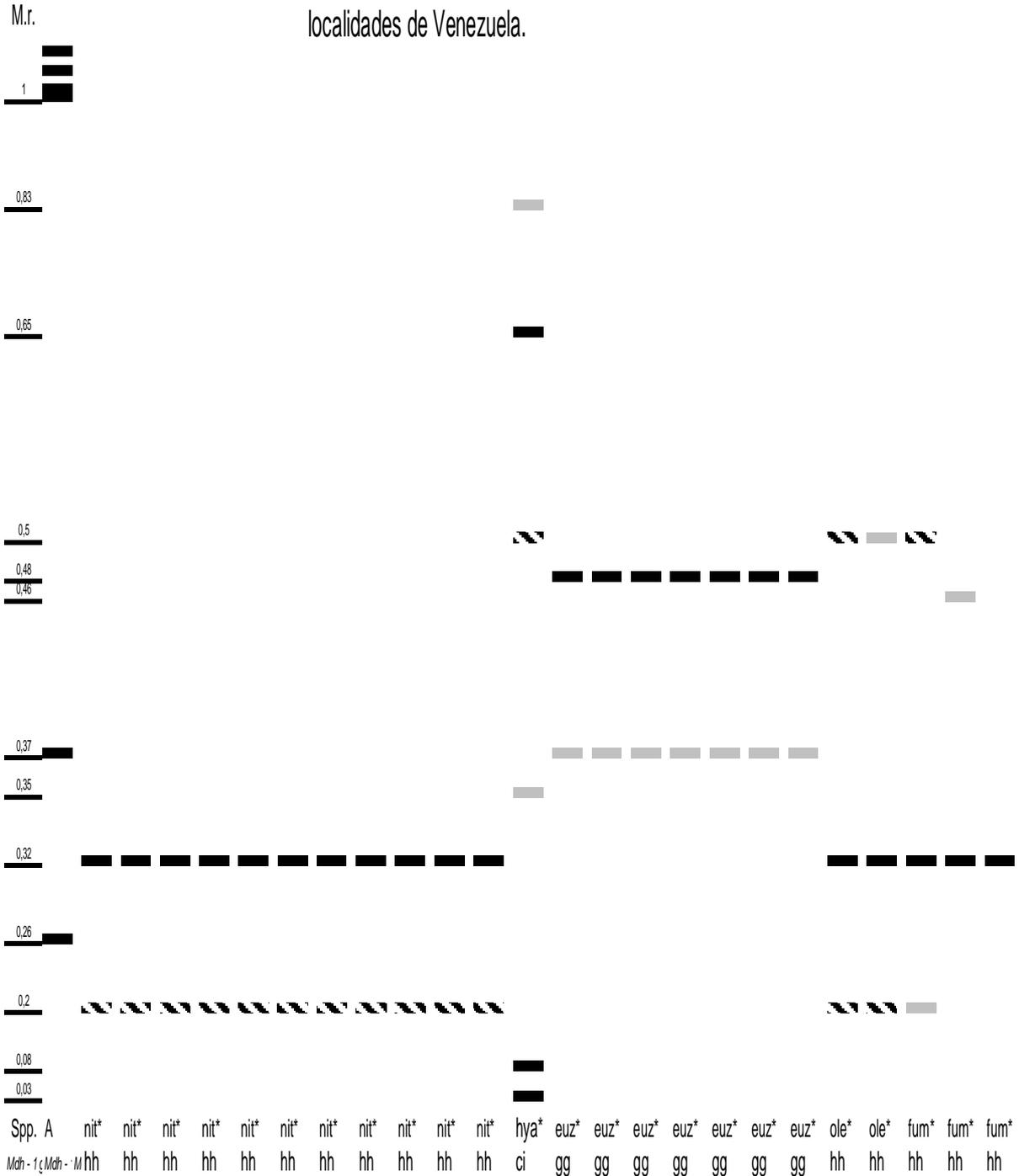
Spp. A	nit*	hya*	euz*	ole*	ole*	fum*	fum*	fum*																	
<i>Mdh-1</i> ξ <i>Mdh-1</i>	hh	ci	gg	hh	hh	hh	hh	hh																	

Individuo FAGRO Individuo Rancho Grande * Individuos San Javier 0

— Bandas interpretadas



Anexo 1. Zimograma del sistema isoenzimático *Mdh - 1* para los individuos del género *Diaphania* colectados en las tres localidades de Venezuela.

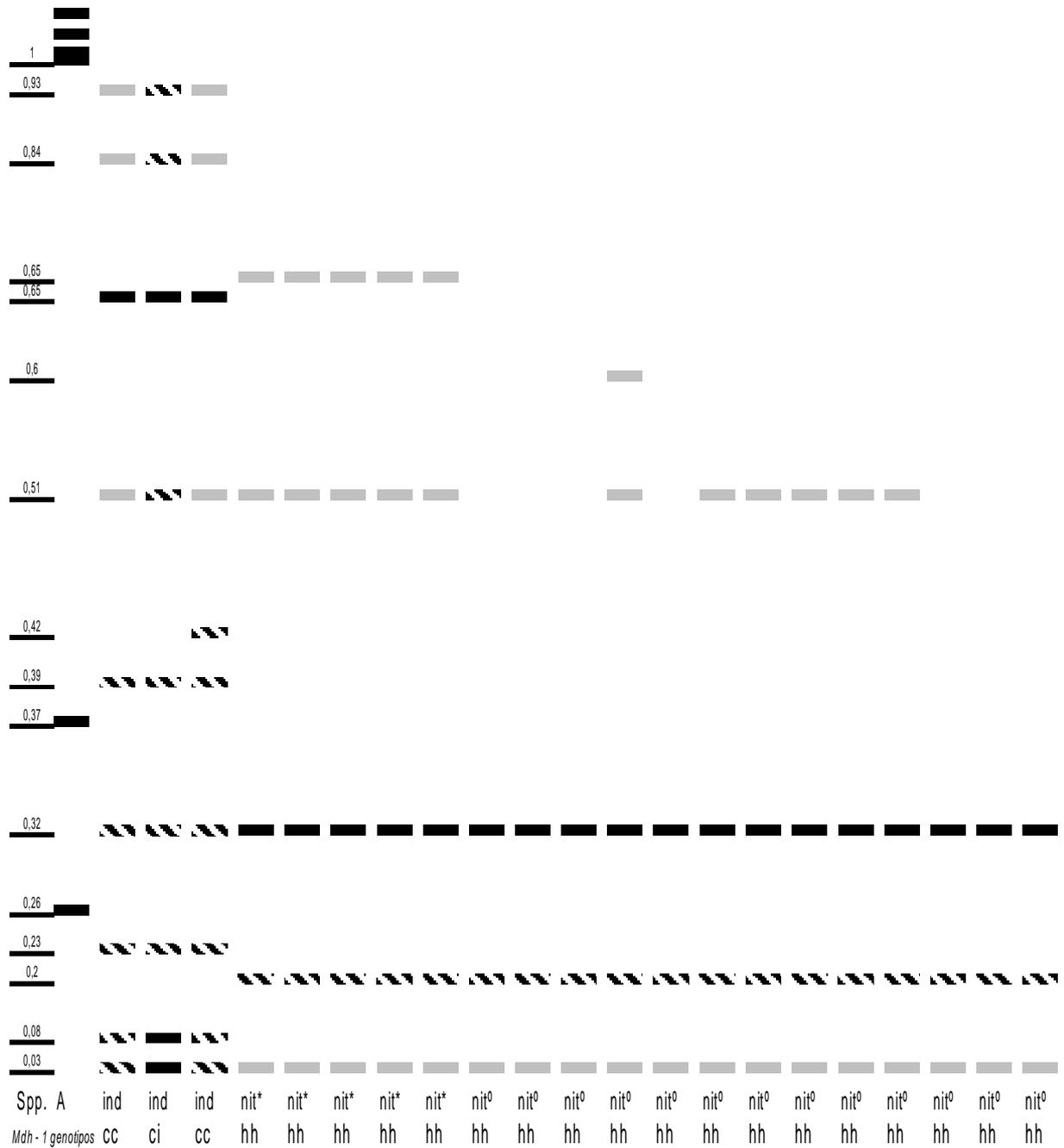


Individuo FAGRO Individuo Rancho Grande * Individuos San Javier⁰

— Bandas interpretadas

Anexo 1. Continuación...

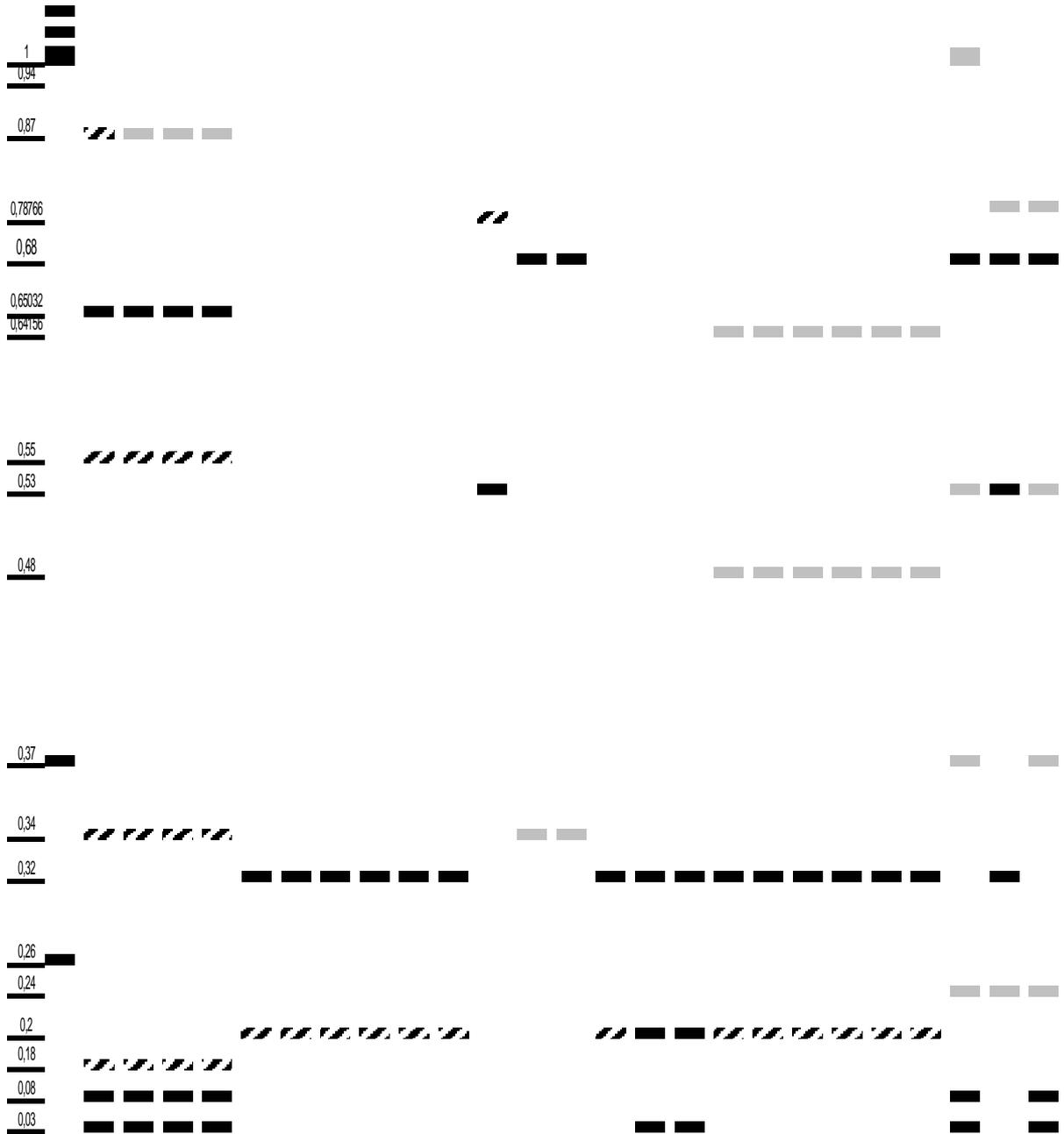
M.r.



Individuo FAGRO Individuo Rancho Grande * Individuos San Javier 0

■ Bandas interpretadas

M.r. 1. Continuación...

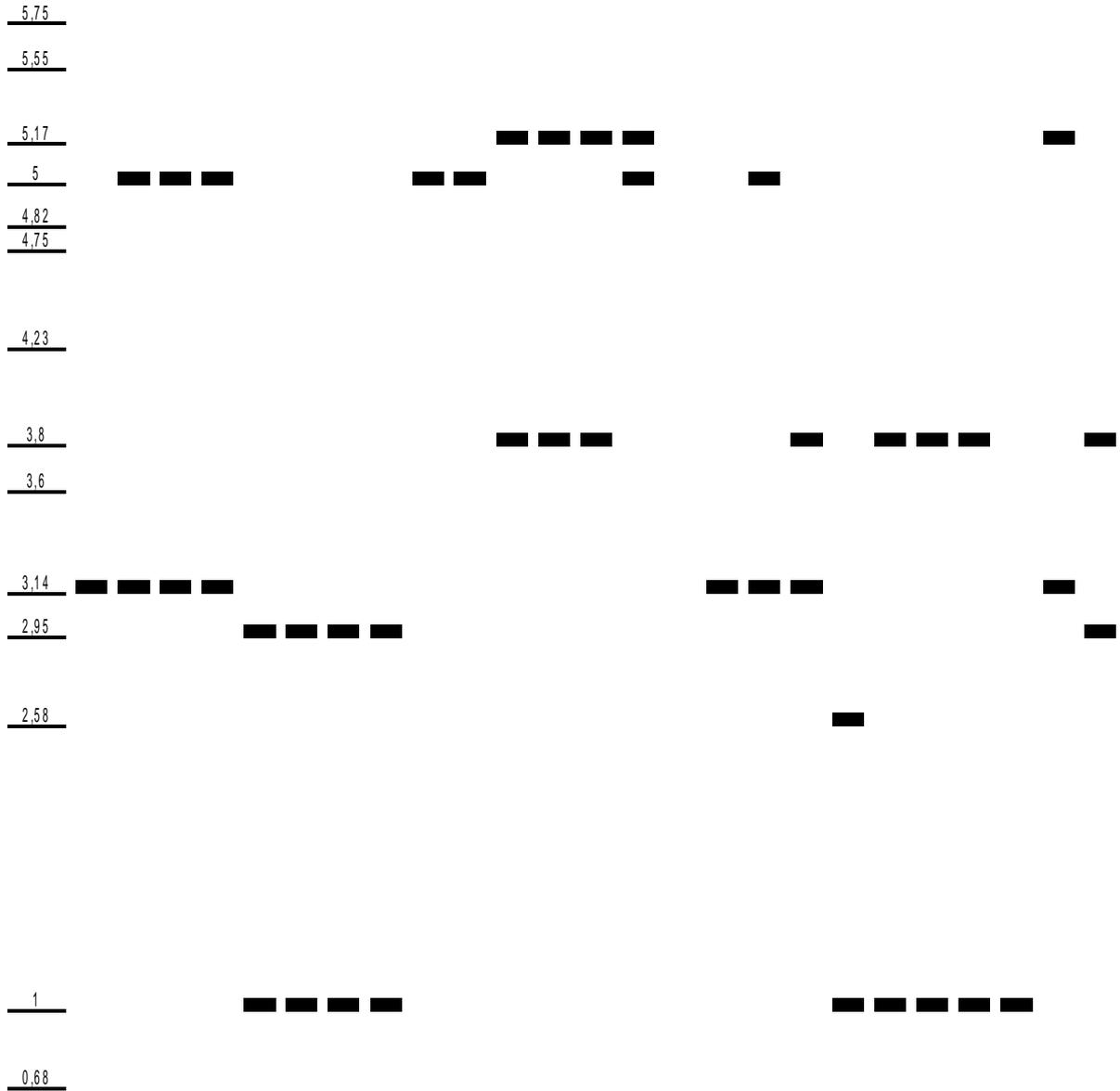


Spp. A hya* hya* hya* hya* nit* nit* nit* nit* nit* nit* mag* cla* hem* ele* eum* eum* nit* nit* nit* nit* nit* nit* hya hya* hya*
 Mth-1 genotipos ci ci ci ci hh hh hh hh hh hh ee bb bb hh hi hi hh hh hh hh hh hh bi bh bi

Individuo FAGRO Individuo Rancho Grande * Individuos San Javier 0

■ Bandas interpretadas

M.r. 1. Continuación...

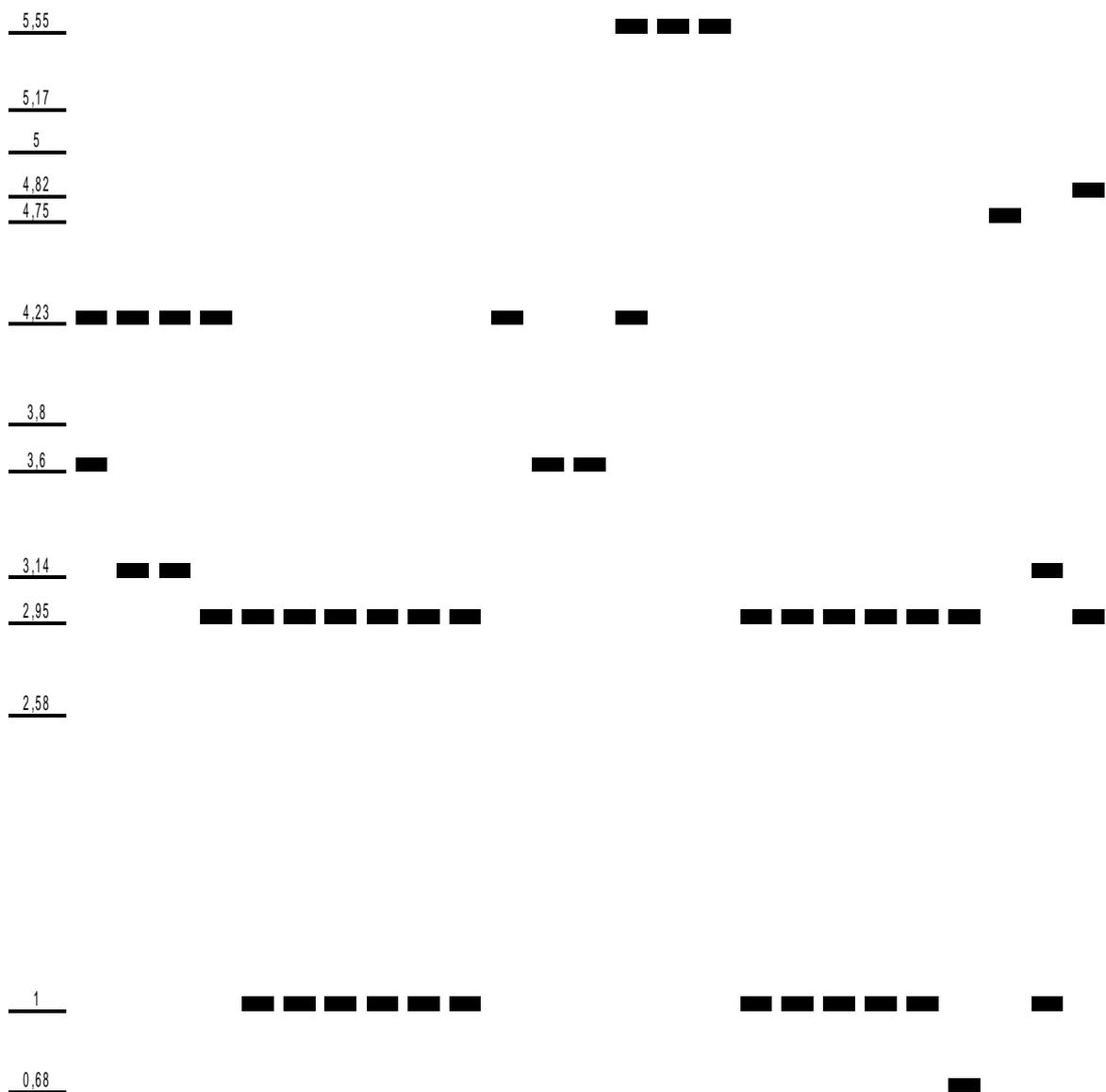


0
Spp. hja ind ind ind nit nit nit nit ole ole ole ole ole fum euz ele oed fum fum fum fum fum plu luc
Gct-1 ij dj dj dj km km km km dd dd ch ch ch ch cd oo jj dj hj lm hm hm hm mm cj hk
genotipos

Individuo FAGRO Individuo Rancho Grande * Individuos San Javier 0

■ Bandas interpretadas

M.r.
Anexo 2. Continuación...



0
 Spp. hya* hya* hya* hya* nit* nit* nit* nit* nit* nit* mag* cla* hem* ele* eum* eum* nit nit nit nit nit nit hya hya* hya*
 Gi-1 gi gj gj gk km km km km km km gg ll ll bg bb bb km km km km km km kn ff jm ek
 genotipos

Individuo FAGRO Individuo Rancho Grande * Individuos San Javier⁰
— Bandas interpretadas

Anexo 2. Continuación