

Tesis de Posgrado

Genética-poblacional y sistemática del género *Dichroplus* (Orthoptera : Acrididae) : análisis de polimorfismos enzimáticos y de ADN mitocondrial

Sequeira, Andrea Silvia

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sequeira, Andrea Silvia. (1996). Genética-poblacional y sistemática del género *Dichroplus* (Orthoptera : Acrididae) : análisis de polimorfismos enzimáticos y de ADN mitocondrial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2896_Sequeira.pdf

Cita tipo Chicago:

Sequeira, Andrea Silvia. "Genética-poblacional y sistemática del género *Dichroplus* (Orthoptera : Acrididae) : análisis de polimorfismos enzimáticos y de ADN mitocondrial". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2896_Sequeira.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Genética-poblacional y sistemática del género
Dichroplus (ORTHOPTERA : ACRIDIDAE): Análisis de
polimorfismos enzimáticos y de ADN mitocondrial**

por
Andrea Silvia Sequeira

DIRECTOR
Prof. Dr. Juan Cesar Vilardi

CODIRECTORA
Dra. Viviana Andrea Confalonieri

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias
Biológicas.

Laboratorio de genética. Departamento de Ciencias
Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
UBA.

Palabras clave: isoenzimas, variación clinal, adaptación,
Rapds, estructuración poblacional, RFLP, filogenias.

Nº 2896
42

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Population genetics and systematics in the genus
Dichroplus (ORTHOPTERA : ACRIDIDAE): Analysis of
enzymatic and mitochondrial DNA polymorphisms.**

by

Andrea Silvia Sequeira

DIRECTOR

Prof. Dr. Juan Cesar Vilardi

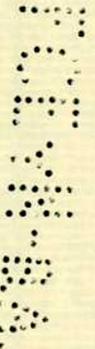
CODIRECTOR

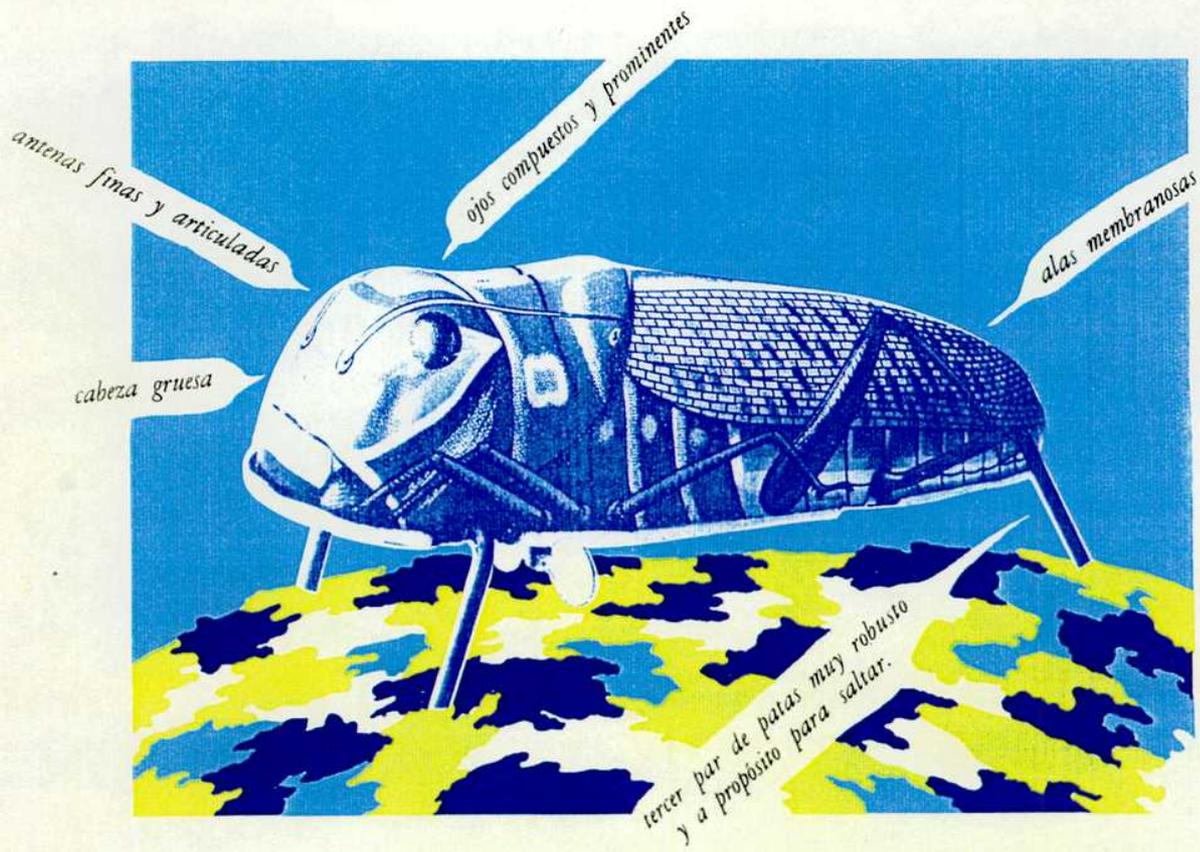
Dra. Viviana Andrea Confalonieri

Thesis defended to obtain the degree "Doctor en Ciencias
Biológicas"(PhD).

Laboratorio de genética. Departamento de Ciencias
Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
UBA.

Key words: isoenzymes, clinal variation, adaptation, Rapds,
population structure, RFLP, phylogenies.





LANGOSTA, DEL
LATIN LOCUSTA
A. INSECTO OR
TOPTERO DE 4
A 6 CENTIMETR
OS DE LARGO.

Benedict
74

a mis padres

a mi hermano

Agradecimientos

Esta es una excelente oportunidad para poder expresarle mi agradecimiento a mi Director de Tesis, el Dr. Juan C. Vilardi por darme esta oportunidad de iniciarme en la investigación y por brindarme su apoyo y su buena disposición. También quiero agradecerle por su constante interés en el trabajo y por su preocupación.

Este trabajo no podría haberse llevado a cabo sin contar con la ayuda invaluable de mi Co-directora de Tesis la Dra. Viviana Confalonieri "Vivi" que además de su constante apoyo y disposición para resolver cualquier problema con ideas y propuestas, me hizo el regalo de su amistad. Su cariño y buen humor hicieron del laboratorio un lugar al que daban ganas de llegar. No quiero dejar de incluir a su familia: Mauricio, Leo y Nico, para agradecerles las innumerables veces que me han recibido en su casa, siempre con alegría.

También quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Beatriz Saidman, mi Consejera de Estudios por su asesoramiento y ayuda en la elección de las materias.

A mi compañera de laboratorio la Dra. Cecilia Comas "Ceci" quiero agradecerle por su apoyo, su comprensión, su amistad incondicional y su consejo.

A la Lic. Marina Clemente quiero agradecerle por su brindarme su ayuda constante y su entusiasmo durante este último esfuerzo para llegar a la Tesis.

Quiero agradecerle a la Dra. María Isabel Remis por su interés y su apoyo en el aspecto científico y personal.

A mis compañeros de trabajo en el " 105", Sole, Andrea, Laura F., Graciela y por supuesto también a Ceci B " la peque" y a Federico, les quiero agradecer por su buen humor, comprensión y compañerismo, por su generosidad y ganas de compartir que me dieron ánimo e hicieron el trabajo más placentero.

Por tantos cafés compartidos y tantas tardes de charla y consejos científicos y de los otros quiero agradecerles a Eduardo y a Laura.

A mi amigo Eduardo Guillín le agradezco su apoyo incondicional y su confianza.

A la Dra. Mariel Sanso le quiero agradecer especialmente por su sonrisa comprensiva y por su apoyo en los buenos y malos momentos, también le doy gracias a su marido, Miguel, por su colaboración en la campaña de colección en Benito Juárez.

Les agradezco la generosidad en tiempo y materiales a los Lic. Marcelo Gonzalez de la Valle y Andrea Stefano. También a la Dra. Lidia Poggio y al Dr. Carlos Naranjo del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina por facilitarme materiales y brindarme su apoyo.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. María Marta Cigliano por el aporte desinteresado de sus conocimientos e ideas y por la determinación de los ejemplares utilizados en esta Tesis Doctoral.

La colaboración y el aporte de la experiencia de la Lic. Mariana Matragt y del Lic. Juan Margarit fue fundamental al iniciar el trabajo con técnicas moleculares y se los agradezco sinceramente.

Quiero agradecerle también al Dr. Joe Felsestein por haberme enviado su paquete de programas para inferencia filogenéticas y al Dr. Adam Marchant por el envío espontáneo de los plásmidos que contienen las sondas utilizadas en este estudio. También a la Dra. Analía Lanteri por facilitarme el programa Hennig86 y por brindarme su ayuda.

Quiero agradecerle también al Dr. Norberto Iusem por estar siempre dispuesto a responder a mis innumerables preguntas y por sus ideas y consejos.

Quiero agradecerle muy especialmente a mi amiga Valeria, la arquitecta por su paciencia y todo el tiempo invertido en ayudarme a dibujar los cladogramas. A mi amiga de siempre, Lupe por su comprensión y apoyo incondicional. Y por supuesto a "las machas"; Silvina, Pía, Connie, Caro y Vero por compartir mis buenos y malos momentos y por escucharme siempre. A todas les agradezco sinceramente el regalo de su cariño.

Debo agradecerle al Departamento de Ciencias Biológicas de esta Facultad en sus autoridades y personal, por brindarme su apoyo y un lugar de Trabajo. Agradezco también a la Universidad de Buenos Aires por el apoyo financiero en la forma de subsidios para esta investigación y al CONICET por los estipendios que recibí durante mi período de becaria que ayudaron a realizar estos estudios.

RESUMEN

Resumen

En este estudio se realizaron dos análisis diferentes dentro del género *Dichroplus*. El primero involucra un análisis microevolutivo entre especies de *Dichroplus elongatus*. Se midió entonces la variabilidad intra e interpoblacional en siete poblaciones de *Dichroplus elongatus* localizadas en las Provincias de Tucumán y de Buenos Aires utilizando marcadores enzimáticos y de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPDs). Al estudiar la estructura poblacional por regiones (provincias) y globalmente se observó una tendencia hacia un exceso de homocigotas dentro de las poblaciones como se esperaría en poblaciones subestructuradas. La diferenciación entre poblaciones es significativa para tres loci enzimáticos, en concordancia con lo esperado para alelos que muestran una distribución clinal de sus frecuencias (Singh y Rhomberg, 1987). Hay cuatro líneas de evidencia que sugieren causas alternativas al "contacto secundario" (interacción entre deriva y migración) para explicar los patrones de variación direccional encontrados para dos loci en *Dichroplus elongatus*. En primer lugar, si se encuentran ejes concordantes para diferentes loci, el flujo génico en gran escala podría ser responsable de la variación clinal de las frecuencias alélicas; pero si, como en el caso de *D. elongatus* se encuentran diferentes variables en asociación con distintos loci entonces se debe invocar a la selección, excepto que estos loci se encuentren ligados (Barbujani 1988). Nuestros resultados apoyarían la hipótesis selectiva ya que Aat-1 y Pep-1 están correlacionados con diferentes variables (Lat, Long, T.Min y T.Max; T.Max.Abs y T.Min.Abs respectivamente) sin mostrar ninguna correlación concordante con ninguna de las nueve variables estudiadas. En segundo lugar, el fenograma construido a partir de las distancias genéticas no se vinculan de acuerdo con lo esperado considerando las distancias geográficas. Concordantemente, la matriz de distancias geográficas no está correlacionada con la de distancias genéticas. En tercer lugar, el flujo génico estimado sería lo suficientemente elevado como para enmascarar las diferencias en las frecuencias alélicas si estas fueran originadas solamente por deriva genética. Por último, el patrón de variación encontrado se mantiene incluso al incluir poblaciones

muestreadas en distintos años. Esto sugiere que de alguna manera la variación clinal encontrada es estable en el tiempo. Un gradiente temporalmente estable debe ser mantenido por algún tipo de selección, de lo contrario el gradiente desaparecería. De esta manera, los resultados obtenidos sugieren la existencia de un probable efecto adaptativo de algunos loci alozímicos, que estaría determinado en última instancia por variables ambientales como la temperatura mínima, relacionadas con la latitud.

A partir de los datos de variabilidad resultante del análisis de marcadores de ADN amplificados al azar se desprende que la variabilidad obtenida mediante isoenzimas no difiere significativamente de la obtenida mediante RAPDs. Si muchos de los productos de amplificación obtenidos mediante RAPDs representan ADN repetitivo deberíamos esperar niveles más altos de variabilidad con marcadores RAPD que con isoenzimáticos. La ausencia de disparidad entre ambos estimadores es sugerida como una posible evidencia indirecta de la cantidad de ADN repetitivo presente en un genoma en particular. El valor de F_{st} calculado a partir de RAPDs es mucho mayor que el calculado a partir de datos alozímicos. Los primeros por ser considerados marcadores genéticos neutros daría más exactitud al valor de F_{st} comparado con uno que surge del cálculo utilizando loci alozímicos que muestren alguna evidencia de no neutralidad. En los fenogramas construidos a partir de datos de RAPDs, las poblaciones se vinculan de acuerdo con lo esperado por las distancias geográficas. Este resultado no es consistente con los resultados alozímicos previos. Nuevamente esto podría deberse al uso de loci enzimáticos con una posible función selectiva y reforzaría la noción de neutralidad de los marcadores RAPD (que dan como resultado distancias genéticas y geográficas concordantes).

Realizando un análisis macroevolutivo se llevaron a cabo también estudios sistemáticos dentro del género *Dichroplus* a través del análisis de los polimorfismos para fragmentos de restricción del ADN mitocondrial con el fin de llevar a cabo una reconstrucción filogenética dentro del género. Se desprende que a pesar que *S. lemniscatta* se dispone naturalmente como grupo externo, tal como se esperaba de acuerdo a los datos morfológicos, el resto de los datos moleculares compilados no se corresponden con la clasificación taxonómica

inferida para este grupo. La propuesta para un estudio más exhaustivo sería la de incluir caracteres provenientes de genes nucleares y comparar las filogenias obtenidas con los tres métodos, construyendo matrices que incluyan todos los caracteres. A pesar de que los datos moleculares superan a los morfológicos en número generalmente son muy uniformes, dando como resultado pocos árboles. Se aplicaría entonces la combinación de caracteres, descartando la partición, ya que estudios que combinen ambos enfoques pueden maximizar la cantidad y utilidad de la información y darnos una visión más comprensible de la evolución de los organismos.

Abstract

In this study two different analysis were performed in the genus *Dichroplus*. The first one involves a microevolution model analysis between populations of *Dichroplus elongatus*. Within and between population differentiation was measured in seven populations of *Dichroplus elongatus* located in Tucumán and Buenos Aires through enzyme variation and randomly amplified polymorphic DNA (Raps). When studying population structure for two different arrangements (divided in regions and globally) a tendency towards homozygote excess was observed, as expected in structured populations. Differentiation between populations showed to be significant for three loci, concordantly with what is expected for loci displaying clinal distribution for allele frequencies. There are four lines of evidence suggesting causes other than secondary contact (i.e. interaction between migration and genetic drift) to explain the observed directional patterns of variation for two loci in *Dichroplus elongatus*. First, if concordant axes are found showing concordant oriented patterns of gene frequencies for genetically independent markers, this could only be accounted for by a systematic cause, such as gene flow. On the other hand if, as in the case of *Dichroplus*, when different variables are associated for different loci then selection must be invoked, unless these loci are linked. Our results support the selection hypothesis, because Aat-1 and Pep-1 are correlated with different variables (Lat, Long, Min.T. and Max.T.; Abs.Max.T. and Abs.Min.T. respectively) showing no concordant correlation with any of the nine variables studied. Second, the phenetic tree based on genetic distances does not fit with the expected according to geographical distances, as would be expected if genetic differentiation answered solely to migration and genetic drift. Concordantly, genetic distances are not correlated with geographical distances. Third, the estimated gene flow should be high enough to mask differences of allelic frequencies due solely to genetic drift. Finally, the pattern of variation is maintained even including populations sampled in different years suggesting that the clinal variation is somehow temporally stable. A stable gradient must

be maintained by selection of some sort, otherwise the gradient would have presumably eroded by now. The results obtained suggest the existence of an adaptive effect for some allozyme loci, which would be determined by environmental variables related to latitude.

From the variability estimates obtained from RAPD loci we can observe that the variability derived from isozymes is similar to that obtained from RAPD data. Two possible explanations for this concordance are supplied in this report. In most species, considerably more variation can be found to exist in terms of nucleotide sequence changes in noncoding or repetitive DNA than in coding DNA. If indeed many of the amplification products represent repetitive DNA, then higher levels of variability should be expected with RAPD markers than with allozyme ones. Would not the disparity or similarity between both variability estimates hence constitute an indicator of the amount of repetitive DNA present in a particular genome? The total F_{st} estimate calculated using RAPD data yields a higher value. The fact that RAPDs are genetic markers of relative phenotypic neutrality would grant more accuracy to this estimate when compared to that calculated using some isozyme loci that display clinal variation (or some evidence of non-neutrality). Cluster analysis of Nei's genetic distances revealed an overall agreement with the geographical location of the populations studied. This is not consistent with the previous allozyme study where no correspondence was found between genetic and geographical distances. Again this would answer to the use of loci displaying clinal variation (with a possible selective role) for the non correspondent isozyme genetic distances and would reinforce the notion of RAPDs as neutral markers displaying genetic distances that agree with geographical distances.

With the purpose of reconstructing the phylogeny of the genus *Dichroplus*, six species were analyzed by means of restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA and their patterns were compared using cladistic methods. The observed relations are that even though *S. lemniscatta* is naturally located as an outgroup - what is expected from morphological data - the rest of the data collected do not agree with the previous taxonomic

classification inferred from morphological evidence. Further studies should have to be performed in order to study characters from nuclear genes and compare the phylogenies obtained with the three methods (morphology, mitochondrial DNA and nuclear DNA). Building matrices including all the characters, even though molecular data are more numerous than morphological data these are usually very homogeneous, resulting in very few trees. The combination of characters should therefore be applied, ruling out character separation. Such studies that combine the two approaches can thereby maximize both information content and usefulness and provide a truly comprehensive view of biotic evolution.

CONQUEROR

III

INDICE

Capítulo 1

INTRODUCCION

Las especies en estudio _____	11
I - Antecedentes sobre estudios genético-poblacionales	
a) polimorfismos enzimáticos _____	15
a.1- ventajas y desventajas de la técnica _____	17
b) polimorfismos de ADN amplificados al azar _____	21
b.1- ventajas y desventajas de la técnica _____	22
b.2 - aplicaciones de este método _____	23
c) Objetivo de los estudios poblacionales _____	25
II - Antecedentes sobre estudios macro-evolutivos y sistemáticos	
a) La clasificación biológica _____	27
b) Las escuelas sistemáticas _____	28
c) Caracteres morfológicos y moleculares _____	31
d) La molécula elegida _____	33
e) Objetivo de los estudios interespecíficos _____	37

Capítulo 2

MATERIALES Y METODOS

I - Electroforesis de isoenzimas

a) Materiales	42
b) Métodos	
b.1 - puesta a punto	44
b.2 - métodos isoenzimáticos utilizados	46
b.3 - métodos estadísticos	49

II- Análisis de polimorfismos de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD)

a)Materiales	52
b) Métodos	
b.1 - puesta a punto	52
b.1.i.- Extracción de ADN	52
b.1.ii.- Amplificaciones	54
b.1.iii.- Análisis de productos de amplificación	55
b.2 - análisis estadístico	56
b.2.i.- Estimación de frecuencias génicas y genotípicas	56
b.2.ii.- Diversidad genética intrapoblacional	57
b.2.iii - Estructuración poblacional	60
b.2.iv.-Distancias genéticas	63

III - Análisis de polimorfismos para fragmentos de restricción de ADNmt en especies del género *Dichroplus*

a) Colección del material	65
b) Métodos	
b.1 - Clonado de ADN mitocondrial de <i>Caledia</i>	66
<i>captiva</i>	
b.2 - Extracción de ADN genómico total	67
b.3 - Análisis del polimorfismo para el largo de los fragmentos de restricción en ADNmt	
b.3.i - Digestión de ADN genómico total con enzimas de restricción	68
b.3.ii.-Corrida de ADN genómico digerido	70
b.3.iii - Tratamiento del gel y transferencia (Southern)	71
b.3.iv - Marcación no radioactiva de los fragmentos de ADNmt	73
b.3.v - Hibridación de la membrana con la sonda marcada	76
b.3.vi - Detección colorimétrica con NBT y x- phosphate	78
b.3.vii - Interpretación de bandas	79
b.3.viii - Algoritmos utilizados para analizar los datos	
a) Algoritmos de Wagner y Dollo	80
b) Comparación entre programas de inferencia de filogenias	81
c) Parámetros estadísticos para poner a prueba la confiabilidad de los cladogramas	83
d) Cladogramas de consenso	85

Capítulo 3

RESULTADOS

I - Estudios poblacionales

a) Electroforesis de Isoenzimas

a.1 - análisis isoenzimático de las poblaciones _____	87
a.2 - análisis estadístico _____	96
a.2.i - subestructuración poblacional _____	98
a.2.ii - diferenciación entre poblaciones _____	100
a.2.iii - variación clinal _____	103

b) Análisis de polimorfismos de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD) _____

106

b.1 - parámetros de variabilidad intra e interpoblacional _____	112
b.2 - relaciones fenéticas entre las poblaciones _____	122

c) Comparación de resultados obtenidos mediante isoenzimas y RAPD _____

126

II - Estudios entre especies

a) Identificación de los caracteres _____	128
b) Algoritmo de Wagner _____	136
b.1- Cladogramas fundamentales _____	136
b.2.- Cladograma de consenso estricto _____	138
b.3.- Otros grupo externos ensayados _____	138
c) Algoritmo de Dollo _____	145
c.1.- Cladogramas fundamentales _____	145
c.2.- Cladogramas de consenso estricto y de mayoría _____	145
c.3.- Otros grupos externos ensayados _____	147

Capítulo 4

DISCUSION

I - Análisis microevolutivo: patrón de distribución de la variabilidad entre poblaciones de <i>Dichroplus elongatus</i> _____	150
a) estructuración poblacional _____	151
b) distancias genéticas _____	152
c) la variación clinal y sus posibles implicancias adaptativas____	153
d) comparación de estimaciones de variabilidad medida a través de diferentes técnicas _____	159
II - Análisis de las relaciones filogenéticas entre especies de género <i>Dichroplus</i> _____	163

Capítulo 5

BIBLIOGRAFIA _____	170
---------------------------	-----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tabla de datos meteorológicos y localización geográfica de las localidades muestreadas	44
Tabla 2: Tabla de soluciones ensayadas durante la puesta a punto de la técnica.	45
Tabla 3 Lista de enzimas, sistemas de buffer y técnicas de tinción utilizados para isoenzimas	47
Tabla 4a: Tabla de frecuencias alélicas para los loci polimórficos en las siete poblaciones analizadas	97
Tabla 4b: Tabla de loci monomórficos y número de individuos analizados por loci y por población	96
Tabla 4c: Tabla de frecuencias alélicas para los sistemas AAT y PEP y su transformación según el estadístico de Christensen (1976)	98
Tabla 5: Tabla de valores de Fis calculados para cada locus y su valor total	99
Tabla 6 : Tabla de frecuencias alélicas que mostraban diferencias entre machos y hembras en dos de las poblaciones analizadas	100
Tabla 7 : Tabla de valores de Fst calculados por regiones (Tucumán y Buenos Aires), tomando cada región como una única población y sus valores totales (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)	101
Tabla 8: Tabla de valores medios para los índices de fijación Fis (indicando diferenciación intrapoblacional) y Fst (indicando diferenciación entre poblaciones) para cada locus y su significación estadística (p)	102
Tabla 9: Diferenciación entre pares de poblaciones, el número estimados de migrantes por generación: Nm: distancias genéticas (Nei 1972) y distancias geográficas entre las poblaciones en km	103
Tabla 10: Tabla de todos los valores de correlación	105
Tabla 11: Regresiones múltiples de frecuencias alélicas para Aat-1 y Pep-1 sobre las variables geográficas y climáticas	106
Tabla 12a: Tabla que indica la proporción de individuos de cada población que no exhiben el marcador (locus)	108

Tabla 12b: Tabla de las varianzas muestrales de las frecuencias de homocigotas nulos _____	109
Tabla 13a: Tabla de estimadores de la frecuencia alélica para cada locus.(ec.2a) _____	110
Tabla 13b: Tabla de la varianza muestral de las frecuencias alélicas.(Ec.2b) _____	111
Tabla 14a: Valores de variabilidad expresados por población y por locus (Hij)(Ec.3a) _____	113
Tabla 14b: Tabla de varianzas muestrales para los valores de variabilidad promedio $H_j(i)$.(Ec.3b) _____	114
Tabla 15: Valores promedio de variabilidad intrapoblacional para todas las poblaciones analizadas (H_w) y su valor de varianza.(Ecs.5a,b,c,d,e,) _____	114
Tabla 16: Tabla de valores de heterocigosis intrapoblacional promedio para cada población calculado mediante valores de frecuencias alélicas obtenidos con isoenzimas y con Rapds _____	115
Tabla 17a: Tabla de valores de heterocigosis entre pares de poblaciones (H'_{jk}) por locus (ec. 6a.) _____	116
Tabla 17b: Valores de varianza para los indicadores de variabilidad entre pares de poblaciones (ec 6b) _____	117
Tabla 17c: Valores de covarianza entre los valores de heterocigosis entre pares de poblaciones (C_{oc} , H'_{j} : H'_{jk})(Ec. 10a) _____	118
Tabla 18a: Valores de variabilidad entre pares de poblaciones considerando la variabilidad existente en cada población y los valores promedio para la heterocigosis entre poblaciones de a pares y la varianza de este valor _____	120
Tabla 18b: Valores de varianza muestral para la variabilidad entre pares de poblaciones($H^{\wedge}jk$) _____	121
Tabla 19: Valor del índice de fijación promedio para las seis poblaciones estudiadas con y sin el factor de corrección correspondiente _____	122
Tabla 20: Valores de identidad genética dentro de cada población para cada locus _____	123
Tabla 21: Valores de identidad entre poblaciones para cada locus y valores de distancia promedio entre poblaciones (ec 11a) _____	124

- Tabla 22: Matriz de valores de heterocigosis interpoblacional promedio para cada par de poblaciones y valores de distancia genética entre poblaciones _____ 125
- Tabla 23: Identificación de las bandas (kb) obtenidas luego de la digestión con las nueve enzimas _____ 128
- Tabla 24: Tabla de identificación de cada fragmento de restricción como caracter para ser utilizado en la matriz _____ 129
- Tabla 25: Matriz de presencia o ausencia de caracteres (fragmentos de restricción) _____ 130

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa que ubica las localidades donde se coleccionaron ejemplares de *Dichroplus elongatus*. _____ 43
- Figura 2: Dot blott realizado para estimar el rendimiento de la marcación de los tres fragmentos de ADNmt _____ 76
- Figura 3: Fotografía de los patrones isoenzimáticos obtenidos para el sistema AAT _____ 88
- Figura 4: Fotografías de los sistemas polimórficos analizados _____ 91
- Figura 5: Fotografías del sistema Esterasas con diferentes sustratos 93
- Figura 6: Fotografías de los sistemas que revelan sólo loci monomórficos _____ 95
- Figura 7: Fotografía de los productos de amplificación obtenidos al utilizar los cebadores al azar (Rapds) _____ 107
- Figura 8: Fenogramas construidos utilizando las distancias entre poblaciones mediante el método UPGMA para datos obtenidos a partir de isoenzimas y Rapds _____ 125
- Figura 9: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con HindIII _____ 131

- Figura 10: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con HaeIII _____ 132
- Figura 11: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con Sca I _____ 133
- Figura 12: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con Alu I _____ 134
- Figura 13: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con Xba I _____ 135
- Figura 14 : Cladogramas obtenidos mediante el Algoritmo de Wagner _____ 140/144
- Figura 15: Cladogramas obtenidos mediante el Algoritmo de Dollo _____ 147/148

CONTENUTO



INTRODUCCION

I - Las especies en estudio

Las especies del género *Dichroplus* son habitantes conspicuas de sabanas y praderas en las llanuras abiertas interiores y aún pedemontañas de la región Neotropical. Además de su gran potencial biótico poseen una notable capacidad de expansión, atributos que las definen como acrididos de gran importancia económica para la Argentina (Ronderos, 1985). Algunas especies del género (*D. elongatus*, *D. pratensis*) se han descrito como causantes de graves daños a las cosechas, ya que se alimentan de una amplia variedad de pasturas y cultivos (Liebermann, 1944; Zapata, 1987; Sánchez y de Wysiecki, 1983). En los meses calurosos de 1995, seis localidades del S.O. de la Provincia de Buenos Aires tales como; Benito Juárez, Olavarría y Coronel Suarez fueron declaradas en emergencia debido a los daños causados a los cultivos por diversas especies de ortópteros, siendo la especie más abundante *D. elongatus* (Cigliano *et al* , 1995).

En la actualidad hay más de cuarenta especies descritas incluidas en este género. En nuestro país se encuentran seis de los posibles grupos de especies propuestos en revisiones taxonómicas basadas en la morfología (Cigliano *com. pers*). Asimismo, el grupo ha sufrido modificaciones recientes en cuanto a su clasificación en sucesivas revisiones. Varios grupos de especies han sido

elevados al nivel de género, o bien han sido incluidas en otros géneros. Tal es el caso del grupo de especies de *Dichroplus punctulatus* que fuera transferido al género *Baeacris* y del nuevo género *Ponderacris* creado para incluir a las especies del grupo *Dichroplus peruvianus* (Ronderos y Cigliano, 1991).

Los ortópteros y especialmente los acridoideos han contribuido en forma substancial al conocimiento actual sobre la estructura y el comportamiento de autosomas y cromosomas sexuales, mecanismos de mitosis y meiosis y polimorfismos cromosómicos en poblaciones naturales.

La mayoría de los polimorfismos cromosómicos encontrados en ortópteros comprenden rearrreglos estructurales como fusiones y fisiones céntricas y heterocromatina supernumeraria incluyendo segmentos extra y cromosomas B (Hewitt, 1979). En el género *Dichroplus* se han descrito varios casos de especiación asociada con rearrreglos cromosómicos (Sáez y Pérez Mosquera, 1971). La ocurrencia de inversiones pericéntricas y fusiones céntricas y en tándem produjeron una amplia variedad de números cromosómicos, desde el ancestral $2n= 23$ (XO) al cariotipo extremo de *D. silveiraguidoi* con $2n= 8$ (neoXY) (Sáez, 1956).

D. elongatus presenta el presunto cariotipo primitivo; sin embargo, en poblaciones de Tucumán se detectan polimorfismos para segmentos supernumerarios y cromosomas B (Vilardi, 1985; Remis y Vilardi, 1986). En esta especie el cromosoma

B produce un efecto de dosis sobre la frecuencia de quiasmas intersticiales, que se incrementa con el número de B por célula y reducen además la fertilidad de los portadores ya que aumentan la producción de espermátidas anormales (Vilardi, 1985; Remis y Vilardi, 1986; Loray *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que la heterocromatina no sería selectivamente neutra constituyendo un mecanismo de regulación de la recombinación genética (Clemente *et al.*, 1993).

Además de los estudios citogenéticos en el orden Orthoptera, se están llevando a cabo numerosos estudios evolutivos de diferenciación interespecífica y variación intraespecífica mediante la utilización de técnicas moleculares (Harrison *et al.*, 1985).

Si bien el género *Dichroplus* constituye un ejemplo clásico de especiación cromosómica, no hay antecedentes en este grupo acerca de estudios de variación interespecífica usando marcadores proteicos y/o del ADN.

Es de interés entonces utilizar a este género como un excelente modelo para desarrollar estudios multidisciplinarios genético-poblacionales y macro evolutivos ya que:

los polimorfismos cromosómicos detectados a nivel poblacional alientan la continuación de los estudios con el objeto de buscar posibles correlaciones con la variabilidad genética estimada a través de distintas metodologías.

- la evolución cromosómica en el género sugeriría patrones evolutivos que podrían contrastarse con la clasificación basada en criterios morfológicos y los datos provenientes del estudio de marcadores moleculares.

II - Antecedentes sobre estudios genético-poblacionales

a) polimorfismos enzimáticos

Para lograr estimar las divergencias evolutivas entre diferentes organismos sería necesario estudiar las homologías de sus genes, ya que es de suponer que cuanto más estrechamente relacionados estén dos individuos mayor homología existirá entre sus loci. Debido a la imposibilidad de realizar este tipo de estudios para todos los loci, se han ideado otros métodos de análisis que, en forma indirecta, permiten estudiar las divergencias existentes entre poblaciones y/o especies. Dado que la expresión primaria de un gen es la formación de un polipéptido (Beadle y Tatum, 1941; Benzer, 1955, 1961), el estudio de las enzimas daría una primera aproximación al estudio del gen.

Las isoenzimas son diferentes formas moleculares de una enzima son capaces de catalizar la misma reacción metabólica.

Desde el punto de vista de los análisis genéticos es importante diferenciar dos clases de variaciones isoenzimáticas (Kephart, 1990). La primera, *isoenzimas en sentido estricto*, son polipéptidos que pueden ser codificados por más de un locus génico. Estas formas pueden tener distintas localizaciones dentro de la célula o del organismo y pueden ser sintetizadas en

diferentes etapas del desarrollo. Además presentan diferencias en sus propiedades catalíticas o reguladoras asociadas a diferencias en su función que pueden distinguirse por sus grandes diferencias de movilidad en la electroforesis. En general todos los miembros de una población poseen tales formas múltiples.

El segundo tipo de variación denominada *variación aloenzimática*, es el que se emplea con mayor frecuencia en el análisis genético. Las aloenzimas son diferentes formas enzimáticas codificadas por diferentes alelos de un mismo locus génico que suelen diferir en muy pocos residuos aminoacídicos. Sus propiedades catalíticas y reguladoras son semejantes y dentro de una población exogámica puede existir un elevado número de formas diferentes. El patrón de expresión de estas formas en cualquier individuo visualizable como un patrón de bandas en un gel dependerá del número de alelo (heterocigosis) en el locus que se trate y el número de cadenas polipeptídicas o subunidades de la que consta la enzima funcionalmente activa.

El análisis isoenzimático se ha convertido en una herramienta para ser aplicada tanto en la Genética de Poblaciones como en la Taxonomía. El hecho es que las isoenzimas proveen una medida directa del grado de Identidad (o Divergencia) que existe entre las poblaciones y especies estudiadas, permitiendo elucidar afinidades entre taxones.

Combinando la electroforesis con métodos de tinción histoquímicos específicos es posible distinguir una enzima entre cientos de ellas presentes en un extracto de tejido. Hunter y Markert (1957) desarrollaron la técnica del zimograma para identificar las diferentes bandas (enzimas) que aparecen en el gel luego de la tinción histoquímica. Así, los fenotipos resultantes son bandas de colorante que indican regiones de actividad enzimática o de concentración de proteínas para las que se ha propuesto la denominación de electromorfos (King y Otta 1975)

Esta técnica además puede ser utilizada para determinar si ha ocurrido variación en las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo de existencia de una especie en particular (Benzer, 1961; Dobzhansky y Ayala, 1973), como también a lo largo de un gradiente geográfico y/o ambiental (Allard *et al.*, 1972; Clegg y Allard, 1972; Hamrick y Allard, 1972, etc.)

a.1- ventajas y desventajas de la técnica

A pesar de las grandes ventajas que parece presentar este método, existen fuentes de error inherentes a la técnica que deben ser tomados en cuenta en el análisis de los distintos problemas, como ser:

- 1) la carga de una proteína se altera únicamente cuando uno de sus aminoácidos es sustituido por otro de carga diferente.

Conociendo la carga de los aminoácidos Shaw (1965) y Marshall y Brown (1975) estimaron que sólo 25 a 27% de los casos de sustituciones alélicas serán detectados electroforéticamente.

2) el hecho que dos enzimas tengan la misma movilidad electroforética no necesariamente implica que sean idénticas.

3) la variación en el patrón de bandeo puede ser inducida por el ambiente y no reflejar diferencias en aminoácidos

4) la variación puede ser inducida por variantes genéticas en otro locus (modificación de la proteína traducida o *posttranslational modification*) sin que se haya modificado la relación entre la secuencia aminoacídica y secuencia nucleotídica original

5) la parte del genoma analizada consiste solo de loci codificantes de proteínas

6) alguna variación genética puede no ser identificable (mutaciones silenciosas).

7) la variación puede ser selectivamente neutra.

8) algunas variantes están presentes sólo en ciertos tejidos o estadios de vida.

9) los ensayos extensos de enzimas particulares son a menudo costosos y consumen mucho tiempo.

Esta técnica tiene por otro lado numerosas ventajas (Hedrick 1983):

1) permite estudiar muchos loci que se ajustan en su mayoría a la genética mendeliana

2) puede ser aplicada en casi cualquier organismo incluso aquellos en los que no se tiene información de su sistema genético

3) los loci son generalmente codominantes, de modo que se pueden visualizar los heterocigotas

4) las estimaciones de los niveles de distribución de la variación genética se pueden comparar directamente entre poblaciones o especies relacionadas o no relacionadas

5) aporta buenos marcadores para estudios sobre clasificación, ecología de poblaciones, sistemas de reproducción, etc

Podemos agregar que:

6) los loci isoenzimáticos se pueden analizar utilizando pequeñas cantidades de material (normalmente la cabeza o medio torax del saltamontes)

7) los loci isoenzimáticos pueden aproximarse a una muestra aleatoria de genes estructurales, independientemente de su variación.

Pese a sus limitaciones, el análisis de un conjunto de loci isoenzimáticos elegidos al azar es aceptable para conocer el grado relativo de la variabilidad genética en poblaciones naturales. La estimación de esta variabilidad tiene una

importancia extraordinaria a nivel básico en los estudios genéticos y evolutivos (Lewontin, 1974).

Quizás, la más significativa de todas las propiedades de las isoenzimas es la base genética simple de la mayoría de los polimorfismos (generalmente exhiben herencia mendeliana, expresión codominante y ausencia de interacciones pleiotrópicas y epistáticas).

"A pesar de la redundancia del Código Genético y la posibilidad de sustituciones de aminoácidos que no afecten la carga total de la proteína, los cambios en la movilidad electroforética de las enzimas proveen un método extremadamente útil para evaluar diferencias genéticas entre grupos. Los hallazgos más recientes de intrones dentro de los genes estructurales y la existencia de familias multigénicas para muchas proteínas no han debilitado la propiedad de los polimorfismos isoenzimáticos para servir como una medida directa de la variación en la secuencia del ADN dentro y entre genomas" (Weeden y Wendel, 1989).

Cada vez más, desde los comienzos de la aplicación de técnicas electroforéticas, genetistas de poblaciones y evolucionistas se han interesado por el significado biológico de la variación polimórfica en la estructura primaria de las proteínas (Lewontin, 1979; Nei, 1975; Nevo *et al.*, 1984). Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios que probaron la existencia casi

universal de un amplio polimorfismo proteico en las poblaciones naturales, se planteó una dicotomía entre los puntos de vista que consideran el significado biológico de esta diversidad genética: los modelos de selección (Ayala, 1977; Milkman, 1978; Clarke, 1979) *versus* neutralidad (Kimura, 1968; Kimura y Ohta, 1971; Nei, 1975).

El significado adaptativo de los polimorfismos cromosómicos fue ampliamente discutido (White, 1973; Dobshansky *et al.*, 1980; Templeton, 1981), mientras que la función de la variabilidad alozímica en la adaptación ambiental y la evolución no está completamente resuelta (Colgan, 1989,1992; Altukhov, 1991; Woodwork *et al.*, 1992).

Se hicieron muchos intentos para resolver este enigma. Cada una de las metodologías empleadas para probar uno u otro modelo tiene sus ventajas y desventajas "pero solo los esfuerzos multidisciplinarios combinados pueden últimamente iluminar las oscuras interacciones de las fuerzas que están operando, y el significado adaptativo de un polimorfismo enzimático" (Nevo, 1984).

b) polimorfismos de ADN amplificados al azar

En los últimos años se han desarrollado técnicas basadas en la "Reacción en cadena de la polimerasa" (PCR) utilizando

cebadores o "*primers*" arbitrarios (Williams *et al.*, 1990). Esta técnica permite la evaluación de la variabilidad genética sin ningún conocimiento previo de la secuencia a utilizar (Williams *et al.*, 1990; Welsh y Mc. Clelland, 1990; Hadrys, 1992).

b.1- ventajas y desventajas de esta técnica

El atractivo de este método radica entonces en su sencillez técnica y conceptual. Se necesitan cantidades del orden de algunos nanogramos del ADN a amplificar usando oligonucleótidos sintéticos de secuencias aleatorias. Las condiciones del protocolo de amplificación difieren de las de la técnica de PCR convencional en que se utiliza un único oligonucleótido cebador o "*primer*" al azar sin ningún conocimiento previo de la secuencia del genoma a analizar (Erich, 1989). Cuando el cebador o "*primer*" es pequeño (10 bases) hay una alta probabilidad de que el genoma contenga varios sitios homologos a este, situados en cercanía y que estén en posiciones invertidas. Así el uso de marcadores RAPD detectados por PCR de pequeñas repeticiones invertidas distribuidas en todo el genoma agrega una nueva tecnología al análisis molecular de las relaciones entre genotipos.

El número y el tamaño de las bandas obtenidas depende de la longitud y secuencia de ese único pequeño cebador o

"*primer*" arbitrario. El perfil de productos de amplificación depende entonces de la combinación templado-*primer* y es reproducible para cada combinación (Hadrys *et al.* , 1992). Los polimorfismos en los sitios de homología con el cebador o "*primer*" resultan en diferentes perfiles de amplificación, detectados por la presencia o ausencia de fragmentos. Estos polimorfismos son de herencia mendeliana y pueden ser utilizados como marcadores genéticos.

Las desventajas que presenta este método es la necesidad de la utilización de controles para comprobar la veracidad de las bandas obtenidas y la repetibilidad de los patrones ya que al ser los cebadores de secuencias no específicas sino azarosas las muestras son muy sensibles a la contaminación.

b.2 - aplicaciones de este método

Este método de amplificación al azar de fragmentos de ADN ha sido utilizado con éxito para distintos propósitos entre los que se pueden mencionar: para detectar variación entre: cepas de bacterias (Welsh y Mc Clelland, 1990), de ratas (Welsh *et al.*, 1991), de *Gliciridia* (Chalmers *et al.*, 1992); también entre especies muy relacionadas de saltamontes (Chapco *et al.* ,1992), de *Aspergilli* (Megnegneau *et al.* , 1993), de cacao (Russell *et al.*, 1993) y entre especies de protozoos parásitos (Tibayrenc *et al.*,

1993). También fue de gran utilidad para discriminar entre tres especies salvajes cultivadas y varias semiespecies de peces de importancia comercial (Bardakci y Skibinski, 1994) así como para realizar estudios de mejoramiento e identificación de cultivares (Waugh y Powell, 1992).

c) - Objetivos de los estudios poblacionales

1 - El principal objetivo de estos estudios es el de contrastar los principales modelos que explican la variabilidad genética analizando para esto distintos sistemas enzimáticos en poblaciones de *Dichroplus elongatus* situadas en diferentes provincias biogeográficas, y coleccionadas a lo largo de un gradiente geográfico.

2 - Con el objeto de detectar posibles variaciones clinales de la variabilidad enzimática y discutir su significado en el marco de las distintas teorías evolutivas, se estudiaron entonces las posibles relaciones existentes entre las frecuencias alélicas y variables geográficas y climáticas. También se analizó la repetibilidad espacial y temporal de estos patrones de variación lo cual constituye una herramienta útil para detectar efectos adaptativos de las variables alozímicas (Endler, 1977).

3 - Se estimó la diferenciación genética entre las poblaciones y el flujo génico entre ellas con el fin de evaluar la estructura genética de las mismas y la distribución de la variabilidad.

4 - Considerando que el advenimiento de las técnicas moleculares aumentó mucho la capacidad potencial de obtención de datos provenientes directamente del ADN se encaró una estimación de la variabilidad de las mismas

poblaciones mediante una técnica potencialmente más sensible: la amplificación al azar de fragmentos de ADN "Rapds". El objetivo de la inclusión de esta técnica fue el de contrastar los resultados e hipótesis propuestas a partir de los datos de polimorfismos enzimáticos.

III - Antecedentes sobre estudios macro-evolutivos y sistemáticos

a) La clasificación biológica

La sistemática es la ciencia de la diversidad biológica, y una de sus principales finalidades es construir clasificaciones de los seres vivos. La clasificación biológica por su complejidad y extensión no tiene equivalente con ninguna otra disciplina (Crisci, 1978). Sin embargo, existen diversas opiniones respecto a los objetivos de dicha clasificación (ver por ejemplo Heywood, 1975). La idea todavía sostenida por algunos sistemáticos es la de adjudicar a la clasificación biológica una función de inventario. Si, por el contrario, la colocamos dentro del ámbito de la ciencia, su propósito primordial sería el aumento del conocimiento acerca de los organismos y una comprensión más profunda de sus propiedades, semejanzas, diferencias e interrelaciones. De allí resulta que la clasificación biológica es una ciencia teórica, con una gran dosis de descripción, pero no puramente descriptiva. Podemos concluir que su objetivo es *"el conocimiento, no de tal o cual organismo en particular sino de las leyes generales que los rigen y de las relaciones causales existentes entre ellos. De allí que una clasificación biológica será "mejor" que otra en la medida que sugiere más leyes científicas y contribuye mejor a la*

formulación de hipótesis explicativas. Una buena clasificación biológica es fecunda como principio organizador de nuestro conocimiento" (Crisci, 1977).

La mejor clasificación será la más estable, la más robusta, la más predictiva. Entendiendo por estable, que no se modifica en forma profunda por la adición de nueva información; por robusta que no se modifica por la adición de nuevas entidades y por predictiva que una propiedad conocida para la mayoría de las entidades de un grupo está garantizada con una gran probabilidad de que exista en aquellas entidades de ese grupo todavía no examinadas para esa propiedad (Crisci, 1977).

b) Las escuelas sistemáticas

A partir de la década del 50 comenzó una etapa de profundización de los principios de la clasificación biológica que dio lugar a una controversia entre tres escuelas que proponen diferentes filosofías y metodologías: el feneticismo, el cladismo y el evolucionismo (Crisci, 1977; Lanteri, 1989).

El concepto central de la sistemática filogenética o cladismo es el uso de caracteres derivados o apomórficos para reconstruir las relaciones ancestrales comunes y el agrupamiento de taxa basados en ancestros comunes. Existen otras dos

maneras de establecer relaciones entre taxa: sistemática tradicional y feneticismo.

Los métodos sistemáticos tradicionales emplean los conocimientos previos acumulados. En términos prácticos, dan peso relativo a los caracteres. Resulta difícil evaluar el significado evolutivo de grupos clasificados utilizando estos conocimientos ya que no conocemos las razones por la que fueron creados ni si representan algo real en la naturaleza. Ya que estos grupos pueden estar definidos por caracteres que no tienen un significado evolutivo, estos grupos pueden ser considerados "artificiales".

Los estudios fenéticos intentan utilizar un método empírico para determinar relaciones taxonómicas. En la práctica los algoritmos utilizados se concentran en reflejar la similitud global de los organismos en cuestión. Los organismos que aparecen como más similares se agrupan sin tener en cuenta los resultados de evolución convergente o paralela, creando nuevamente grupos posiblemente "artificiales".

Los estudios filogenéticos difieren de la sistemática tradicional en que emplea métodos empíricos para reconstruir filogenias y principios estrictamente evolutivos para formar clasificaciones. Difiere de los métodos fenéticos en que busca encontrar las relaciones genealógicas entre las taxa en estudio más que las relaciones fenéticas o de similitud. Esta teoría sostiene

que la clasificación biológica debe basarse en la filogenia (historia evolutiva) de los organismos, de allí que se la reconoce también como el enfoque genealógico.

Los criterios para aplicar esa teoría son los siguientes:

1) Cada grupo o taxón a formar debe ser monofilético, es decir que todos sus miembros comparten entre sí un antecesor común más reciente que con cualquier otro miembro de algún otro grupo de igual rango.

2) Se eligen caracteres (atributos) en los cuales se puede determinar el estado primitivo (cercano al origen) *versus* evolucionado.

3) Se establece la secuencia de ramificaciones del árbol genealógico y la posición relativa en el tiempo de esas ramificaciones. Este paso se concreta con la ayuda de los caracteres elegidos y de fósiles (cuando existen).

4) Se forman grupos en base a la posesión de caracteres evolucionados en común, el monofiletismo y la cercanía temporal con un antecesor común.

5) La categoría taxonómica de acuerdo con la jerarquía linneana, asignada a cada grupo en relación directa con su desprendimiento en el tiempo de otra línea evolutiva (ramificaciones).

Se intentan descubrir entonces, las relaciones de ascendencia común, indirectamente en la forma de caracteres

derivados compartidos (sinapomorfías). Estas relaciones representan mediante un diagrama jerárquico ramificado (cladograma), una reconstrucción de las relaciones genealógicas. Los grupos que se representan son considerados "naturales" (Wiley *et al.*, 1991).

De acuerdo con los principios de la Sistemática filogenética o Cladismo, tanto las especies como los taxones de rango superior existen en la naturaleza más allá de la habilidad del taxónomo para reconocerlos. El cladismo provee una metodología que permite poner a prueba la existencia de las especies biológicas. Aquellas especies que no están caracterizadas por "autoapomorfias" (novedades evolutivas no compartidas) son especies dudosas (Lanteri, 1995).

c) Caracteres morfológicos y moleculares

Debido a que los organismos bajo estudio tienen una única historia, los estudios sistemáticos de cualquier grupo de caracteres genéticamente determinados debe ser congruente con otros estudios basados en diferentes grupos de caracteres en los mismos organismos. La congruencia entre estudios es una fuerte evidencia de que se ha descubierto el patrón histórico subyacente y de que la filogenia propuesta es exacta (ver Penny y Hendy, 1986). Por otra parte, que los resultados estén en

conflicto puede indicar problemas teóricos ó de procedimiento en uno ó ambos análisis, ó puede indicar que se necesitan datos adicionales para resolver las relaciones filogenéticas en cuestión (Hillis, 1987).

En las últimas dos décadas, debido al progreso de los estudios moleculares de problemas sistemáticos, se ha precipitado el debate entre el campo de la morfología tradicional y el molecular. En la práctica el ideal de la perfecta congruencia no es frecuentemente alcanzado. Las filogenias estimadas a partir de grupos de caracteres diferentes algunas veces difieren en detalles y otras veces contienen grandes discrepancias (Swofford, 1991).

Las técnicas morfológicas y moleculares tienen cada una ventajas particulares para la reconstrucción filogenética. Las morfológicas pueden ser aplicadas a una enorme variedad de materiales fósiles y de museo, y una gran porción de los organismos continuará siendo estudiada primaria o exclusivamente a partir de información morfológica. Por otro lado, el tamaño potencial de los grupos de datos moleculares es increíblemente extenso y cuando sea utilizado en su totalidad puede proporcionar un informe detallado sobre la historia evolutiva de los individuos.

Muchos investigadores están agregando a sus estudios los datos moleculares. "Utilizo métodos tradicionales en mis

investigaciones pero las preguntas en las que usualmente estoy interesado suelen ser respondidas más fácilmente con la tecnología moderna como el análisis de ADN" (Graves en Gibbons, 1991).

Además de los métodos clásicos basados en la morfología, las estimaciones de relaciones genéticas entre organismos se han derivado de numerosas mediciones bioquímicas siendo las comparaciones electroforéticas las más útiles para especies cercanas. Como se mencionó anteriormente (pag. 17) si bien la electroforesis de isoenzimas ha probado ser muy útil ya que provee rápido acceso a grandes cantidades de datos, esta técnica detecta sólo la cuarta parte de todas las diferencias de aminoácidos entre proteínas. Además no tiene en cuenta los cambios que ocurren en secuencias reguladoras del ADN o que no codifican para proteínas (Upholt, 1977). Un método alternativo se basaría en determinaciones directas sobre los ácidos nucleicos.

d) La molécula elegida

El ADN mitocondrial está siendo utilizado cada vez con más frecuencia como marcador de la variación genética dentro y entre poblaciones y para estudios filogenéticos de especies relacionadas (Awise *et al.*, 1979; Brown y Simpson, 1981; Brown *et al.*, 1982; Latorre *et al.*, 1986 y Fos *et al.*, 1990).

Dado el incremento en el uso del ADN mitocondrial en estudios evolutivos, es particularmente importante comprender la dinámica de las moléculas de ADNmt en organismos individuales para poder interpretar correctamente los patrones de variación en poblaciones naturales (Harrison *et al.*, 1985).

Los estudios de ADNmt en animales han revelado altos niveles de variación intraespecífica y diferenciación sustancial entre especies relacionadas (Awise *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1981; Brown y Simpson, 1981; Lansman *et al.*, 1983; Awise *et al.*, 1983). El genoma mitocondrial de animales en general consiste en una única molécula de ADN circular, denominado ADNmt, de tamaño pequeño. Existen dos características que distinguen a los genes de genomas de organelas de los del genoma nuclear: 1) herencia materna, 2) segregación vegetativa.

La replicación y división de organelas y por lo tanto de sus genomas, en general está bajo un control relajado y puede ser considerado como un fenómeno estocástico. La utilidad de las variaciones en el tamaño de la molécula como marcador en estudios de estructura poblacional a corto plazo, depende de nuestro conocimiento de las tasa de mutación y las reglas de transmisión para el ADNmt (Harrison *et al.*, 1987).

Por otra parte, la similitud genética entre los ADNmt de dos poblaciones cualesquiera puede ser estimada por la proporción de fragmentos de restricción que comparten. El análisis de los

patrones de restricción del ADNmt puede ser entonces una de las técnicas más sensible que pueden ser utilizadas para reconstruir las relaciones evolutivas entre poblaciones coespecíficas (Latorre *et al.*, 1986). Los cambios en el genoma mitocondrial también pueden ser utilizados para detectar patrones de antecesores comunes entre especies (Barton y Jones, 1983).

En poblaciones de *Drosophila subobscura* del Viejo Mundo se encontró que el flujo génico es mucho mayor cuando se consideran los genes nucleares -calculado con datos de alozimas que cuando se considera el ADNmt. El flujo génico es suficientemente grande como para crear condiciones de panmixia para marcadores nucleares neutros y suficientemente pequeño para el ADNmt como para permitir una diferenciación genética efectiva. En este caso los genes mitocondriales divergen más extensamente en poblaciones subdivididas que los genes nucleares (Latorre *et al.*, 1990).

El ADNmt ya ha provisto interesantes datos sobre la historia evolutiva de animales y plantas (Barton y Jones, 1983).

Se está utilizando en este momento también para el análisis de patrones de colonización en la mosca de la fruta *Ceratitidis capitata* (McPheron *et al.*, 1994).

En especies de grillos se encontró falta de concordancia entre la variación presente en el ADNmt y las divisiones entre

especies definidas por morfología y alozimas (Harrison *et al.*, 1987). Esto resalta la importancia de los estudios genético-moleculares para completar una clasificación taxonómica previa.

Estudios que combinen ambos enfoques pueden maximizar la cantidad y la utilidad de la información y darnos una visión más comprensible de la evolución de los organismos (Hillis, 1987).

Dentro de los estudios que utilizan ambas técnicas podemos mencionar la contribución realizada sobre el género *Aramigus* Horn, el cual incluye linajes partenogenéticos poliploides como así también poblaciones bisexuales, para cuyo tratamiento se emplearon no solo caracteres morfológicos, sino también secuencias de ADN mitocondrial (Normark y Lanteri, *en prensa*). Dado que las especies partenogenéticas son las más perjudiciales para los cultivos, los estudios basados en las evidencias morfológicas y moleculares en forma conjunta pueden contribuir a resolver problemas de entomología aplicada (Lenney Williams, 1994). Por ejemplo, en el trabajo citado precedentemente se demostró el origen geográfico de una especie de Curculionidae plaga de pasturas, que fuera introducida en Nueva Zelanda desde la Argentina. Esta información resultó particularmente importante para la búsqueda de enemigos naturales que permitan implementar métodos de control biológico.

e) Objetivo de los estudios interespecíficos

Toda aproximación científica a la conservación, explotación o control de recursos genéticos tanto animales como vegetales requiere un conocimiento de la cantidad y distribución de la variabilidad genética. Los esfuerzos de control biológico realizados o a realizar sobre grupos de especies fitófagas dependen en gran medida del conocimiento de los patrones de migración así como de su historia de relaciones evolutivas. Para estos fines se han utilizado hasta el momento caracteres morfológicos que han aportado una gran cantidad de información. En casos de géneros que presentan dificultades debido a su complejidad y al gran número de especies que lo componen es interesante incluir en los estudios técnicas moleculares cuyo mayor beneficio es el enorme número de datos que aportan.

Dada la gran utilidad de la combinación de ambos tipos de caracteres se ha encarado un estudio taxonómico del género *Dichroplus* incorporando técnicas moleculares a los estudios sistemáticos de acrididos (Orthoptera:Acrididae) con el fin de reconstruir los árboles filogenéticos en el género *Dichroplus*. Esto permitirá complementar la información proporcionada por los métodos tradicionales (utilizando los datos morfológicos ya recopilados en estudios previos realizados por los Dres. Ronderos y

Cigliano 1991). En este análisis se podrá evaluar el grado de congruencia de los resultados obtenidos con ambas técnicas, por lo que constituiría un aporte interesante para la resolución de los problemas taxonómicos y filogenéticos de este grupo.

En el caso específico del género *Dichroplus* se utilizarán las relaciones filogenéticas obtenidas para comprobar varias hipótesis.

Debido al gran número de especies incluidas en este género y basándose en estudios morfológicos exhaustivos se han encontrado evidencias suficientes para elevar a un grupo de especies a la categoría de género. El grupo de especies anteriormente denominado como *D. punctulatus* constituye ahora el género *Baeacris* n. gen. (Ronderos y Cigliano, 1991). Al analizar la posición relativa de este grupo de especies con respecto a la especie de la misma familia tomada como grupo externo (outgroup), *Scotussa lemniscata*, y con respecto a los otros grupos incluidos en el análisis se podrá poner a prueba la repetibilidad de esta separación.

Otro de los objetivos de este análisis es comprobar la inclusión dentro del mismo grupo de especies (grupo maculipennis) de las especies *Dichroplus elongatus* y *D. pratensis*, utilizando nuevamente la posición relativa de estos dos taxones en el cladograma resultante.

Un tercer propósito de la presente investigación es estudiar la cercanía relativa del grupo externo "outgroup" con respecto a la especie que en la actualidad, en base a morfológicos, se considera más relacionada con él (*Dichroplus bergii*).

Por último, el objetivo más importante del presente estudio es obtener evidencias que nos indiquen si el origen de este grupo de especies fue a partir de un único ancestro común (monofilético) o por el contrario, como indicarían los datos morfológicos obtenidos hasta el momento, de carácter polifilético (Cigliano *com. pers.*).

El interés económico que reviste este género hace que el conocimiento de patrones evolutivos y de colonización sean un componente importante a tener en cuenta en futuras campañas de control y erradicación (Carey, 1991; Miller, 1992; Abate, 1993).

COMPTON

MATERIALES Y
METODOS

I-Electroforesis de isoenzimas

a) Materiales

Se analizaron isoenzimáticamente en una primera etapa seis poblaciones naturales de *Dichroplus elongatus* que reciben el nombre de la localidad más cercana al lugar donde fueron coleccionadas en la Provincia de Tucumán: Raco (RA), Tafi Viejo (TV), Horco Molle (HM) y Timbó (TI). También se analizó una población de la localidad de Ingeniero Maschwitz (IM), Provincia de Buenos Aires.

Se analizaron luego, en una segunda etapa, otras dos poblaciones naturales de *Dichroplus elongatus*: Famaillá (FA) y Escobar (ES) coleccionadas durante 1993 y situadas en las provincias de Tucumán y Buenos Aires respectivamente. Estas dos poblaciones se agregaron con el objeto de aumentar la información en ambas regiones. Las poblaciones estudiadas están situadas a lo largo de gradientes geográficos (Fig 1, Tabla 1).

Figura 1: Mapa que ubica las localidades donde se coleccionaron ejemplares de *Dichroplus elongatus*. RA: Raco; HM: Horco Molle; TV: Tafi Viejo; TI: Timbó; FA: Famailla; IM: Ingeniero Maschwitz; ES: Escobar.

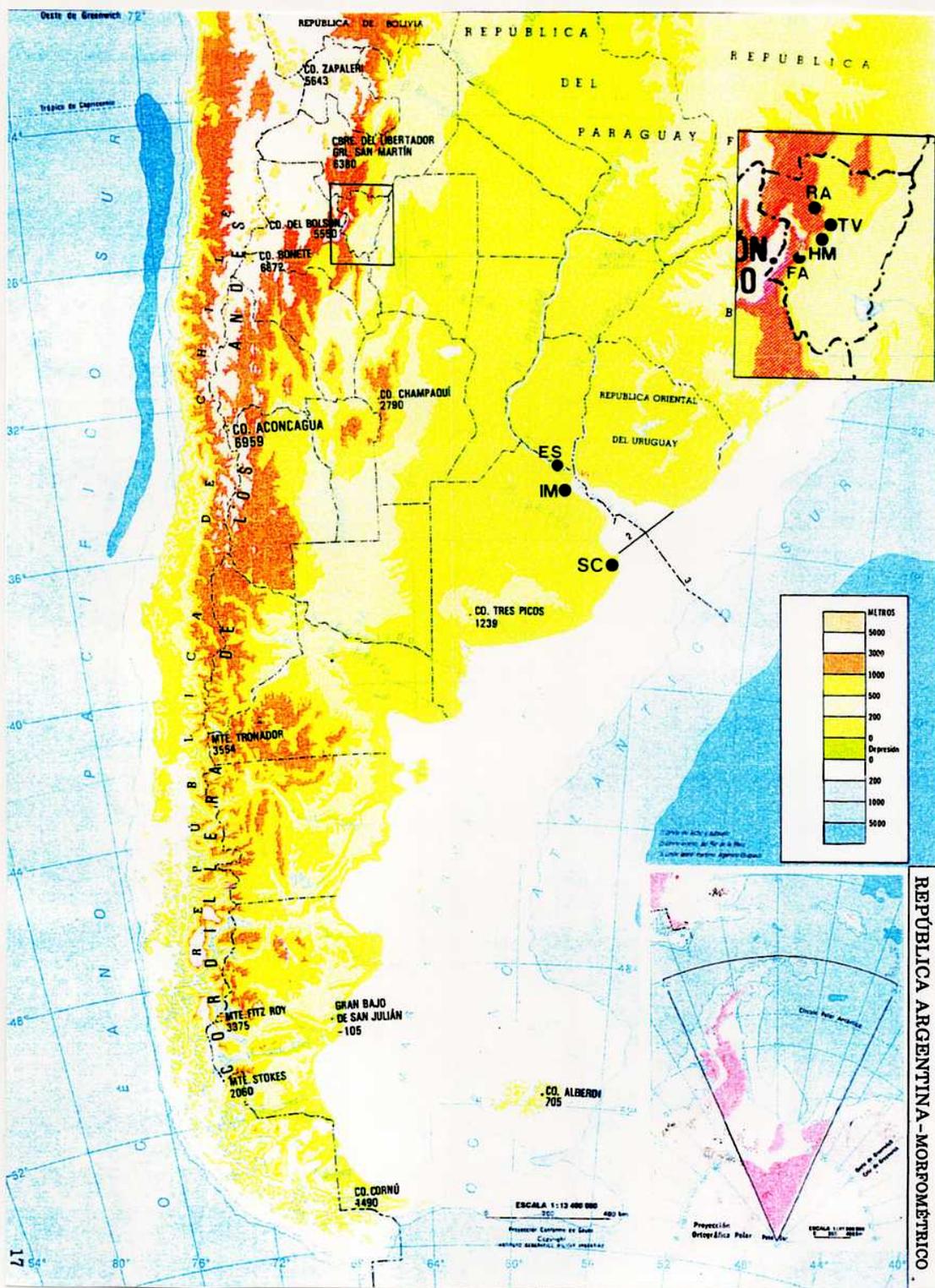


Tabla 1: Tabla de datos meteorológicos y localización geográfica de las localidades muestreadas. Se indica para cada población N: número de individuos analizados y el año en que fueron coleccionados. Los datos climáticos fueron obtenidos del Servicio Meteorológico Nacional.

	RA	HM	TV	TI	FA	IM	ES
Temp.Max.Abs	36	42,8	42,4	42,1	41,8	40,6	40
Temp.Max.	19,6	25,2	25	25,7	25,2	22,4	22,2
Temp.Min.Abs.	-5,2	-3,8	-3,2	-2,7	-4	-3,9	-4,2
Temp.Min.	11,4	13	13	14,3	12,8	11,6	11,2
Hum.Rel.%	75	76	72	72	77	71	69
Precip.(mm)	1620	1050	1000	1165	1298	1001	1000
Longitud(O)	65°23	65°19	65°46	65°09	65°15	58°45	57°35
Latitud(S)	26°39	26°48	26°45	26°43	27°01	34°37	34°41
N	40	30	30	29	34	40	28
Año de coleccion	1991	1991	1991	1990	1993	1992	1993

b) Métodos

b.1- puesta a punto

Se realizó la puesta a punto de la técnica de electroforesis de isoenzimas para la especie *Dichroplus elongatus*. Muchos de los ensayos dieron resultados negativos debido a que la enzima en estudio no presentaba actividad en ese sistema de soluciones, o porque los resultados obtenidos no eran repetibles (las bandas eran demasiado tenues o borrosas dificultando su interpretación). Se procedió entonces a la utilización de otra solución.

Tabla 2: Tabla de soluciones ensayadas durante la puesta a punto de la técnica.

Sistema	Solución ensayada
AAT Aspartato amino transferasa	Borato de Litio ph=7,4 Tris borato ph=8,6 *
MDH Malato deshidrogenasa	Poulik ph=7,9 Tris cítrico ph=7 *
SOD Superóxido dismutasa	Poulik ph=7,9 Borato de Litio ph=7,4
EST Esterasas	Poulik ph=7,9 Tris Maleico ph=7,4 *
PEP Peptidasas	Tris borato ph=8,6 *
ME Enzima málico	Tris cítrico ph=5,8 *
LDH Láctico deshidrogenasa	Tris maleico ph=7,4 *
MNR Menadione reductasa	Tris cítrico ph=7 *
ODH Octanol deshidrogenasa	Tris borato ph=9 *

(el * señala las pruebas positivas)

Algunos sistemas isoenzimáticos: Glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (6PGD), Glutamato deshidrogenasa (GDH), Alcohol deshidrogenasa (ADH), Fosfo glucosa isomerasa (PGI), Isocitrato deshidrogenasa (IDH), Nicotinamida adenina deshidrogenasa (NADH) no resolvieron en ninguno de los sistemas de soluciones ensayados y por lo tanto fueron excluidos de este estudio.

Asimismo se encontró que algunos sistemas resuelven mejor si se utiliza la cabeza del saltamontes para el extracto como en el caso de AAT, mientras que otros sistemas lo hacen mejor si se utiliza la pata (LDH y PEP).

b.2. - métodos isoenzimáticos utilizados

Se logró la puesta a punto de un total de diez sistemas isoenzimáticos: Malato deshidrogenasa (MDH), Enzima málico (ME), Octanol deshidrogenasa (ODH), Superóxido dismutasa (SOD), Aspartato amino transferasa (AAT), Láctico deshidrogenasa (LDH), Menadione reductasa (MNR), Esterasas (EST), Peptidasas (PEP) y Aminopeptidasas (AMP) (los sistemas marcados con asterisco en la tabla 2 son los explicados con detalle en la tabla 3 adjunta y todos fueron extraídos de Shaw y Prassat, 1970 [1], Schaal y Anderson 1974 [2] y Ayala *et al.* 1974 [3]).

Tabla 3: Lista de enzimas, sistemas de buffer y técnicas de tinción.

Enzima	Solución de cubas y de gel	Tinción
AAT	Cubas: Tris 0,18 M Ácido bórico 0,1M Edta 0,004M pH = 8,6 Gel: 1 sol. cubas: 3 agua	[1]
PEP	igual que AAT	[2]
ME	Tris citrato pH= 5,8 [2]	[1]
MDH	Tris citrato pH=7 ([2], sist de sol. I)	[2]
LDH	Tris maleico pH= 7,4 ([2], sist de sol XVIII)	[2] sustr. lactato de Na
EST	igual que LDH	[2]
SOD	Sol. discontinuo de [1] Cubas: Borato de Litio pH=7,4 Gel: Tris citrato pH= 8,2	[3]
MNR	Cubas: Tris 0,13M Acido cítrico 0,43M pH = 7 Gel: 1 sol. cubas: 3 agua	Tris HCL 0,05M MTT 0,6mM NadhNa ₂ 0,4mM Menadione Na Bisulfite 0,07mM pH = 7
ODH	Tris borato pH= 9 ([4], sist. de sol. B	[4]

Los extractos enzimáticos se realizaron homogeneizando la cabeza, torax eviscerado o pata del saltamontes en una solución de extracción Tris-HCL 0,1 M pH= 7,1 y luego centrifugando a 7000 rpm durante 10 minutos.

Se empleó la técnica de electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida al 7% en la que se siembran papeles de filtro embebidos en el sobrenadante y se someten a un campo eléctrico

(100 V). Se utilizó el azul de bromofenol como marcador de frente con el objeto de determinar las movilidades relativas (MR).

$$R_f = \frac{\text{dist recorrida por la banda en estudio} \times 100}{\text{dist recorrida por el azul de bromof.}}$$

Las corridas llevan entre 3-5 horas luego de las cuales se procede a la tinción del gel.

Para AAT, SOD y MNR se mezclan los polvos colorantes con el sustrato en la solución de tinción y se agregan sobre el gel.

Para el sistema EST los sustratos utilizados (α - naftil acetato y β - naftil acetato) se solubilizan en 3 ml. de acetona y se agregan sobre el gel ya sumergido en la solución con los colorantes.

Para LDH, MDH, ME y ODH la solución que contiene el sustrato (lactato de sodio, l-malato de sodio y octanol en etanol respectivamente) se agrega sobre el gel que también está sumergido en la solución con los colorantes.

Para PEP todos los colorantes más el sustrato se solubilizan en el buffer y se mezclan con agar al 2% (disolviendo a 40 °C) y se echa sobre el gel donde se solidifica.

El revelado se realiza en estufa a 37°C durante aproximadamente una hora. En el caso de SOD se expone el gel a la luz intensa durante dos horas. Para todos los sistemas, luego del revelado se lava el gel con agua destilada y se fijan en una solución

de alcohol: ácido acético: agua en una proporción 5:1:5. Luego el gel se puede guardar y se procede a fotografiarlo.

b.3. - métodos estadísticos

Se cuantificó la variabilidad genética de las poblaciones analizadas mediante la heterocigosis media H y el porcentaje de loci polimórficos P (Nei, 1975).

La estructura poblacional se analizó mediante los índices de fijación F (Wright, 1951, 1965; Nei, 1977). Las estimaciones se realizaron mediante el método de Nei y Chesser (1983) con el programa de Vilardi (1989). Las poblaciones de Tucumán y Buenos Aires fueron analizadas globalmente y por separado. Se calcularon los valores de F_{ST} para ambos arreglos con el objetivo de evaluar si la variabilidad genética se distribuye de acuerdo con algún patrón de regionalización geográfica.

Se evaluó la diferenciación entre poblaciones calculando las distancias genéticas de Nei (1972). Las estimaciones de H y D se realizaron mediante los métodos descritos por Nei (1987) que corrigen las estimaciones para muestras pequeñas, con el programa GENIND (Vilardi, 1993). Se construyó un fenograma utilizando las identidades genéticas entre poblaciones. Se analizó la correspondencia entre matrices de distancia geográfica y distancias genéticas y flujo génico

estimado entre pares de poblaciones mediante el test de Mantel (1967).

La dependencia de frecuencias alélicas y variables ambientales (geográficas y climáticas) se analizó mediante correlaciones simples (Sokal y Rolfh 1983) y análisis de regresión múltiple utilizando el método de selección por pasos (stepwise selection procedure) que permite el control de la entrada de variables al modelo, (lo que es recomendable en este caso por el alto número de variables independientes (geográficas y climáticas) incluidas en el análisis, (Tabla 1). Los datos de frecuencias alélicas a ser utilizadas en las correlaciones y regresiones fueron transformados según el estadístico de Christiansen (1976) que normaliza los datos ya que considera el número de individuos estudiados en cada población según la siguiente ecuación:

$$X_{chr} = (p_i - p_0) \times \frac{\sqrt{2N_i}}{p_0(1-p_0)} = \quad \text{ec.1}$$

siendo p_0 el promedio ponderado de las frecuencias para cada población. (se muestran los datos de las frecuencias transformadas y sin transformar en la Tabla 4c).

Las estimaciones de flujo génico se derivaron de los valores de los estadísticos F_{st} mediante la relación $F_{st} = 1/(1+4Nm)$ (Wright, 1931), donde Nm es el número esperado de migrantes por generación, un

indicador del flujo génico entre poblaciones. Se analizó entonces el flujo génico entre pares de poblaciones y su relación con las distancias establecidas por los índices de Nei.

II - Análisis de polimorfismos de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD)

a) Materiales

Se realizaron extracciones de ADN genómico total de 37 individuos provenientes de seis poblaciones ya analizadas isoenzimáticamente: Raco (RA), Tafí Viejo (TV), Horco Molle (HM), Famaillá (FA), Ingeniero Maschwitz (IM), y Escobar (ES).

b) Métodos

b.1 - puesta a punto

b.1.i - Extracción de ADN:

Se extrajo ADN total de saltamontes adultos utilizando la técnica de Marchant (1988) que se describe a continuación:

- 1) Machacar el insecto hasta obtener un polvo fino en un mortero con aire líquido (o bien N₂ líquido).
- 2) Permitir que el aire se evapore y agregar el polvo a 5 ml. de

Solución A 8:1:1

8 partes de 0.05 M Tris(HCl), 0.1 M NaCl, 0.1 M Edta Na₂; 1 parte de 5 % SDS y 1 parte de 2 mg/ml Proteinasa K fresca (Promega).

3) Incubar esta suspensión a 37°C durante un período de 1 a 3 horas.

4) Extraer con 3 ml. de fenol equilibrado con una solución de 10mM Tris, 10mM Edta ph=7,5.

5) Precipitar el ADN de la fase acuosa con 2 volúmenes de perclorato de sodio 2.9M en etanol 80%, mezclar y guardar durante una hora a -20°C.

6) Remover el ADN precipitado con pipeta Pasteur o con pinza si forma una masa visible o por centrifugación a 11.000 rpm durante 15 minutos.

7) Lavar el ADN con Etanol 70%

8) Dejar secar

9) Redisolver en 200 µl de TE ph 8.

Luego de remover el ARN usando RNAsa A (100µg/ml) se realizó una segunda purificación de proteínas con fenol seguida de otra purificación mediante fenol:cloroformo isoamílico (24::24:1). Luego se precipita y lava el ácido nucleico obtenido. Las concentraciones y la pureza de las extracciones fueron estimadas a partir de las absorbancias a 260 y 280nm de muestras diluídas.

b.1.ii - Amplificaciones

Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando dos cebadores ("primers") (Promega) cuyas secuencias y códigos de fabricación son:

A015'- CCCAAAGGTCC -3'

A095'- CTACTGCCGT -3'

Se realizaron experimentos de optimización usando ADN extraído de ejemplares de la población de Famaillá donde se variaron las concentraciones de ADN templado, de los primers, de los dNTPs y de la Taq polimerasa para determinar cuáles de las condiciones ensayadas generaban los patrones más nítidos y reproducibles.

Las mezclas de reacción contienen:

0.5 U Taq polimerasa (Promega)
2.5 μ l buffer de reacción 10x (Promega)
15 ng primer (Biodynamics)
100 μ M de cada dinucleósido fosfato (Promega)
60 ng de ADN genómico

Se agregaron a la mezcla 40 μ l de aceite mineral.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 500 μ l utilizando un termociclador Techne (GeneE).

Las reacciones fueron sometidas a 45 ciclos de amplificación con el siguiente régimen de temperaturas:

- 1' a 94°C (desnaturalización)
- 1' a 36°C (anillamiento -"annealing"- del cebador "primer" con baja estrictancia)
- 2' a 72°C (extensión)

Previo al primer ciclo se aplicó un paso de desnaturalización más prolongado (1 ciclo de 6' a 94°C). Luego del ciclo final se aplicó un paso de extensión (1 ciclo de 6' a 72°C) seguido de varios pasos de enfriamiento (6' a 45°C y 6' a 72°C).

Para descartar la interferencia de cualquier producto de amplificación proveniente de contaminación de las muestras se utilizaron rutinariamente varios controles, uno sin cebador "primer" y uno sin ADN templado. No se obtuvo amplificación en ninguno de los controles.

b.1.iii - Análisis de productos de amplificación

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.4% y se visualizaron con bromuro de etidio para luego ser fotografiados.

Se estimó el tamaño de los productos de amplificación al compararlos con varios marcadores de peso molecular: bacteriófago λ digerido con *Eco* RI y *Hind* III y fago ϕ 174 digerido con *Hae* III (Promega).

b.2. - Análisis estadístico

Los fragmentos amplificados se registraron por individuo y por población como 1 (presente) y 0 (ausente).

Se deben considerar varios supuestos para poder realizar los cálculos de frecuencias génicas y genotípicas y aplicar los estimadores de diversidad intra e interpoblacional propuestos por Lynch y Milligan (1994) para datos obtenidos mediante Rapds:

1) la interpretación de los patrones de bandas es inequívoca, significando esto que dos alelos marcadores de dos loci diferentes no "comigran" a la misma posición en un gel.

2) cada locus puede ser tratado como un sistema dialélico, siendo solo uno de ellos amplificable por PCR (el alelo "nulo" no amplifica). Como los heterocigotas no pueden ser diferenciados de los homocigotas dominantes mediante la técnica standard de Rapds, el alelo marcador es considerado "dominante" con respecto al alelo "nulo". La única variable observable para un locus es entonces la proporción de individuos en la población con y sin el marcador indicadas como $(1 - x)$ y (x) respectivamente (Tabla 4a).

b.2.i - Estimaciones de frecuencias génicas y genotípicas

Si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, X es igual a q^2 y $x^{1/2}$ es la frecuencia del alelo nulo. Sin embargo, $x^{1/2}$,

donde x es la proporción observada de N individuos muestreados que no exhiben el marcador, provee una subestimación de q . Un estimador menos sesgado es:

$$q = x^{1/2} (1 - \frac{\text{Var}(x)}{8x^2})^{-1} = \quad \text{ec. 2a}$$

(Tabla 5a)

donde $\text{Var}(x) = x(1-x)/N$ (Tabla 5b) es la varianza muestral de la frecuencia de homocigotas nulos.

El valor determinado por la siguiente fórmula

$$\text{Var}(q) = \frac{1-x}{4N} \quad \text{ec. 2b}$$

es la varianza muestral de la frecuencia alélica (Tabla 5b).

b.2.i i - Diversidad genética intrapoblacional

Con las estimas de frecuencias alélicas es posible estimar la diversidad dentro de una población. Se utiliza el término "diversidad genética" en un sentido informal ya que es probable que los fragmentos amplificados por RAPDs contengan solamente ADN no codificante y por lo tanto a pesar de aportar para los cálculos de variabilidad no se pueden hacer inferencias acerca de la acción de la selección natural de esta variabilidad ya que se la debe considerar selectivamente neutra.

Se emplea la medición convencional de diversidad $H_j(i)$, que es la probabilidad que dos genes, tomados al azar de la población j difieran en el locus i . Esta medida sería equivalente a la heterocigosis esperada en condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg y bajo los supuestos de nuestro modelo puede ser considerado como la probabilidad que un par de alelos tomados al azar contengan un alelo marcador y otro nulo. Un estimador de esta cantidad sería:

$$H_j(i) = 2q_j(i)[1 - q_j(i)] + 2 \text{Var}[q_j(i)] \quad \text{ec. 3a}$$

para cada locus (Tabla 6 a) y su varianza muestral es aproximadamente (Tabla 6 b)

$$\text{Var}[H_j(i)] = 4 [1 - 2q_j(i)]^2 \text{Var}[q_j(i)] \quad \text{ec. 3b}$$

Al promediar por el número de loci observados (L), la diversidad genética media observada en la población j es

$$H_j = \frac{1}{L} \sum H_j(i) \quad \text{ec. 4a}$$

La contribución esperada a la varianza de la diversidad genética promedio debida al muestreo de un número finito de individuos es

$$\text{Var}_l = 1/L^2 \times \varepsilon \text{Var}[\hat{H}_j(i)] = \quad \text{ec. 4b}$$

La varianza muestral de \hat{H}_j debida a la variación en diversidad genética entre loci es entonces

$$\text{Var}_L (H_j) = \text{Var}(H_j) - \text{Var}_l (H_j) \quad \text{ec. 4c}$$

Finalmente, si se analizaron n poblaciones, la diversidad intrapoblacional promedio puede ser estimada mediante

$$H_w = 1/n \times E H_j \quad \text{ec. 5a}$$

donde H_w significa H dentro de la población, siendo su varianza muestral $\text{Var}(\hat{H}_w)$ una función de muestrear un número finito de poblaciones, loci e individuos, todos se incluyen en la siguiente fórmula

$$\text{Var}(H_w) = 1/n \times (n-1) \times E [H_i - H_w]^2 \quad \text{ec. 5b}$$

Siguiendo la misma lógica que anteriormente la varianza muestral total de \hat{H}_w puede ser particionada en las contribuciones de muestrear individuos (I), loci (L) y poblaciones (P).

$$\text{Var}_l (H_w) = 1/n^2 \times E \text{Var}_l(H_j) \quad \text{ec. 5c}$$

$$\text{Var}_L(Hw) = 1/n^2 \times E \text{Var}_L(Hj) \quad \text{ec. 5d}$$

$$\text{Varp}(Hw) = \text{Var}(Hw) - \text{Var}_L(Hw) - \text{Var}_L(Hj) \quad \text{ec. 5e}$$

b.2.iii - Estructuración poblacional

Al contar con datos provenientes de más de una población es de interés evaluar el grado al cual la diversidad genética total se particiona en sus componentes intra e interpoblacionales.

Un estimador de la heterocigosis entre las poblaciones j y k, que es la probabilidad que un gen extraído al azar de la población j difiera de una extraído de la población k, sería (Tabla 8a)

$$H_{jk}(i) = q_j(i) + q_k(i) - 2q_j(i)q_k(i) = \quad \text{ec. 6a}$$

y su varianza debido al muestreo de un número finito de individuos es aproximadamente (Tabla 8b)

$$\begin{aligned} \text{Var}[H_{jk}(i)] = & [1 - 2q_k(i)]^2 \text{Var}[q_j(i)] + [1 - 2q_j(i)]^2 \text{Var}[q_k(i)] \\ & + 4 \text{Var}[q_j(i)] \text{Var}[q_k(i)] \quad \text{ec. 6b} \end{aligned}$$

En ausencia de subdivisión poblacional las frecuencias alélicas en todas las poblaciones son iguales de modo que:

$$H'_{jk}(i) = H_j(i) = H_k(i).$$

Entonces una definición más significativa de la diversidad entre poblaciones es la heterocigosis en exceso de aquella observada dentro de las poblaciones (Tabla 8b)

$$H_{jk}(i) = H'_{jk}(i) - \frac{[H_j(i)+H_k(i)]}{2} \quad \text{ec. 7a}$$

cuya varianza muestral es (Tabla 16a)

$$\text{Var}[H'_{jk}(i)] = \text{Var}[H'_{jk}(i)] + \text{Var}[H_j(i)] + \text{Var}[H_k(i)]/4 - \text{Cov}[H'_j(i), H'_{jk}(i)] - \text{Cov}[H'_k(i), H'_{jk}(i)] \quad \text{ec. 7b}$$

Todos los términos de esta ecuación han sido definidos anteriormente excepto los últimos dos, y estos son de la forma (Tabla 15b)

$$\text{Cov}[H'_j(i), H'_{jk}(i)] = 2[1-2q_j(i)][1-2q_k(i)]\text{Var } q_j(i) \quad \text{ec. 7c}$$

Dicha covarianza existe porque los mismos individuos de la población j son utilizados para la estimación de $\hat{H}_j(i)$ y $\hat{H}_{jk}(i)$. Promediando sobre todos los loci, la estima de la diversidad genética promedio entre las poblaciones j y k es (Tabla 9a).

$$H_{jk} = \frac{1}{L} \times E H_{jk}(i) \quad \text{ec. 8a}$$

y su varianza (Tabla 9b)

$$\text{Var}(H_{jk}) = 1/L(L-1) \times E (H_{jk(i)} - H_{jk})^2 \quad \text{ec.8b}$$

La diversidad promedio entre poblaciones será obtenida promediando sobre todos los pares de poblaciones diferentes

$$H_b = 2/n(n-1) \times E H_{jk} \quad \text{ec. 9a}$$

(donde H_b significa H entre las poblaciones) y su varianza sería entonces

$$\text{Var}(H_b) = 1/n(n-1) \times E H_{jk} \quad \text{ec. 9b}$$

El índice de Wright para subdivisión poblacional $F_{st} = H_b/H_t$, donde $H_t = H_b + H_w$. Este índice toma valores extremos de 0 cuando todas las poblaciones tienen idénticas frecuencias alélicas y de 1 cuando todas las poblaciones son completamente homocigotas para alelos alternativos. Un estimador no sesgado de F_{st} puede ser obtenido utilizando la siguiente fórmula .

$$F_{st} = H_b/H_t \times \left(1 + H_b \text{Var}(H_w) - H_w \text{Var}(H_b) + (H_b - H_w) \text{Cov}(H_b, H_w) / H_b H_t \right)^{-1}$$

ec. 10a

Todos los elementos de esta ecuación han sido definidos con anterioridad excepto la covarianza muestral de los estimadores de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones

$$\text{Cov}(H_b, H_w) = 1/n [1/n(n-1) \times (E H_j \cdot E H_k) - (H_w \times H_b)]$$

ec. 10b

Dicha covarianza existe porque se utilizan las mismas poblaciones, loci e individuos para estimar H_b y H_w . La varianza muestral de F_{st} es aproximadamente

$$\text{Var}(F_{st}) = (F_{st}/H_b)^2 \times x \quad \text{ec. 10c}$$

$$x[(H_w/H_b)^2 \text{Var}(H_b) - 2(H_w/H_b)\text{Cov}(H_b, H_w) + \text{Var}(H_w)]$$

b.2.iv. - Distancias genéticas

Nei (1972) introdujo una medida de distancia genética entre poblaciones, D_{jk} , que proporciona una estima del número medio de mutaciones que separan a dos genes de dos poblaciones. La distancia genética de Nei da cuenta de múltiples mutaciones por locus, y en el caso de poblaciones aisladas y de una tasa de sustitución constante, es proporcional al tiempo medio de "coalescencia" de dos genes en dos poblaciones diferentes.

Si $J_j = 1 - H_j$ es la identidad genética dentro de una población (Tabla 11), entonces $J_{jk} = 1 - H_{jk}$ es la identidad genética entre las poblaciones j y k (Tabla 12) ambos promediados sobre todos los loci, entonces $D = -\ln(J_j / J_j J_k)$ es la distancia genética de Nei. Un estimador no sesgado de D_{jk} esta dado por la expresión

$$D_{jk} = -\ln (J_{jk} / J_j J_k) - \text{Var}(H'_{jk})/2 \times J_{jk}^2 + \text{Var}(H_j)/4J_j^2 + \text{Var}(H_k)/4J_k^2$$

ec. 11a

y su varianza muestral es aproximadamente

$$\text{Var}(D_{jk}) = \text{Var}(H_j)/4J_j^2 + \text{Var}(H_k)/4J_k^2 + \text{Var}(H'_{jk})/J_{jk}^2 - \text{Cov}(H_j, H'_{jk})/J_j J_k - \text{Cov}(H_k, H'_{jk})/J_j J_k$$

ec. 11b

Todos los elementos de esta fórmula han sido definidos anteriormente excepto

$$\text{Cov}(H_j, H'_{jk}) = 1/L^2 \times \text{Cov}[H_j(i), H'_{jk}(i)]$$

ec. 11c

Los valores D_{jk} se utilizaron para construir fenogramas utilizando el método de UPGMA (Sneath and Sokal 1973).

**II - Análisis de polimorfismos para fragmentos de
restricción
de ADNmt en especies del género *Dichroplus***

a) Colección del material

Durante los meses de febrero y marzo de 1995 se realizaron los viajes de colección a diferentes localidades de la Provincia de Buenos Aires para la recolección de ejemplares de diferentes especies del género *Dichroplus* en estudio:

Localidad	Especie coleccionada
Escobar Km.52	<i>D. bergii</i> <i>D. elongatus</i> <i>D. punctulatus</i>
Ottamendi Km.66	<i>D. pratensis</i>
Campana Km.75	<i>D.bergii</i>
Benito Juarez, Ruta 86 Km. 37	<i>D. patruelis</i>
Benito Juarez, a 3 Km. ruta 86	<i>Scotussa lemniscata</i>

También se utilizan para estos estudios ejemplares de una población de *D. vittatus* coleccionada en las cercanías de la ciudad de San Miguel de Tucumán.

Un ejemplar de cada especie fue determinado por la Dra. M.M. Cigliano del Museo de Ciencias Naturales de La Plata.

b) Métodos

b.1 - Clonado del ADN mitocondrial de *Caledia captiva*

Previo a la transformación de las bacterias con los plásmidos se procedió a hacerlas competentes usando Cloruro de Calcio para luego transformarlas mediante TRATAMIENTO TERMICO. Se disponía de tres plásmidos pUC18; pCc4, pCc11 y pCc15 con tres insertos de diferente tamaño: 3; 5 y 8 kb respectivamente que representan la totalidad del genoma mitocondrial completo de *Caledia captiva* (gentilmente cedidos por el Dr.Adam Marchant)

Se sembraron las bacterias en un medio selectivo y se obtuvieron así colonias que contuvieran el plásmido (ya que el plásmido contiene una resistencia a ampicilina sólo las colonias que presentaran resistencia a ese antibiótico crecieron en el medio selectivo y contenían también el plásmido).

Luego se picaron esas colonias y se cultivaron en medio LB para realizar la extracción de ADN plasmídico. Esta extracción se realizó primero a pequeña escala (**mini-prep**) para comprobar la presencia de plásmido realizando una lisis de las células bacterianas y luego una desnaturalización violenta del ADN bacteriano mediante alta temperatura (boiling method) para recuperar sólo el ADN plasmídico. Al obtener resultados positivos se intentó realizar una extracción del plásmido a gran escala (**maxi-prep**) mediante una desnaturalización del ADN genómico con una subida de pH abrupta y precipitación de los complejos de ADN genómico y membranas desnaturalizadas mientras que los plásmidos permanecen en solución.

Se guardaron colonias en glicerol (stabs) con los tres plásmidos por separado, para su utilización en el futuro.

b.2 - Extracción de ADN genómico total

Se realizaron las extracciones de acuerdo al protocolo de Marchant (1988) puesto a punto para *Caledia captiva* y descrito en el apartado **b.2.** de la sección de Análisis de polimorfismos de ADN amplificados al azar.

Se extrajo de esta manera ADN de ejemplares de las siguientes especies del género *Dichroplus* que se analizan en forma independiente:

D. elongatus 29 individuos

D. vitatus 8 individuos

D. bergii 6 individuos

D. punctulatus 6 individuos

D. pratensis 6 individuos

D. patruelis 7 individuos

El protocolo utilizado con pequeñas modificaciones probó ser de rendimiento aceptable, siendo *D. pratensis* la especie de la que se extrae mayor cantidad de ADN, debido a su mayor tamaño. El ADN obtenido es suficiente para ser utilizado en diez digestiones, (aprox. 20 µg de ADN por digestión) considerando posibles repeticiones.

También se extrajo ADN de cuatro individuos de *Scotussa lemniscata* para utilizar este grupo en las comparaciones como grupo externo o "outgroup".

b.3 - Análisis del polimorfismo para el largo de los fragmentos de restricción en ADNm (mitocondrial).

b.3.i - Digestión de ADN genómico total con enzimas de restricción

Se utilizaron enzimas que tienen secuencias de restricción de cuatro y seis bases:

Enzima	secuencia de restricción
EcoRI	G*AATTC
HindIII	A*AGCTT
BamHI	G*GATCC
ScaI	AGT*ACT
AluI	T*CTAGA
XbaI	T*CTAGA
Pst I	CTGCA*G
HhaI	GCG*C
HaeIII	GG*CC

* indica el sitio de corte

En un tubo de microcentrífuga esteril se agregan los reactivos en el siguiente orden:

- ADN 18 μ l (aprox.20 μ g.)
- buffer 10x 5 μ l
- BSA 20mg/ml 5 μ l
- RNAsa 10mg/ml 2 μ l
- H₂O hasta 50 μ l
- enzima 2U/ μ l 1 μ l

Las restricciones se realizaron primero en un baño térmico a 37°C durante dos horas. Luego se modificó el método al comprobar que se obtienen mejores resultados realizando las restricciones durante menos tiempo y agregando más cantidad de enzima a la mitad de la reacción. Esto se debe a que el ADN puede estar contaminado con nucleasas cuya acción se propiciaría con tiempos de incubación más prolongados, degradando así el material en forma inespecífica y perdiendo información.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación con la enzima se comprueba que la digestión haya sido completa sembrando en un gel de agarosa al 0.6% :

4 μ l ADN digerido
10 μ l TE ph 8
2 μ l buffer de siembra

esto se realiza para evitar que se dificulte la interpretación de las bandas al encontrarse el ADN parcialmente digerido, presentando bandas de muy alto peso molecular.

b.3.ii - Corrida de ADN genómico digerido

Se siembra entonces la totalidad del ADN digerido (que incluye al ADN de las organelas) en un gel de agarosa al 0,6 - 0,5% :

48 μ l ADN digerido
2 μ l buffer de siembra

paralelamente se siembra también fago lambda digerido con *Hind* III como marcador de peso molecular y a su vez se siembra alguno de los fragmentos de ADNmt a utilizar como sonda, como control positivo de la experiencia. Este gel se deja corriendo a una corriente de 15 a 20mA en buffer TAE ph8 más de doce horas (durante toda la noche) ya que a mayor amperaje se pierden fragmentos de tamaño pequeño que pueden ser de utilidad al interpretar los resultados. Se adoptó una concentración de agarosa

menor (0,5%) para favorecer la mejor separación de las bandas de gran tamaño.

b.3.iii - Tratamiento del gel y transferencia (Southern)

1) Se tiñe el gel durante 10 minutos colocándolo en una solución con 0.5mg/ml de bromuro de etidio (se redujo luego la concentración a 25µg/ml para disminuir la contaminación y el tiempo de desteñido) para controlar la eficiencia de la corrida. Luego de visualizarlo al UV se desteñe sumergiéndolo en agua durante aproximadamente 30 minutos (opcional, ya que en estudios posteriores se comprobó que de no realizar este lavado se puede comprobar también la eficiencia de la transferencia a la membrana solo con exponerla a luz UV).

2) Depuración: Tratamiento ácido controlado que depurina el ADN mejorando la transferencia de fragmentos grandes (>10kb) del gel a la membrana. Se sumerge el gel durante 5 minutos en una solución de HCL 250mM a temperatura ambiente. Lavar con agua (opcional: ya que probó no ser necesario dado que los fragmentos de alto peso molecular transferían eficientemente y mediante esta depuración se podía perder algunos fragmentos de bajo peso molecular).

3) Desnaturalización, neutralización y transferencia

- Se sumerge el gel en solución de desnaturalización dos veces durante 15 minutos. Esto desnaturaliza el ADN antes de transferirlo por ser la solución de pH alcalino. Se puede comprobar que la desnaturalización es completa volviendo a ver el gel al UV si no fue desteñido. No se debe observar la estela de digestión de fragmentos ya que al estar el ADN desnaturalizado ya no retiene al bromuro de etidio que es un intercalante que fluoresce al exponerlo al UV. Este paso es muy importante para una transferencia eficiente. Lavar con agua.
- Sumergir el gel en solución de neutralización dos veces durante 15 minutos. Esto recupera el pH neutro.
- Armar la transferencia de ADN a una membrana por capilaridad usando 20xSSC según Maniatis *et al.*, 1982, invirtiendo el gel de modo que la parte inferior quede en contacto con la membrana. Se utilizan membranas de nylon y se realiza la transferencia durante más de doce horas ("overnight") para asegurar la eficiencia. Luego de la transferencia se marca la membrana para identificar las posición de las muestras y se sumerge en 6xSSC durante 5 minutos para eliminar restos de agarosa que pudieran quedar.

4) Fijación del ADN: Se expone el lado de la membrana que lleva el ADN (que estuvo en contacto con el gel) durante 1-1,5 minutos a una fuente de UV para que se una covalentemente a la membrana. Si la

membrana no se utiliza de inmediato puede ser guardada a +4°C para ser usada en el futuro.

b.3.iv - Marcación no radioactiva de los fragmentos de ADNmt:

Purificación de fragmentos de ADN del gel de agarosa

Luego de digerir los plásmidos puC 18 con la enzima de restricción correspondiente (SacI) para poder separar los fragmentos de interés, se utilizó el siguiente protocolo (Curran *com.pers.*). El objetivo es aislar del gel de agarosa los fragmentos identificados como ADNmt de *Caledia captiva* para ser utilizado en un futuro como sonda específica para especies del género *Dichroplus*.

1) Luego de correr el gel se visualizan los fragmentos a la luz UV y se corta con un bisturí el fragmento de interés.

2) Se coloca el fragmento dentro de un eppendorf pequeño (500ul) con una perforación realizada con una aguja hipodérmica (22g) y relleno con fibra de vidrio esteril.

3) Se coloca el eppendorf pequeño dentro de uno de mayor tamaño (1.5ml) y se centrifuga a 12000g durante 10 minutos.

4) Extraer con N-butanol saturado con agua.

5) Precipitar añadiendo 1/10 volumen de Acetato sódico y dos volúmenes de etanol.

6) Incubar durante 2 hrs. a -20°C . Centrifugar, descartar el sobrenadante, lavar con etanol 70%.

7) Centrifugar, descartar el sobrenadante y secar el pellet al vacío.

8) Disolver en 100-200 μl de agua bidestilada esteril.

9) Purificación del fragmento con sucesivas fenolizaciones.

Se realiza la marcación de los tres fragmentos de ADNmt utilizando el DIG DNA labelling and detection kit (Boehringer) que incorpora los nucleótidos marcados con digoxigenina mediante el método de **Random priming** utilizando primers a azar para unirse al ADN templado. La marca se incorpora mediante la enzima Klenow.

Se procede a agregar en un tubo de microcentrífuga previamente enfriado los reactivos en el siguiente orden (el ADN templado debe ser desnaturalizado en baño a 100°C durante 10 minutos y enfriado inmediatamente en baño de hielo/etanol durante 30 segundos antes de usarlo):

ADN templado(10ng-3 μg)
Mezcla de hexanucleótidos(10x) 2 μl
dNTP mezcla marcadora (10x) 2 μl
H₂O hasta 19 μl
enzima Klenow 1 μl

Se incuba la reacción durante por lo menos 60 minutos para luego precipitar el ADN con un buffer salino concentrado y etanol a baja temperatura para luego recuperar el ADN separándolo de los nucleótidos marcados no incorporados. Las sondas marcadas se

guardan a -20°C hasta el momento de ser utilizadas. La marcación probó ser más eficiente cuando se marca durante menor cantidad de tiempo. Se descartó entonces la reacción aumentada ó "scaled-up" que necesita más cantidad de enzima e incubación durante 16 hrs.

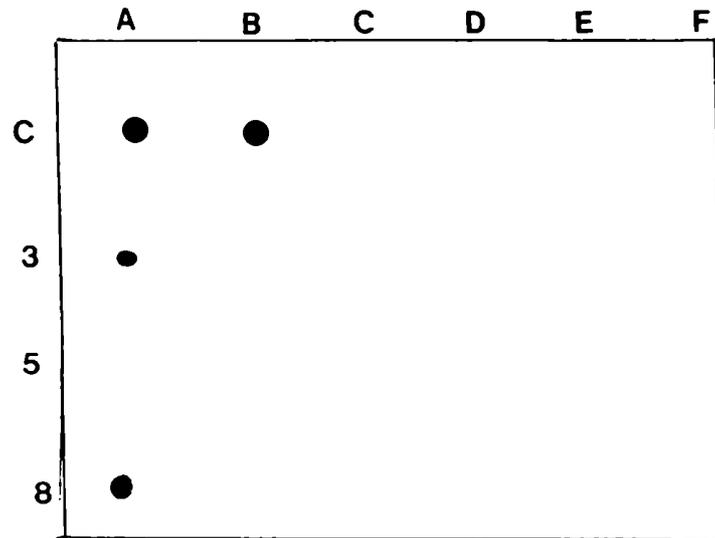
Una vez realizada la marcación es necesario estimar el rendimiento de la misma a fin de calcular la cantidad de sonda que se utilizará para la posterior hibridación. Esto se realiza con diluciones seriadas de un ADN control del KIT de concentración conocida y del ADN marcado en el experimento anterior. Esta diluciones se fijan a un trozo de membrana de nylon (Dot-blott) y se le aplican todos los reactivos necesarios para la reacción colorimétrica. Por comparación de intensidades se conoce entonces la concentración de cada fragmento marcado. Como se realiza una dilución inicial 1/20 la concentración obtenida por comparación con el control debe luego multiplicarse. Las concentraciones obtenidas fueron:

frag 3kb 14 ng/ μl
frag 5kb 200 pg/ μl
frag 8kb 16 ng/ μl

Se repitió entonces la marcación del fragmento 5 obteniéndose luego de varios ensayos:

frag 5kb 15 ng/ μl

Figura 2: Dot blott realizado para estimar el rendimiento de la marcación de los tres fragmentos de ADNmt de 3, 5 y 8 kb respectivamente, la concentración de sonda marcada se calcula por comparación con ADN marcado de concentración conocida (C).



b.3.v - Hibridación de la membrana con la sonda marcada:

Una vez conocida la concentración de los tres fragmentos marcados se prepara la mezcla de sonda agregando cantidades equimolares de los fragmentos, en total se agregan 10ng/ml de solución más el marcador de peso molecular (fago labda digerido con HindIII también marcado).

Dado el carácter "homeólogo" de la sonda fue necesario realizar un "dot blott" previo para comprobar si la sonda a utilizar hibridaba con las especies en estudio. Se sembraron en una membrana alícuotas de ADN de las distintas especies y se realizaron

los pasos de desnaturalización y neutralización colocando la membrana sobre papel de filtro embebido en estas soluciones y luego se procedió a la pre hibridación e hibridación.

Como esta experiencia dio resultados positivos para todas las especies en estudio, la membrana que contiene el ADN digerido se pre-hibridiza, esto consiste en ponerla en contacto con la solución de hibridación más el agente bloqueante (20 cm³ por cada 100 cm² de membrana) durante por lo menos una hora. El objetivo es bloquear cualquier posible unión inespecífica de la sonda que crearía "ruido de fondo" o "background".

Luego se desnaturaliza la mezcla de sondas calentando a 100°C y enfriando de inmediato. Se agrega a la solución de hibridación y se procede a dejar hibridando más de 16 horas (por lo menos 3,5 ml. para una membrana de 10x10 cm²) en un baño térmico con agitación. La temperatura y concentración de las soluciones de hibridación y de los lavados de post-hibridación se fijó probando diferentes condiciones, y eligiendo la que da la relación óptima de intensidad entre las bandas y el background.

hibridaciones

- 45°C y sol. de hibrid. standard

lavados

- dos lavados de 5 min. en sol de lavado 2x
- un lavado de 15 min. en sol de lavado 1x
- un lavado de 15 min. en sol de lavado 0.5x

Se obtuvieron resultados analizables con las condiciones de hibridación ensayadas para disminuir la rigurosidad tanto de la hibridación como de los lavados. Esto permite una mayor detección de bandas a pesar de la condición heteróloga de la sonda utilizada.

b.3.vi - Detección colorimétrica con NBT y X-phosphate:

Luego de los lavados de post-hibridación se equilibra la membrana con solución 1 (Tris .5M ph 7.5 ácido maleico 1.5M) y se bloquea con solución 2 (solución 1 más agente bloqueante) que contiene agente bloqueante durante 30 minutos (soluciones descritas por el fabricante)

Se mezcla el anticuerpo AntiDIG-fosfatasa alcalina (un anticuerpo ligado a una fosfatasa alcalina: molécula sintetizada por Boehringer) en más solución 2 y se incuba la membrana en esta solución durante 30 minutos, estos pasos se realizan a temperatura ambiente y dan mejores resultados si se los realiza con agitación.

Se lava la membrana dos veces en solución 1 para remover el anticuerpo que no se unió.

Se lava la membrana en solución 3 para activar la fosfatasa alcalina y se agrega más solución 3 con el sustrato (X-phosphate) y el colorante (NBT) y se incuba en una bolsa de plástico en la oscuridad. La formación del precipitado comienza a los pocos minutos y está completa luego de 12hrs.

b.3.vii - Interpretación de las bandas resultantes:

Se calcula el peso molecular (PM) de las diferentes bandas relacionando la distancia del punto de siembra con el logaritmo del peso molecular (PM), utilizando el marcador (λ) que presenta bandas de PM conocido. Con el marcador de PM, λ digerido con *Eco*RI y *Hind*III, se calculan los logaritmos del PM de las bandas y la regresión con las distancias, obteniendo así una ecuación lineal que se utiliza para calcular los pesos moleculares de las otras bandas.

La obtención de fragmentos de restricción permite inferir la presencia o ausencia de sitios específicos de corte con diferentes endonucleasas, constituyendo una evidencia indirecta de la secuencia.

Se identificaron las bandas obtenidas y se compararon los patrones para las diferentes especies estudiadas, tomando las bandas como caracteres. Estos caracteres pueden entonces ser utilizados para construir árboles filogenéticos (cladogramas) donde se considerará a *Scottusa lemniscata* como grupo externo (outgroup) siguiendo la metodología de la sistemática filogenética (Forey *et al.*, 1993).

b.3.viii - Algoritmos y programas utilizados para el tratamiento de los datos

a) Algoritmo de Wagner y Dollo

Los algoritmos matemáticos propuestos por el cladismo se basan en el principio de simplicidad, en el de compatibilidad de caracteres, y en el denominado "three taxon statement" (que consiste en codificar los caracteres como conjuntos de cladogramas de tres taxones por vez (Nelson y Platnik, 1993)). La simplicidad de caracteres o "parsimony" (Farris, 1970; Crisci, 1982) es una prescripción metodológica que supone que los cambios evolutivos se realizan de la manera más económica posible, desde el punto de vista de los sucesos genéticos requeridos.

Dentro de los algoritmos de simplicidad se distinguen el de Wagner (Farris, 1970) y el de Dollo (Farris, 1977). El algoritmo de Wagner admite todo tipo de reversiones de los caracteres y es el más utilizado por los sistemáticos cladistas que trabajan con datos morfológicos. El algoritmo de Dollo se basa en la ley de irreversibilidad, que prohíbe tanto la pérdida de un carácter y su posterior aparición como su ganancia convergente, el de mayor uso por parte de los biólogos moleculares que trabajan con sitios de restricción de ADN.

b) Comparación entre programas de inferencia de filogenias

El programa Hennig86 ha computarizado sólo el algoritmo de Wagner. El PHYLIP (phylogeny inference package, Joe Felsenstein 1985, 1991) incluye además los algoritmos de Camin y Sokal y de Dollo.

El programa PHYLIP es utilizado principalmente para procesar datos moleculares como ser sitios de restricción puesto que es el que mejor se adapta al modelo de evolución molecular (Templeton 1983).

Los algoritmos de simplicidad se dividen en exactos y heurísticos. Los primeros garantizan el hallazgo del cladograma más corto; los segundos no aseguran que dicho algoritmo ha sido encontrado.

El algoritmo exacto más elemental es aquel que aprovechando la enorme capacidad de cálculo y memoria de la computadora, construye todos los cladogramas posibles quedándose con el o los más cortos. La estrategia publicada más eficiente para obtener una solución más exacta cuando el número de taxa es mayor que 10 es la de "branch and bound" (Hendy & Penny 1982). La opción PENNY del PHYLIP emplea esta estrategia. El uso de esta opción está desaconsejada para más de 12 taxa (en el presente estudio sobre el género *Dichroplus* se utiliza eficientemente dado que se analizan solo 7 taxa). La opción "implicit enumeration" ("i.e.") del programa Hennig86 ofrece la ventaja de corresponder también a un algoritmo exacto y ser el más rápido, careciendo de límites para el número de taxa o caracteres.

Una ventaja del Hennig86 sobre el PHYLIP es que no produce cladogramas redundantes. El PHYLIP, sin embargo, resuelve arbitrariamente las politomías (todos los cladogramas resultantes son bifurcados) y por lo tanto las diferentes resoluciones de una politomía *aumentan* arbitrariamente el número de cladogramas.

El programa PHYLIP está en condiciones de recibir datos moleculares de secuencias de proteínas o de ácidos nucleicos y analizarlos por medio de varios algoritmos.

Aunque esta práctica no es aceptada por la mayoría de los cladistas los dos programas permiten asignar a los caracteres peso "a priori". El peso sucesivo de los caracteres es otra opción que se aplica cuando se han obtenido varios cladogramas de mínima longitud con el objeto de reducir el número de los mismos. Esta opción da peso a aquellos caracteres que producen menos homoplasias (con relación a las potenciales).

Se utilizaron en este estudio dos métodos de parsimonia para el análisis filogenético: Wagner (utilizando el Hennig86) y Dollo (programa Dollop que no requiere la determinación de un grupo externo hasta que se construye el árbol de consenso). Este último programa es especialmente eficiente para el procesamiento de sitios de restricción, pero es recomendado para el procesamiento de fragmentos de restricción con la salvedad de no determinar el estado del carácter ancestral. Este método de parsimonia fue sugerido por primera vez por Le Quense (1974) y posteriormente explicado por Farris

(1977). Esta metodología fue nombrada en memoria de Luis Dollo ya que fue el primero en asegurar que en la evolución es más difícil ganar un carácter complejo que perderlo. El algoritmo explica la presencia de un estado (1) permitiendo hasta un cambio anterior de 0 a 1 y tantas reversiones a 0 como sean necesarias para expresar el patrón. El programa intenta minimizar las reversiones de 0 a 1.

c) Parámetros estadísticos para poner a prueba la confiabilidad de los cladogramas.

La mayor parte de los programas permite obtener parámetros estadísticos tales como el índice de consistencia (Kluge & Farris, 1969) y el índice de retención (Farris, 1989).

El **índice de consistencia** es una medida del nivel de homoplasia de un cladograma. El programa lo calcula primero para cada carácter y luego calcula el *ensemble Ci* (o valor conjunto) para todo el cladograma. Sus valores varían entre 0 y 1 ya que se calcula como el cociente entre el número de pasos mínimo posible para ese carácter en ese cladograma y el número de cambios reales observados. Valores cercanos a 1 indicarán menor nivel de homoplasia, mejores datos, pero un valor de 1 indicaría ausencia total de homoplasias, una situación muy poco plausible. Este índice se ve aumentado por la presencia de caracteres no informativos como autoapomorfías (novedades evolutivas no compartidas) y

sinapomorfias de grupo (plesiomorfias, novedades evolutivas compartidas por todo el grupo bajo estudio)($C_i = 1$). Un valor de C_i de entre 0.7 y 0.8 es aceptable; un 0 mayor número de taxones disminuirá el valor del índice.

El **índice de retención** (r_i) evalúa el comportamiento del cladograma con respecto al peor comportamiento posible. Se calcula haciendo el cociente entre la homoplasia observada y la máxima homoplasia posible para ese carácter y luego es calculado para todos los caracteres involucrados. De esta forma,

$$r_i = \frac{g - s}{g - m}$$

siendo g la mayor cantidad de cambios homoplásicos posibles para ese carácter, s el número de cambios reales que sufrió en ese cladograma y m el número de cambios mínimo posible para un determinado carácter en ese cladograma. Los valores de este índice varían entre 0 y 1: un índice de retención de 0 indicaría que el carácter se comporta de la peor manera posible mostrando la mayor cantidad de homoplasias permitidas en ese cladograma.

El programa Hennig86 calcula ambos índices para cada cladograma.

d) Cladogramas de consenso

Es importante contar con la posibilidad de obtener árboles e índices de consenso, principalmente en el caso que haya varios cladogramas de mínima longitud. El Hennig calcula solo árboles de consenso estricto bajo la opción *Nelsen*. El PHYLIP construye cladogramas de consenso estricto y de mayoría (programa Consense). Básicamente el árbol de consenso consiste de grupos monofiléticos que se presenten con la mayor frecuencia posible en el conjunto de datos. Si el grupo se presenta en todos (estricto) o en más del 50% (mayoría) de los árboles será incluido en el cladograma de consenso. Así se construyen los cladogramas derivados que resumen la información de uno o varios cladogramas fundamentales, esto se realizó para ambos métodos de parsimonia.

CONCLUSION

RESULTADOS

I - Estudios poblacionales

a) Electroforesis de isoenzimas

a.1 - análisis isoenzimático de las poblaciones

La determinación de los probables loci y alelos se realizó comparando la velocidad relativa de las bandas. La interpretación de la herencia de las bandas se infiere basándonos en las distancias entre ellas, las combinaciones observadas y en el caso de EST por su especificidad por los sustratos, de acuerdo al criterio de Saidman y Naranjo (1982).

La notación de los loci se realiza numerándolos en orden decreciente de acuerdo con su movilidad anódica. Los alelos reciben la misma sigla con un índice que indica la movilidad relativa de su producto con respecto al marcador de frente, el azul de bromofenol (R.F.).

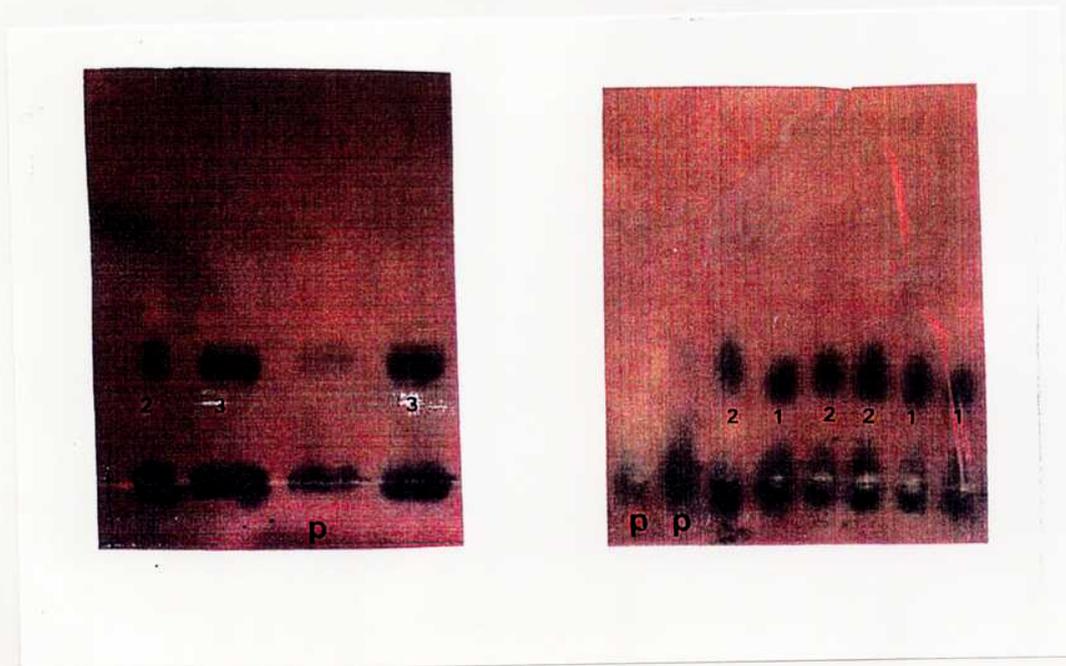
Aspartato amino transferasa (AAT)

Se observó la presencia de una banda anódica invariable muy cerca de la siembra que corresponde a un locus monomórfico Aat-2.

Se observaron también bandas variables que corresponden a un locus polimórfico para una enzima dimérica Aat-1 con alelos Aat-1²⁰, Aat-1²⁷ y Aat-1²⁹, cuando el extracto se realiza a partir de la cabeza del saltamontes. Se evidencia una diferencia de intensidad entre los dos loci al ser analizados en el extracto de pata. La diferencia es tal que el locus polimórfico (Aat-1) no puede ser analizado por ser sus bandas demasiado tenues, mientras que el locus de menor movilidad (que permanece en el cátodo - el origen - resolviendo en una única banda) Aat-2, monomórfico tiene una intensidad mayor que en los extractos de cabeza (Fig. 3).

Figura 3: Fotografía de los patrones isoenzimáticos obtenidos para el sistema **AAT**

AAT-1: 1: Aat-1^{27/27}, 2: Aat-1^{27/20}, 3: Aat-1^{20/20}.
 AAT-2: locus monomórfico, (p) indica que fue analizado en extracto de pata



Láctico deshidrogenasa (LDH)

Para este sistema se observó un único locus polimórfico. Se ven tres patrones diferentes. Los homocigotas $Ldh-1^{15/15}$ y $Ldh-1^{17/17}$ presentan una única banda mientras que el heterocigota $Ldh-1^{15/17}$ (como ya ha sido encontrado para otros Ortópteros, Chapco y Bidochka, 1986 y Confalonieri *et al* 1993) presenta una única banda pero mucho más ancha abarcando desde la posición de $Ldh-1^{15/15}$ hasta la de $Ldh-1^{17/17}$. Esto puede deberse a su estructura tetramérica según la cual se deberían observar cinco bandas en el heterocigota las que no se individualizarán debido a su proximidad (Fig.4).

Peptidasas (PEP)

Se detecto un único locus polimórfico Pep-1 en el que se identificaron tres alelos diferentes $Pep-1^{14}$, $Pep-1^{16}$ y $Pep-1^{21}$ que en estado heterocigota presentan tres bandas lo que evidencia la estructura dimérica de esta enzima (Fig.4).

Menadione reductasa (MNR)

Se detectaron tres loci, los dos que presentan bandas de menor movilidad son monomórficos para las cuatro poblaciones en las que se pudo estudiar (no se analizó Timbó para este sistema). Las bandas con mayor movilidad corresponden a un locus polimórfico con dos alelos, Mnr-1³³ y Mnr-1³⁷, donde los heterocigotas presentan tres bandas, postulándose para la enzima Menadione reductasa una estructura dimérica (Fig.4).

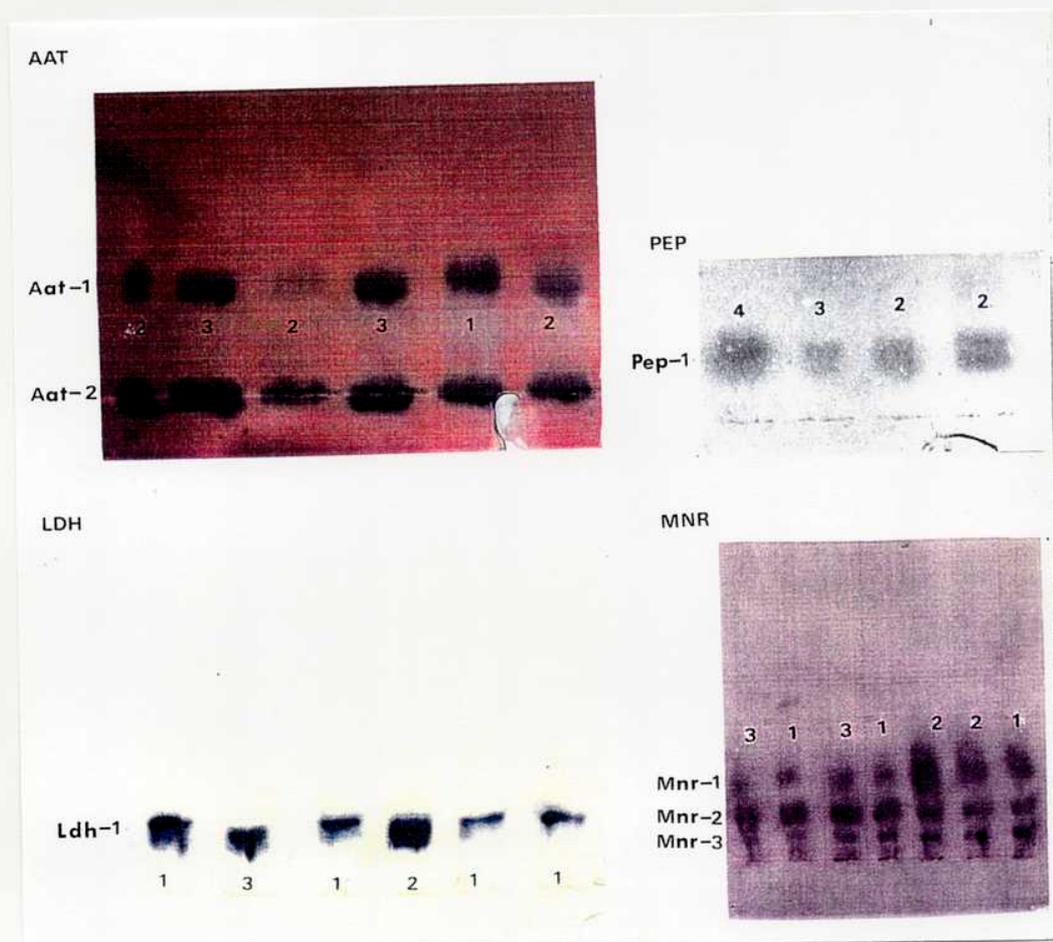
Figura 4 - Fotografías de los sistemas polimórficos analizados:

AAT - Aat-1; 1:Aat-1^{27/27}, 2:Aat-1^{27/20}, 3:Aat-1^{20/20}
 - Aat-2, locus monomórfico.

PEP - Pep-1; 2:Pep-1^{14/16}, 3:Pep-1^{16/16}, 4:Pep-1^{16/21}

LDH - Ldh-1; 1:Ldh-1^{17/17}, 2:Ldh-1^{17/15}, 3:Ldh-1^{15/15}

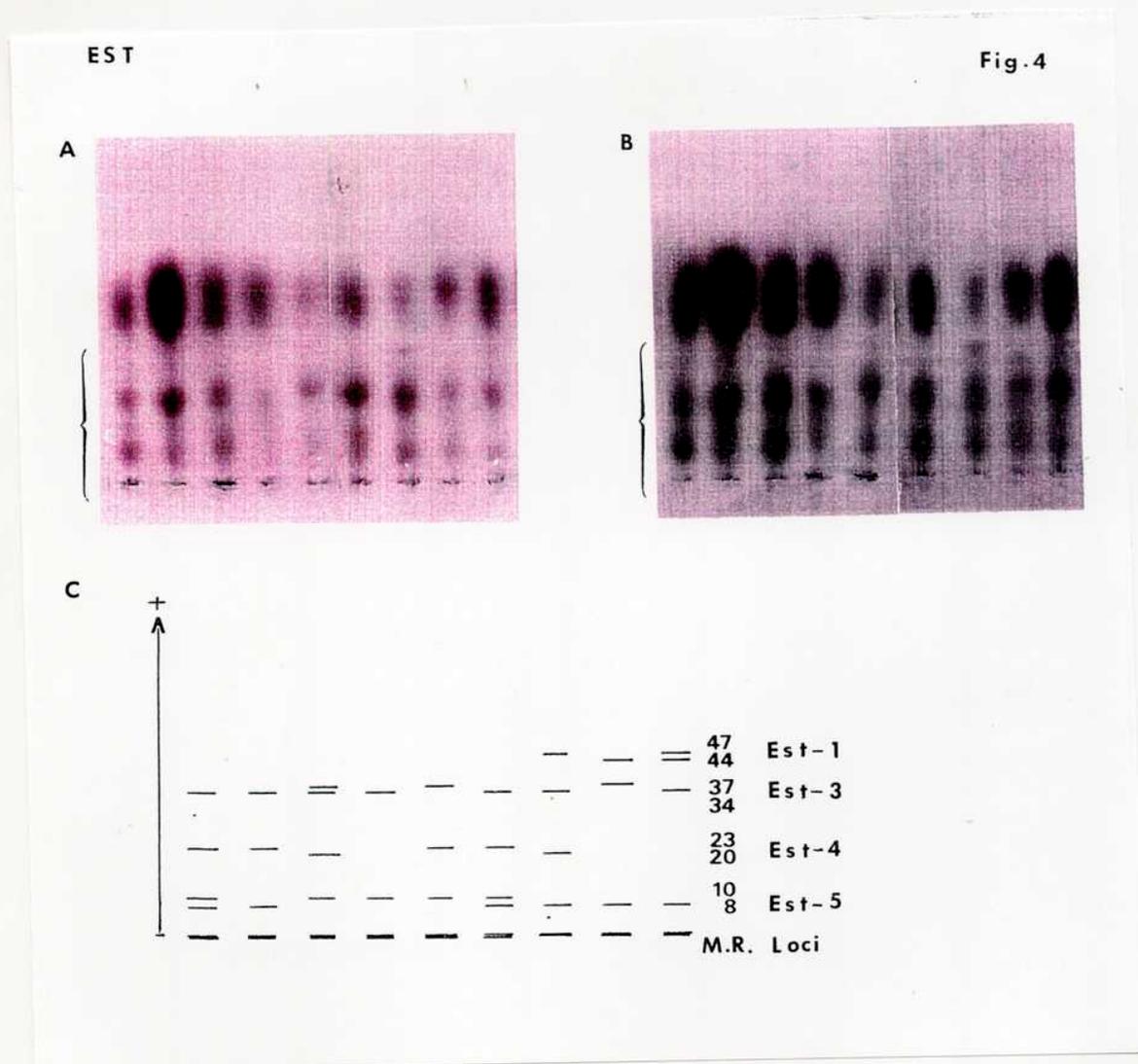
MNR - Mnr-1; 1:Mnr-1^{37/37}, 2:Mnr-1^{37/33}, 3:Mnr-1^{33/33}
 - Mnr-2; locus monomórfico
 - Mnr-3; locus monomórfico.



Esterasas (EST)

En este sistema se detectaron cinco loci, cuatro de ellos polimórficos que pudieron ser analizados en todas las poblaciones. El locus monomórfico Est-2 sólo se visualizó con claridad suficiente en la población de Timbó. Est-1 presenta tres alelos, uno de ellos nulo por lo que las frecuencias se estimaron mediante el método de Neiman-Sorensen (1956). Est-3, Est-4 y Est-5 son loci polimórficos en los que los heterocigotas presentan dos bandas sugiriendo una estructura monomérica de la enzima (Fig.5). El locus Est- 2 al ser analizado en una única población no fue incluido en los análisis estadísticos.

Figura 5 - Fotografías del sistema Esterasas con diferentes sustratos: (M.R.= movilidad relativa)
 A : revelados con α -naftil acetato.
 B : revelados con β -naftil acetato.
 C : representación esquemática de las bandas.



Malato deshidrogenasa (MDH)

Este sistema fue analizado en las cinco poblaciones y en todas se observan tres bandas invariables, postulándose entonces que los loci son monomórficos para este sistema enzimático (Fig.6).

Enzima málico (ME)

En todas las poblaciones analizadas para este sistema se detectaron dos bandas invariables, sugiriendo dos loci monomórficos (Fig.6).

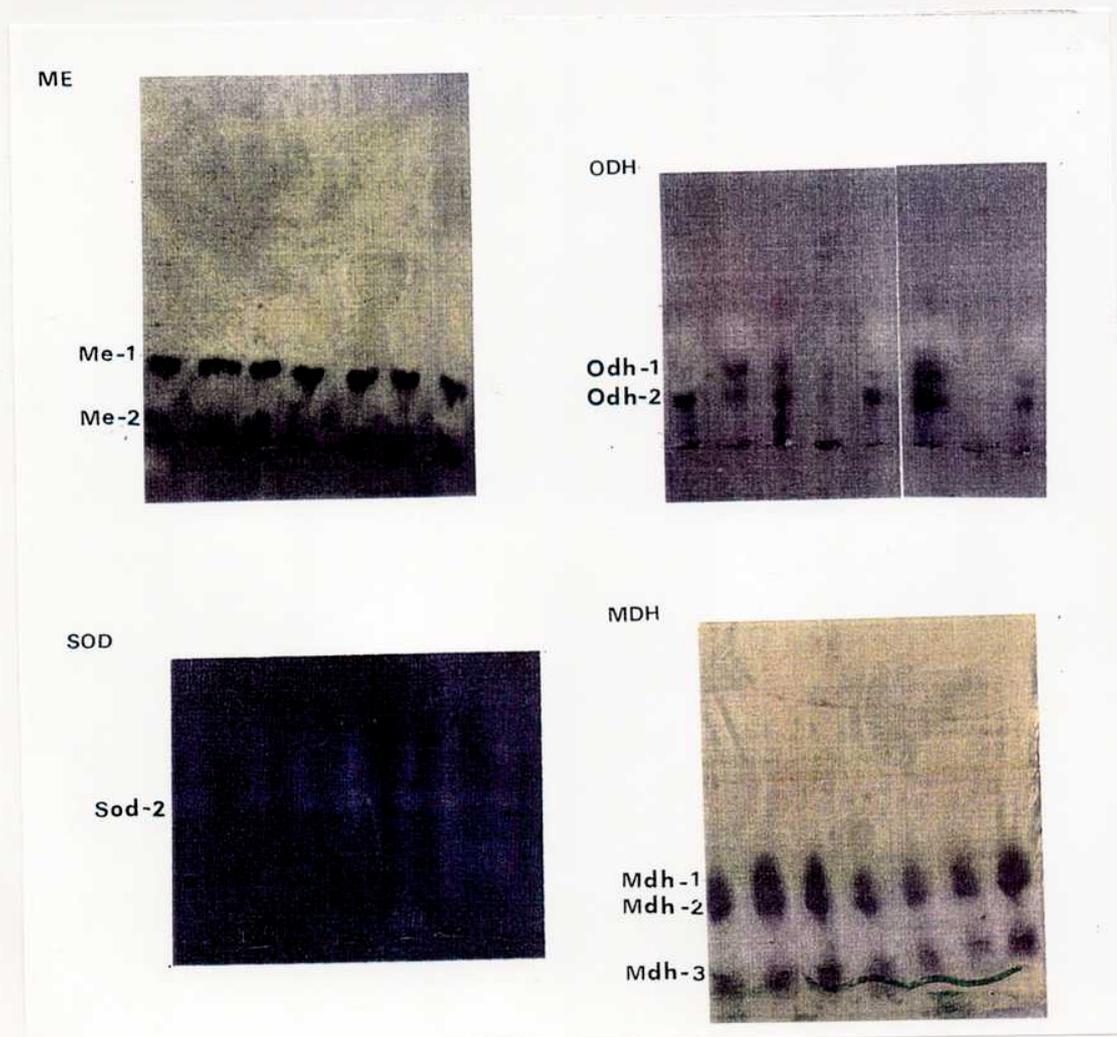
Octanol deshidrogenasa (ODH)

Esta enzima fue analizada en cuatro de las cinco poblaciones estudiadas (no en Timbó) revelando en todos los casos dos bandas invariables, postulándose entonces la existencia de dos loci monomórficos (Fig.6).

Superóxido dismutasa (SOD)

Durante la puesta a punto para este sistema se detectaron tres bandas invariables postulándose entonces tres loci monomórficos en la población de la localidad de Timbó. Al intentar repetir el análisis en las otras poblaciones sólo se pudo analizar con claridad la banda de movilidad intermedia por lo que los otros dos loci no se incluyen en los análisis estadísticos (Fig.6)

Figura 6 - Fotografías de los sistemas que revelan sólo loci monomórficos.



a.2 - análisis estadístico

Las frecuencias alélicas para cada locus (para las siete poblaciones) se describen en la tabla 4b y los loci que no evidencian variabilidad se describen en la tabla 4a donde indica el número de individuos analizado para cada locus. En la Tabla 4c se describen las frecuencias transformadas según el método de Christensen (1976) para los loci que luego mostraron correlaciones significativas aunque se realizaron todas las transformaciones.

Tabla 4a: Tabla de loci monomórficos y número de individuos analizados por loci y por población.

Locus	Alelo	RA	HM	TV	TI	IM	FA	ES
Aat-2	4	39	29	29	29	40	35	28
Mnr-2	15	39	28	28	0	40	35	28
Mnr-3	7	39	26	26	0	40	35	28
Mdh-1	23	34	28	28	28	40	30	28
Mdh-3	6	34	28	28	27	40	31	28
Me-1	15	38	27	27	28	39	33	28
Me-2	17	39	28	28	28	39	34	28
Odh-1	12	38	27	26	0	37	23	28
Odh-2	4	39	23	26	0	37	30	28
Sod-2	74	37	29	29	28	29	30	28

Tabla 4b: Tabla de frecuencias alélicas para los loci polimórficos en las siete poblaciones analizadas (los alelos fueron numerados de acuerdo a su relación de frente y n.a. indica que ese locus no fue analizado en la población indicada).

Locus	Alelo	RA	HM	TV	TI	IM	FA	ES
Aat-1	20	0,513	0,773	0,64	0,685	0,397	0,443	0,25
	27	0,487	0,267	0,34	0,315	0,564	0,528	0,48
	29	0	0	0	0	0,038	0,002	0,269
N		38	29	25	28	38	35	26
Ldh-1	15	0,41	0,417	0,467	0,228	0,487	0,583	0,574
	17	0,59	0,583	0,533	0,712	0,513	0,417	0,425
N		39	30	29	27	39	30	27
Pep-1	14	0,476	0,177	0,103	0,074	0,237	0,181	0,2
	16	0,512	0,274	0,534	0,759	0,563	0,5	0,5
	21	0,012	0,548	0,362	0,167	0,2	0,182	0,3
N		40	29	29	28	39	33	20
Est-3	34	0,571	0,593	0,5	0,68	0,643	0,521	0,307
	37	0,429	0,407	0,5	0,32	0,358	0,479	0,692
N		27	27	23	27	35	24	14
Est-4	20	0,5	0,405	0,545	0,37	0,318	0,524	0,667
	23	0,5	0,548	0,455	0,63	0,621	0,476	0,333
	28	0	0,048	0	0	0,06	0	0
N		26	21	22	23	33	21	27
Est-5	8	0,248	0,391	0,268	0,483	0,197	0,293	0,375
	nulo	0,486	0,186	0,353	0,327	0,421	0,362	0,232
	10	0,266	0,415	0,343	0,19	0,44	0,345	0,392
N		35	25	25	27	33	29	27
Mnr-1	33	0,453	0,544	0,5	n.a	0,468	0,5	0,722
	37	0,547	0,456	0,5	n.a	0,532	0,5	0,278
N		32	23	27	0	30	31	27

Tabla 4c: Tabla de frecuencias alélicas para los sistemas AAT y PEP y su transformación según el estadístico de Christensen (1976).

	alelo 20		alelo 27		alelo 29	
	frec.	Trans.	frec.	Trans.	frec.	Trans.
RA	0,513	-0,074	0,487	1,218	0	-2,499
HM	0,733	4,683	0,267	-3,713	0	-2,184
TV	0,64	2,485	0,34	-1,976	0	-2,027
TI	0,685	3,584	0,315	-2,624	0	-2,146
IM	0,397	-2,94	0,564	3,132	0,038	-0,064
FA	0,443	-1,731	0,528	2,147	0,002	-2,276
ES	0,25	-5,436	0,48	0,863	0,269	12,194

Los parámetros poblacionales de variabilidad (H) no difieren significativamente entre las poblaciones analizadas y se encuentran en la tabla 16 con el objeto de compararlos con los valores obtenidos mediante Rapds.

a.2.i - subestructuración poblacional

Al estudiar la estructura poblacional en los dos arreglos (por regiones y globalmente) mediante los valores de F_{IS} se observó que en la mayoría de los casos (42 de 49) los valores son positivos evidenciando una tendencia hacia un exceso de homocigotas

dentro de las poblaciones. Los promedios ponderados fueron todos positivos y los valores de F_{IS} son significativos o altamente significativos en seis de siete de ellos (Tabla 5), confirmando esta tendencia y como se esperaría en poblaciones subestructuradas.

Tabla 5: Tabla de valores de F_{IS} calculados para cada locus y su valor total (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Loci	RA	HM	TV	TI	FA	IM	ES	Total
Aat-1	0,135	0,405*	0,179	0,245	0,094	0,238	0,17	0,194*
Ldh-1	0,397*	0,016	0,069	0,361	0,703**	0,415*	0,78**	0,403**
Est-3	0,776**	0,105	0,748**	0,284	0,103	0,128	-0,04	0,261**
Est-4	0,268	0,306	0,161	0,182	0,259	0,078	0,35	0,264**
Est-5	-0,016	0,133	0,083	-0,033	0,033	-0,016	0,031	0,023*
Pep-1	0,587	0,257	0,107	0,352	0,031	0,088	0,058	0,201*
Mnr-1	-0,056	0,405	0,203	n.a	0,305	0,149	0,338	0,249

Sólo se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de machos y hembras para el locus *Ldh-1* en una de las poblaciones estudiadas (Escobar)(Tabla 6).

Tabla 6: Tabla de frecuencias alélicas que mostraban diferencias entre machos y hembras en dos de las poblaciones analizadas (n.a.: no analizados)

Locus	Al	Famaila		Escobar	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras
Aat 1	29	0.083	0,022	0.375	0,178
	27	0.625	0,521	0.375	0,572
	20	0.292	0,455	0,25	0,25
Ldh 1	17	0.318	0,474	0.625	0,266
	15	0.681	0,516	0.375	0,733
Mnr 1	37	0.500	0,5	0.409	0,7
	33	0,5	0,5	0.590	0,3
Est 1	47	0.500	0,692	n.a	n.a.
	43	0.500	0,307	n.a.	n.a.
Est 3	37	0.583	0,444	0.700	0,687
	33	0.416	0,555	0.300	0,313
Est 4	23	0.600	0,437	0.346	0,375
	20	0.400	0,562	0.653	0,625
Est 5	8	0.388	0,275	0.416	0,353
	10	0.222	0,425	0.333	0,411
Pep 1	n	0.388	0,3	0.250	0,206
	21	0.182	0,182	0.277	0,318
	16	0.545	0,477	0.611	0,409
	14	0.273	0,034	0.111	0,272

a.2.ii - diferenciación entre poblaciones

Se evaluó la importancia relativa de cada uno de los locus polimórficos en cuanto a la variabilidad que aportan a las poblaciones detectándose pocas diferencias entre loci.

Se realizaron dos tipos de estudios. Uno consistió en un análisis jerárquico basado en la distribución geográfica ya que las dos áreas fueron analizadas separadamente: Tucumán y Buenos Aires.

Este primer análisis reveló que la diferenciación entre poblaciones (F_{ST}), de la misma región es mayor que la diferenciación entre regiones para cinco de los siete loci polimórficos y también para el promedio entre todos los loci. Este resultado permitió la inclusión de todas las poblaciones en este estudio ya que no constituyen dos grupos de poblaciones aisladas (Tabla 7)

Un segundo análisis, considerando a todas las poblaciones como originadas de una única unidad panmíctica, reveló que los F_{ST} calculados son significativos para tres loci (Tabla 8).

Tabla 7: Tabla de valores de F_{ST} calculados por regiones (Tucumán y Buenos Aires), tomando cada región como una única población y sus valores totales (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Loci	Tucuman	Buenos Aires	Tucuman vs. B A	Total
Aat-1	0.035**	0.025*	0,052	0.068**
Ldh-1	0,015	-0.018*	0,01	0,007
Est-3	-0.009	0.045*	0,006	0,029
Est-4	-0,003	0.153**	-0,004	0.02*
Est-5	0.03*	0.029**	0.0007**	0,02
Pep-1	0.192**	-0.001*	0	0,078**
Mnr-1	0,013	0,018	0,0004	0

Tabla 8: Tabla de valores medios para los índices de fijación F_{is} (indicando diferenciación intrapoblacional) y F_{st} (indicando diferenciación entre poblaciones) para cada locus y su significación estadística (p).

Loci	F_{is}	p	F_{st}	p
Aat-1	0,194	0,004	0,068	<0.0001
Ldh-1	0,403	<0.0001	0,007	0,778
Est-3	0,261	0,0005	0,029	0,118
Est-4	0,264	0,0002	0,02	0,024
Est-5	0,023	0,185	0,02	0,187
Pep-1	0,201	0,03	0,078	<0.0001
Mnr-1	0,249	0,012	0	0,999

En la tabla 8 se indica la significación estadística de los valores totales para ambos índices.

El fenograma resultante fue construido utilizando las identidades genéticas de Nei (Fig 6, pag. 126 con el objeto de compararlo con el obtenido mediante Rapds). Este diagrama muestra que las poblaciones no se agrupan de acuerdo con las distancias geográficas que las separan. Concordantemente el test de Mantel realizado muestra que no existe correspondencia significativa entre matrices de distancias geográficas y genéticas ($r=-0.043$, $p=0.419$), o bien entre estimadores de flujo génico y distancias geográficas ($r=-0.03$; $p=0.4496$) (Tabla 9).

Tabla 9: Sobre la diagonal la diferenciación entre pares de poblaciones, entre paréntesis el número estimado de migrantes por generación: Nm); debajo de la diagonal las distancias genéticas (Nei 1972) y entre paréntesis las distancias geográficas entre las poblaciones en km.

	RA	HM	TV	IM	TI	FA	ES
RA	-	0,034 (7)	0,016 (15)	0,012 (20)	0,027 (9)	0,005 (53)	0,027 (9)
HM	0,0023 (17.5)	-	0,054 (46)	0,026 (9)	0,031 (8)	0,023 (10)	0,041 (6)
TV	0,0015 (16.6)	0,001 (8.3)	-	0,011 (21)	0,016 (15)	0,007 (33)	0,021 (11)
IM	0,0019 (1082.5)	0,01 (1067.5)	0,0004 (1070)		0,022 (11)	0,003 (72)	0,034 (7)
TI	0,0027 (25)	0,0017 (15)	0,001 (8.3)	0,0011 (1065.8)	-	0,021 (11)	0,059 (4)
FA	0,0177 (45.8)	0,0012 (30.8)	0,0001 (37.5)	0,0002 (1024)	0,0019 (39.16)	-	0,012 (19)
ES	0,0023 (1071.2)	0,0025 (1056.2)	0,0012 (1058.6)	0,0019 (5.6)	0,0045 (1054.5)	0,0008 (1013)	

Se estimó el flujo génico a partir de su relación con el índice de F_{st} (Wright 1975). Este valor sería muy elevado si se tiene en cuenta que existen barreras geográficas y ecológicas entre las poblaciones.

a.2.iii - variación clinal

Se analizaron los patrones de distribución de las frecuencias alélicas para cada locus mediante correlaciones simples (Tabla 10) y

análisis de regresión múltiple (Tabla 11) para conocer la importancia relativa de cada una de las variables ambientales.

Se encontró una correlación significativa de uno de los loci polimórficos (Aat-1²⁰) con la longitud (LONG) y la latitud (LAT). Las poblaciones situadas al sur se caracterizaban por tener frecuencias entre 0.4 y 0.2 mientras que todas las poblaciones de localidades situadas más al Norte mostraban frecuencias mayores que 0.4. Esta dependencia con variables geográficas concuerda con el hecho que Aat-1 es el único locus que muestra mayor diferenciación entre que dentro de las mismas (Tablas 7 y 8).

Como las variables utilizadas son abióticas, se intentó buscar otro tipo de variables dependientes de estas variables geográficas, que pudieran explicar mejor la causa de esta correlación. Se analizaron entonces distintas variables climáticas. Las correlaciones muestran que las frecuencias alélicas para dos loci están significativamente correlacionadas con mediciones de temperatura: Aat-1 con la temperatura mínima ($p < 0.05$) y Pep-1 con la temperatura máxima absoluta, la temperatura máxima y la temperatura mínima absoluta ($P < 0.01$)(Tabla 10).

Tabla 10: Tabla de todos los valores de correlación (*, indica la significación del índice) i= alelo en baja frecuencia, f= alelo de alta frecuencia.

Alelo	Frec.	Lat.	Long	Alt	TMax.A.	T.Max.	T.Min.A.	T.Min.	H.R.	Prec.
Aat-1-20	f	-0.804*	0.804*	0,52	0,42	0,54	0,49	0,781*	0,58	0,03
Aat-1-27	i	0,59	-0,54	-0,28	-0,53	-0,59	-0,57	-0,71	-0,28	0,26
Aat-1-29	r	0,75	-0.801*	-0,57	-0,16	-0,31	-0,2	-0,56	-0,75	-0,35
Ldh-1-15	i	0,48	-0,45	-0,38	-0,07	-0,21	-0,45	-0,6	0,02	-0,15
Ldh-1-17	f	-0,5	0,48	0,45	0,02	0,16	0,39	0,59	0,03	0,18
Pep-1-14	i	0,05	-0,05	0,53	-0.929**	-0.904**	-0.936**	-0,71	0,06	0,75
Pep-1-16	f	0,05	-0,04	-0,1	-0,66	0,05	0,43	0,32	-0,4	0,08
Pep-1-21	i	-0,02	0,01	-0,29	0,71	0,57	0,38	0,24	0,14	-0,72
Est-3-34	f	-0,4	0,45	-0,4	0,13	0,22	0,3	0,52	0,26	0,2
Est-3-37	r	0,41	-0,45	-0,27	-0,13	-0,22	-0,3	-0,52	-0,26	-0,2
Est-4-20	i	0,11	-0,15	0,01	-0,21	-0,21	-0,32	-0,39	-0,05	0,06
Est-4-23	f	-0,23	0,27	0,08	0,19	0,24	0,37	0,49	0,09	0,04
Est-4-28	r	0,37	-0,31	-0,34	0,22	0,01	0	-0,15	-0,1	-0,41
Est-5-8	i	-0,25	0,19	-0,09	0,41	0,52	0,53	0,63	-0,19	0,18
Est-5-n	i	-0,08	0,13	0,41	-0,63	-0,53	-0,37	-0,26	0,13	0,62
Est-5-10		0,59	-0,55	-0,54	0,21	-0,07	-0,22	-0,52	-0,1	-0,55
Mnr-1-33		0,51	-0,58	0,53	0,14	0,04	0,08	-0,3	-0,61	-0,45
Mnr-1-37		-0,51	0,58	0,53	-0,14	-0,03	-0,08	0,3	0,62	0,45

Los análisis de regresión múltiple realizados para variables geográficas y climáticas mostraron la misma dependencia para Aat1, ya que tanto la latitud como la temperatura mínima mostraron asociaciones significativas. En el caso de Pep-1, solo la temperatura máxima absoluta entraba en el modelo al analizar conjuntamente todas las variables climáticas (Tabla 11).

Tabla 11: Regresiones múltiples de frecuencias alélicas para Aat-1 y Pep-1 sobre las variables geográficas y climáticas. Se indican solo los coeficientes significativos estimados utilizando la descomposición de Gran-Schmidt.
R: coeficiente de determinación o proporción de la varianza explicada por la regresión que incluye sólo las variables significativas (* p= 0.05; ** p= 0.01).

Alelo	Geográficas		Climáticas		R
	b Lat	R	b T.Max.A.	T.Min.	
Aat-1-20	-0.781*	0,58	-	2.56*	0,52
Aat-1-27			-	-0.078*	0,47
Pep-1-14			-0.876**		0,78

b) Análisis de polimorfismos de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD)

Se obtuvo un total de 27 bandas cuyos tamaños oscilaron entre 300 pb y 2 kb (Fig 7).

El número de productos de amplificación generados para cada individuo varió entre 5 y 14. Todas las bandas identificadas fueron incluidas en el análisis y serán tratadas como "loci". Las frecuencias alélicas para las 28 bandas resultantes fueron calculadas a partir de los valores de proporción de ausencia (x) (Tabla 12a) y de sus varianzas muestrales (Tabla 12 b) y se encuentran en la Tabla 13a.

Figura 7: Algunos de los patrones de bandas observados al amplificar digerido con Hind III.
 A: primer A09: 1 : marcador de peso molecular Lamda digerido con Hind III. 2-4: Famaillá. 5-6: Tafí Viejo, 7-8: Horco Molle, 9-11: Raco, 12: I. Maschwitz.
 B: el primer A01, 1-2: Famaillá, 3-4: Tafí Viejo, 5: Horco Molle, 6: Raco, 7: Famaillá.

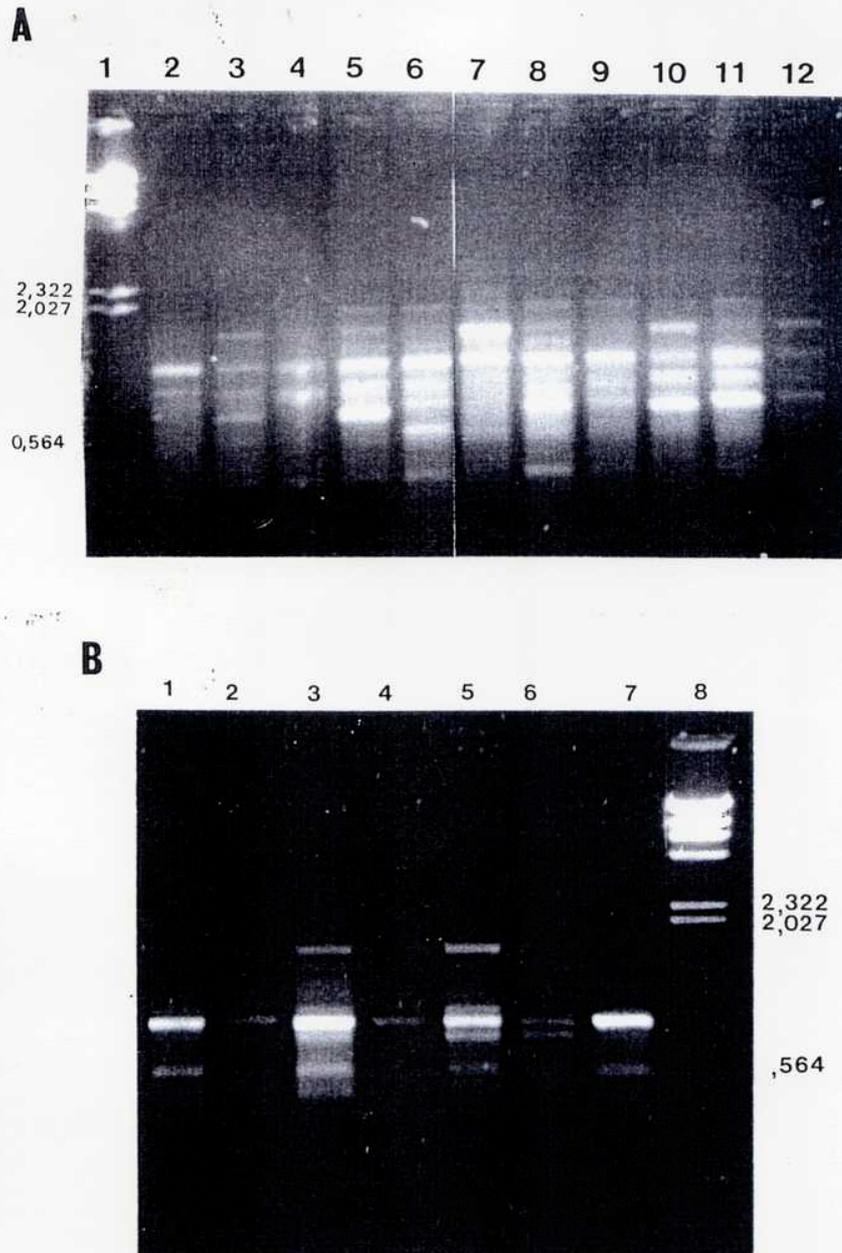


Tabla 12a: Tabla que indica la proporción de individuos de cada población que no exhiben el marcador (locus).

Locus	RACO	FAMAILLA	ESCOBAR	IMASCH.	T. VIEJO	H. MOLLE
1	0,500	0,667	0,667	1	0,500	0,667
2	0,667	1	0,500	0,333	0	0,667
3	0,667	0,833	1	0,333	0,500	0,500
4	0,667	1	0,833	0,667	0,833	0,833
5	0	0	0,500	0	0,167	0
6	0,667	1	0,667	0,667	0,833	0,667
7	0,333	0,333	0,833	0,500	0,333	0,333
8	0,333	0,500	0,667	0,500	0,167	0
9	0,667	1,167	1	0,333	0,667	0,667
10	1	1	1	1	0,833	0,333
11	0,286	0,714	1	0,333	0,333	0,667
12	0,714	0,571	1	0,000	0,333	0,667
13	1	1	0,600	0,333	0,333	0,667
14	1	1	0,600	1	0,833	1
15	0	0,143	0	0	0	0,667
16	0,857	0,714	1	1	0,500	1
17	0,286	0,429	0	0,333	0,500	0,667
18	0,857	1	0,400	1	0,500	1
19	0,714	0,429	0,800	0,667	0,667	0,333
20	0,571	1	1	1	1	1
21	1	1	1	0,833	0,667	1
22	1	1	1	1	0,667	1
23	0,857	1	1	1	0,833	1
24	0,714	0,714	1	1	0,833	1
25	1	0,571	1	1	0,667	1
26	0,857	0,429	1	1	0,667	1
27	0,571	0,286	1	1	0,667	0,333

Tabla 12b: Tabla de las varianzas muestrales de las frecuencias de homocigotas nulos.

Var x	RACO	FAMAILLA	ESCOBAR	IMASCH.	T. VIEJO	H.MOLLE
1	0,0417	0,0370	0,0370	0	0,0417	0,0370
2	0,0370	0	0,0417	0,0370	0	0,0370
3	0,0370	0,0231	0	0,0370	0,0417	0,0417
4	0,0370	0	0,0231	0,0370	0,0231	0,0231
5	0	0	0,0417	0	0,0231	0
6	0,0370	0	0,0370	0,0370	0,0231	0,0370
7	0,0370	0,0370	0,0231	0,0417	0,0370	0,0370
8	0,0370	0,0417	0,0370	0,0417	0,0231	0
9	0,0370	-0,0324	0	0,0370	0,0370	0,0370
10	0	0	0	0	0,0231	0,0741
11	0,0292	0,0292	0	0,0370	0,0370	0,0741
12	0,0292	0,0350	0	0	0,0370	0,0741
13	0	0	0,0480	0,0370	0,0370	0,0741
14	0	0	0,0480	0	0,0231	0
15	0	0,0175	0	0	0	0,0741
16	0,0175	0,0292	0	0	0,0417	0
17	0,0292	0,0350	0	0,0370	0,0417	0,0741
18	0,0175	0	0,0480	0	0,0417	0
19	0,0292	0,0350	0,0320	0,0370	0,0370	0,0741
20	0,0350	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0,0231	0,0370	0
22	0	0	0	0	0,0370	0
23	0,0175	0	0	0	0,0231	0
24	0,0292	0,0292	0	0	0,0231	0
25	0	0,0350	0	0	0,0370	0
26	0,0175	0,0350	0	0	0,0370	0
27	0,0350	0,0292	0	0	0,0370	0,0741

Tabla 13a: Tabla de estimadores de la frecuencia alélica para cada locus.(ec.2a)

Frec. q	RACO	FAMAILLA	ESCOBAR	IMASCH.	T. VIEJO	H.MOLLE
1	0,7222	0,8251	0,8251	1	0,7222	0,8251
2	0,8251	1	0,7222	0,6025	0	0,8251
3	0,8251	0,9167	1	0,6025	0,7222	0,7222
4	0,8251	1	0,9167	0,8251	0,9167	0,9167
5	0	0	0,7222	0	0,4557	0
6	0,8251	1	0,8251	0,8251	0,9167	0,8251
7	0,6025	0,6025	0,9167	0,7222	0,6025	0,6025
8	0,6025	0,7222	0,8251	0,7222	0,4557	0
9	0,8251	1,0769	1	0,6025	0,8251	0,8251
10	1	1	1	1	0,9167	0,6298
11	0,5595	0,8512	1	0,6025	0,6025	0,8339
12	0,8512	0,7662	1	0	0,6025	0,8339
13	1	1	0,7877	0,6025	0,6025	0,8339
14	1	1	0,7877	1	0,9167	1
15	0	0,4233	0	0	0	0,8339
16	0,9286	0,8512	1	1	0,7222	1
17	0,5595	0,6706	0	0,6025	0,7222	0,8339
18	0,9286	1	0,6571	1	0,7222	1
19	0,8512	0,6706	0,9001	0,8251	0,8251	0,6298
20	0,7662	1	1	1	1	1
21	1	1	1	0,9167	0,8251	1
22	1	1	1	1	0,8251	1
23	0,9286	1	1	1	0,9167	1
24	0,8512	0,8512	1	1	0,9167	1
25	1	0,7662	1	1	0,8251	1
26	0,9286	0,6706	1	1	0,8251	1
27	0,7662	0,5595	1	1	0,8251	0,6298

Tabla 13b: Tabla de la varianza muestral de las frecuencias alélicas.(Ec.2b)

Var. q	RACO	FAMAILLA	ESCOBAR	I.MASCH.	T.VIEJO	H.MOLLE
1	0,0208	0,0139	0,0139	0	0,0208	0,0139
2	0,0139	0	0,0208	0,0278	0,0417	0,0139
3	0,0139	0,0069	0	0,0278	0,0208	0,0208
4	0,0139	0	0,0069	0,0139	0,0069	0,0069
5	0,0417	0,0417	0,0208	0,0417	0,0347	0,0417
6	0,0139	0	0,0139	0,0139	0,0069	0,0139
7	0,0278	0,0278	0,0069	0,0208	0,0278	0,0278
8	0,0278	0,0208	0,0139	0,0208	0,0347	0,0417
9	0,0139	-0,0069	0	0,0278	0,0139	0,0139
10	0	0	0	0	0,0069	0,0556
11	0,0255	0,0102	0	0,0278	0,0278	0,0278
12	0,0102	0,0153	0	0,0417	0,0278	0,0278
13	0	0	0,020	0,0278	0,0278	0,0278
14	0	0	0,020	0	0,0069	0
15	0,0357	0,0306	0,050	0,0417	0,0417	0,0278
16	0,0051	0,0102	0	0	0,0208	0
17	0,0255	0,0204	0,050	0,0278	0,0208	0,0278
18	0,0051	0	0,030	0	0,0208	0
19	0,0102	0,0204	0,010	0,0139	0,0139	0,0556
20	0,0153	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0,0069	0,0139	0
22	0	0	0	0	0,0139	0
23	0,0051	0	0	0	0,0069	0
24	0,0102	0,0102	0	0	0,0069	0
25	0	0,0153	0	0	0,0139	0
26	0,0051	0,0204	0	0	0,0139	0
27	0,0153	0,0255	0	0	0,0139	0,0556

b.1 - parametros de variabilidad intra e interpoblacional

Variabilidad intrapoblacional

Revisando el objetivo de este estudio recordemos que se utilizan los patrones de bandas generados mediante RAPD (Random amplified DNA polymorphisms) para evaluar el grado de variación genética entre poblaciones isoenzimáticamente diferenciadas. Se intenta analizar la estructura genética de este mismo grupo de poblaciones a través de los mismos índices, utilizando un marcador molecular potencialmente más sensible: Polimorfismos de ADN amplificados al azar. Se tienen en cuenta los supuestos para poder aplicar los cálculos de frecuencias génicas y genotípicas y los estimadores de diversidad intra e interpoblacional propuestos por Lynch y Milligan (1994).

Los estimadores de variabilidad genética intrapoblacional $H_j(i)$ son derivados de las estimas de frecuencias alélicas según Lynch y Milligan (1994). Estos mismos estimadores fueron corregidos considerando el exceso de homocigotas ((Fis) significativo detectado mediante isoenzimas).

Los valores de diversidad intrapoblacional obtenidos al promediar por el número de loci observados (28) se ven modificados por los valores de varianza muestral debida al muestreo de un

número finito de individuos (Var_I) y la debida a la variación en diversidad genética entre loci (Var_L).

Tabla 14a: Valores de variabilidad expresados por población y por locus (H_{ij})(Ec.3a)

Hij	RACO	FAMAILLA	ESCOBAR	IMASCH.	T. VIEJO	H.MOLLE
1	0,4430	0,3164	0,3164	0	0,4430	0,3164
2	0,3164	0	0,4430	0,5346	0,0833	0,3164
3	0,3164	0,1666	0	0,5346	0,4430	0,4430
4	0,3164	0	0,1666	0,3164	0,1666	0,1666
5	0,0833	0,0833	0,4430	0,0833	0,5655	0,0833
6	0,3164	0	0,3164	0,3164	0,1666	0,3164
7	0,5346	0,5346	0,1666	0,4430	0,5346	0,5346
8	0,5346	0,4430	0,3164	0,4430	0,5655	0
9	0,3164	-0,1796	0	0,5346	0,3164	0,3164
10	0	0	0	0	0,1666	0,5774
11	0,5439	0,2737	0	0,5346	0,5346	0,3326
12	0,2737	0,3889	0	0,0833	0,5346	0,3326
13	0	0	0,3744	0,5346	0,5346	0,3326
14	0	0	0,3744	0	0,1666	0
15	0,0714	0,5495	0,1	0,0833	0,0833	0,3326
16	0,1428	0,2737	0	0	0,4430	0
17	0,5439	0,4826	0,1	0,5346	0,4430	0,3326
18	0,1428	0	0,5106	0	0,4430	0
19	0,2737	0,4826	0,1999	0,3164	0,3164	0,5774
20	0,3889	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0,1666	0,3164	0
22	0	0	0	0	0,3164	0
23	0,1428	0	0	0	0,1666	0
24	0,2737	0,2737	0	0	0,1666	0
25	0	0,3889	0	0	0,3164	0
26	0,1428	0,4826	0	0	0,3164	0
27	0,3889	0,5439	0	0	0,3164	0,5774
Hj(prom)	0,2410	0,2039	0,1418	0,2022	0,3283	0,2181

Tabla 14b: Tabla de varianzas muestrales para los valores de variabilidad promedio $H_j(i)$.(Ec.3b)

	RA	TV	HM	FA	IM	ES
Var (Hj)	0,0013	0,0019	0,0011	0,0019	0,0010	0,0017
Var I (Hj)	0,0008	0,0004	0,0009	0,0009	0,0010	0,0010
Var L (Hj)	0,0005	0,0015	0,0003	0,0010	0,0001	0,0006

Se puede observar que en este caso la variabilidad aportada por el análisis de distintos loci es muy similar a la causada por muestrear distintos individuos. De aumentar los tamaños muestrales, sería equivalente analizar más individuos o utilizar mayor número de cebadores para obtener más loci.

La diversidad intrapoblacional promedio fue estimada para el conjunto de seis poblaciones (H_w) junto con su varianza muestral $Var(H_w)$.

Tabla 15: Valores promedio de variabilidad intrapoblacional para todas las poblaciones analizadas (H_w) y su valor de varianza.(Ecs.5a,b,c,d,e.)

Hw	0,2225
Var (Hw)	0,0006
Var I (Hw)	0,0001
Var L (Hw)	0,0001
Var P (Hw)	0,0004

Los estimadores de variación genética intrapoblacional (H_j) para cada población y cada loci no varían significativamente al ser

recalculados considerando el exceso de homocigotas detectado mediante isoenzimas. Estos mismos estimadores al ser promediados sobre todos los loci son muy similares a aquellos obtenidos de datos isoenzimáticos. De hecho, las diferencias no pueden ser consideradas significativas ya que los intervalos de confianza se superponen (Tabla 16).

Tabla 16: Tabla de valores de heterocigosis intrapoblacional promedio para cada población calculado mediante valores de frecuencias alélicas obtenidos con isoenzimas y con Rapds.

	RACO	H. MOLLE	T. VIEJO	FAMAILLA	I. MASCH.	ESCOBAR
Hj (rapd)	0.241+/- 0.0013	0.218+/- 0.002	0.328+/- 0.001	0.204+/- 0.002	0.202+/- 0.002	0.142+/- 0.002
Hj (Iso)	0.206+/- 0.006	0.222+/- 0.006	0.24+/- 0.007	0.232+/- 0.006	0.224+/- 0.006	0.208+/- 0.006

Estructuración poblacional

Los indicadores de estructuración poblacional (F_{st}) fueron calculados a partir de la heterocigosis entre poblaciones (Tablas 17 a,b y c respondiendo a las ec. 6a, 6b y 7c). La diversidad entre poblaciones puede definirse como el exceso de heterocigotas que se obtendrá al cruzar individuos de poblaciones distintas comparada con la que se espera dentro de cada población (Tablas 18 a,b y c respondiendo a las ecuaciones 7a, 8b y 10c).

H'jk	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	2/3	2/4	2/5	2/6	3/4	3/5	3/6	4/5	4/6	5/6
1	0,3556	0,3556	0,2778	0,4013	0,3556	0,2886	0,1749	0,3556	0,2886	0,1749	0,3556	0,2886	0,0720	0,1749	0,3556
2	0,1749	0,3556	0,4334	0,8251	0,2886	0,2778	0,3975	1	0,1749	0,4545	0,7222	0,3556	-0,3917	0,4334	0,8251
3	0,2291	0,1749	0,4334	0,3556	0,3556	0,0833	0,4146	0,3149	0,3149	0,3975	0,2778	0,2778	0,4545	0,4545	0,4013
4	0,1749	0,2291	0,2886	0,2291	0,2291	0,0833	0,1749	0,0833	0,0833	0,2291	0,1527	0,1527	0,2291	0,2291	0,1527
5	0	0,7222	0	0,4557	0	0,7222	0	0,4557	0	0,7222	0,5197	0,7222	0,4557	0	0,4557
6	0,1749	0,2886	0,2886	0,2291	0,2886	0,1749	0,1749	0,0833	0,1749	0,2886	0,2291	0,2886	0,3802	0,2886	0,2291
7	0,4790	0,4146	0,4545	0,4790	0,4790	0,4146	0,4545	0,4790	0,4790	0,3149	0,4146	0,4146	0,4545	0,4545	0,4790
8	0,4545	0,4334	0,4545	0,5091	0,6025	0,3556	0,4013	0,5197	0,7222	0,3556	0,5288	0,8251	1,1779	0,7222	0,4557
9	0,1249	0,1749	0,4334	0,2886	0,2886	-0,0769	0,3818	0,1249	0,1249	0,3975	0,1749	0,1749	0,4334	0,4334	0,2886
10	0	0	0	0,0833	0,3702	0	0	0,0833	0,3702	0	0,0833	0,3702	0,6570	0,3702	0,3918
11	0,4582	0,4405	0,4878	0,4878	0,4603	0,1488	0,4280	0,4280	0,2655	0,3975	0,3975	0,1661	0,2002	0,4316	0,4316
12	0,3130	0,1488	0,8512	0,4280	0,2655	0,2338	0,7662	0,4455	0,3223	1	0,3975	0,1661	0,6025	0,8339	0,4316
13	0	0,2123	0,3975	0,3975	0,1661	0,2123	0,3975	0,3975	0,1661	0,4410	0,4410	0,3079	0,2002	0,4316	0,4316
14	0	0,2123	0	0,0833	0	0,2123	0	0,0833	0	0,2123	0,2602	0,2123	-0,0833	0	0,0833
15	0,4233	0	0	0	0,8339	0,4233	0,4233	0,4233	0,5512	0	0	0,8339	0	0,8339	0,8339
16	0,1989	0,0714	0,0714	0,3096	0,0714	0,1488	0,1488	0,3439	0,1488	0	0,2778	0	-0,2778	0	0,2778
17	0,4797	0,5595	0,4878	0,4736	0,4603	0,6706	0,4650	0,4242	0,3861	0,6025	0,7222	0,8339	0,3199	0,4316	0,3517
18	0,0714	0,3653	0,0714	0,3096	0,0714	0,3429	0	0,2778	0	0,3429	0,4302	0,3429	-0,2778	0	0,2778
19	0,3801	0,2190	0,2716	0,2716	0,4088	0,3635	0,3891	0,3891	0,4557	0,2399	0,2399	0,3961	0,6108	0,4156	0,4156
20	0,2338	0,2338	0,2338	0,2338	0,2338	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0,0833	0,1749	0	0	0,0833	0,1749	0	0,0833	0,1749	0	-0,0916	0,0833	0,1749
22	0	0	0	0,1749	0	0	0	0,1749	0	0	0,1749	0	-0,1749	0	0,1749
23	0,0714	0,0714	0,0714	0,1428	0,0714	0	0	0,0833	0	0	0,0833	0	-0,0833	0	0,0833
24	0,2533	0,1488	0,1488	0,2073	0,1488	0,1488	0,1488	0,2073	0,1488	0	0,0833	0	-0,0833	0	0,0833
25	0,2338	0	0	0,1749	0	0,2338	0,2338	0,3269	0,2338	0	0,1749	0	-0,1749	0	0,1749
26	0,3537	0,0714	0,0714	0,2213	0,0714	0,3294	0,3294	0,3891	0,3294	0	0,1749	0	-0,1749	0	0,1749
27	0,4683	0,2338	0,2338	0,3269	0,4309	0,4405	0,4405	0,4613	0,4845	0	0,1749	0,3702	0,5654	0,3702	0,4156
H'jkpro	0,4119	0,2947	0,2558	0,3641	0,3932	0,3646	0,3077	0,4084	0,3866	0,0875	0,2652	0,3294	0,3187	0,2725	0,3856

Tabla 17a: Valores de variabilidad entre pares de poblaciones por locus (H'jk)(Ec.6a)

VarH ^j k	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	2/3	2/4	2/5	2/6	3/4	3/5	3/6	4/5	4/6	5/6
1	0,0127	0,0127	0,0208	0,0100	0,0127	0,0125	0,0139	0,0127	0,0125	0,0139	0,0127	0,0125	0,0208	0,0139	0,0127
2	0,0139	0,0127	0,0139	0,0338	0,0125	0,0208	0,0278	0,0417	0,0139	0,0087	0,0325	0,0127	0,0342	0,0139	0,0338
3	0,0130	0,0139	0,0139	0,0127	0,0127	0,0069	0,0204	0,0164	0,0164	0,0278	0,0208	0,0208	0,0087	0,0087	0,0100
4	0,0139	0,0130	0,0125	0,0130	0,0130	0,0069	0,0139	0,0069	0,0069	0,0130	0,0098	0,0098	0,0130	0,0130	0,0098
5	0,0903	0,0325	0,0903	0,0408	0,0903	0,0325	0,0903	0,0408	0,0903	0,0325	0,0099	0,0325	0,0408	0,0903	0,0408
6	0,0139	0,0125	0,0125	0,0130	0,0125	0,0139	0,0139	0,0069	0,0139	0,0125	0,0130	0,0125	0,0130	0,0125	0,0130
7	0,0054	0,0204	0,0087	0,0054	0,0054	0,0204	0,0087	0,0054	0,0054	0,0164	0,0204	0,0204	0,0087	0,0087	0,0054
8	0,0087	0,0139	0,0087	0,0055	0,0342	0,0127	0,0100	0,0099	0,0325	0,0127	0,0167	0,0338	0,0099	0,0325	0,0408
9	0,0152	0,0139	0,0139	0,0125	0,0125	-0,0069	0,0359	0,0152	0,0152	0,0278	0,0139	0,0139	0,0139	0,0139	0,0125
10	0	0	0	0,0069	0,0556	0	0	0,0069	0,0556	0	0	0,0556	0,0069	0,0556	0,0406
11	0,0138	0,0255	0,0043	0,0043	0,0146	0,0102	0,0153	0,0153	0,0194	0,0278	0,0278	0,0278	0,0054	0,0166	0,0166
12	0,0111	0,0102	0,0325	0,0153	0,0194	0,0153	0,0297	0,0102	0,0164	0,0417	0,0278	0,0278	0,0342	0,0510	0,0166
13	0	0,0200	0,0278	0,0278	0,0278	0,0200	0,0278	0,0278	0,0278	0,0123	0,0123	0,0203	0,0054	0,0166	0,0166
14	0	0,0200	0	0,0069	0	0,0200	0	0,0069	0	0,0200	0,0167	0,0200	0,0069	0	0,0069
15	0,0358	0,0929	0,0833	0,0833	0,0477	0,0379	0,0367	0,0367	0,0177	0,1000	0,1000	0,0556	0,0903	0,0510	0,0510
16	0,0102	0,0051	0,0051	0,0167	0,0051	0,0102	0,0102	0,0131	0,0102	0	0,0208	0	0,0208	0	0,0208
17	0,0053	0,0313	0,0043	0,0075	0,0146	0,0303	0,0064	0,0082	0,0146	0,0354	0,0349	0,0556	0,0087	0,0166	0,0171
18	0,0051	0,0232	0,0051	0,0167	0,0051	0,0300	0	0,0208	0	0,0300	0,0105	0,0300	0,0208	0	0,0208
19	0,0121	0,0119	0,0117	0,0117	0,0304	0,0150	0,0114	0,0114	0,0124	0,0137	0,0137	0,0385	0,0125	0,0275	0,0275
20	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0	0	0	0	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	0,0000
21	0	0	0,0069	0,0139	0	0	0,0069	0,0139	0	0,0069	0,0139	0	0,0130	0,0069	0,0139
22	0	0	0	0,0139	0	0	0	0,0139	0	0	0,0139	0	0,0139	0	0,0139
23	0,0051	0,0051	0,0051	0,0088	0,0051	0	0	0,0069	0	0	0,0069	0	0,0069	0	0,0069
24	0,0105	0,0102	0,0102	0,0108	0,0102	0,0102	0,0102	0,0108	0,0102	0	0,0069	0	0,0069	0	0,0069
25	0,0153	0	0	0,0139	0	0,0153	0,0153	0,0113	0,0153	0	0,0139	0	0,0139	0	0,0139
26	0,0160	0,0051	0,0051	0,0126	0,0051	0,0204	0,0204	0,0114	0,0204	0	0,0139	0	0,0139	0	0,0139
27	0,0090	0,0153	0,0153	0,0113	0,0202	0,0255	0,0255	0,0124	0,0082	0	0,0139	0,0556	0,0139	0,0556	0,0275
VarH ^j kpro	0,0109	0,0140	0,0181	0,0106	0,0164	0,0190	0,0197	0,0126	0,0103	0,0069	0,0133	0,0340	0,0174	0,0347	0,0201

Tabla 17b: Valores de varianza para los valores de variabilidad entre pares de poblaciones.(Ec.6b)

Cov (Hj,Hjk)	1-1/2	1-1/3	1-1/4	1-1/5	1-1/6	2-2/1	2-2/3	2-2/4	2-2/5	2-2/6	3-3/1	3-3/2	3-3/4	3-3/5	3-3/6
0,0120	0,0120	0,0185	0,0082	0,0120	0,0080	0,0117	0,0181	0,0080	0,0117	0,0117	0,0080	0,0117	0,0181	0,0080	0,0117
0,0181	0,0080	0,0037	-0,0181	0,0117	0	0	0	0	0	0	0,0120	0,0185	0,0038	-0,0185	0,0120
0,0151	0,0181	0,0037	0,0080	0,0080	0,0075	0,0116	0,0024	0,0051	0,0051	0	0	0	0	0	0
0,0181	0,0151	0,0117	0,0151	0,0151	0	0	0	0	0	0	0,0075	0,0116	0,0075	0,0096	0,0096
0,0833	-0,0370	0,0833	0,0074	0,0833	0,0833	-0,0370	0,0833	0,0074	0,0833	0	-0,0185	-0,0185	-0,0185	-0,0016	-0,0185
0,0181	0,0117	0,0117	0,0151	0,0117	0	0	0	0	0	0	0,0117	0,0181	0,0117	0,0151	0,0117
0,0023	0,0095	0,0051	0,0023	0,0023	0,0023	0,0095	0,0051	0,0023	0,0023	0,0023	0,0024	0,0024	0,0051	0,0024	0,0024
0,0051	0,0074	0,0051	-0,0010	-0,0114	0,0038	0,0120	0,0082	-0,0016	-0,0185	-0,0185	0,0037	0,0080	0,0080	-0,0016	-0,0181
0,0208	0,0181	0,0037	0,0117	0,0117	-0,0104	-0,0160	-0,0033	-0,0104	-0,0104	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0043	0,0061	0,0012	0,0012	0,0041	0,0017	0,0143	0,0029	0,0029	0,0096	0,0096	0	0	0	0	0
0,0076	0,0143	-0,0143	0,0029	0,0096	0,0114	0,0163	-0,0163	0,0033	0,0109	0,0109	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0230	0,0230	0,0047	0,0047	0,0154
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0230	0,0230	0,0230	0,0192	0,0230
0,0110	0,0714	0,0714	0,0714	-0,0477	0,0094	0,0094	0,0094	0,0094	-0,0063	-0,0063	0,1000	0,0153	0,1000	0,1000	-0,0668
0,0061	0,0087	0,0087	0,0039	0,0087	0,0123	0,0143	0,0143	0,0064	0,0143	0,0143	0	0	0	0	0
0,0021	-0,0061	0,0012	0,0027	0,0041	0,0017	-0,0139	0,0029	0,0062	0,0093	0,0093	-0,0119	-0,0341	-0,0205	-0,0444	-0,0668
0,0087	0,0027	0,0087	0,0039	0,0087	0	0	0	0	0	0	0,0162	0,0189	0,0189	0,0084	0,0189
0,0049	0,0115	0,0093	0,0093	0,0037	0,0098	0,0111	0,0091	0,0091	0,0036	0,0036	0,0112	0,0055	0,0104	0,0104	0,0042
0,0163	0,0163	0,0163	0,0163	0,0163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0087	0,0087	0,0087	0,0073	0,0087	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0101	0,0143	0,0143	0,0119	0,0143	0,0101	0,0143	0,0143	0,0119	0,0143	0,0143	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,0163	0,0163	0,0163	0,0106	0,0163	0,0163	0	0	0	0	0
0,0030	0,0087	0,0087	0,0057	0,0087	0,0119	0,0139	0,0139	0,0091	0,0139	0,0139	0	0	0	0	0
0,0019	0,0163	0,0163	0,0106	0,0042	0,0032	0,0061	0,0061	0,0039	0,0039	0,0039	0	0	0	0	0

Cov(Hj Hjk)prom

0,0003	0,0005	0,0006	0,0003	0,0003	0,0002	0,0003	0,0004	0,0002	0,0002	0,0002	0,0001	0,0002	0,0003	0,0001	0,0002
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Tabla 17c: Valores de covarianza entre los valores de variabilidad intra e inter poblacional para cada combinación en la que se calcule para cada población.(Ec.7c)

Cov (Hj,Hjk)

4-4/1	4-4/2	4-4/3	4-4/5	4-4/6	5-5/1	5-5/2	5-5/3	5-5/4	5-5/6	6-6/1	6-6/2	6-6/3	6-6/4	6-6/5
0	0	0	0	0	0,0082	0,0120	0,0120	0,0185	0,0120	0,0080	0,0117	0,0117	0,0181	0,0080
0,0074	0,0114	0,0051	-0,0114	0,0074	-0,0542	-0,0833	-0,0370	-0,0171	-0,0542	0,0117	0,0181	0,0080	0,0037	-0,0181
0,0074	0,0095	0,0114	0,0051	0,0051	0,0120	0,0154	0,0185	0,0038	0,0082	0,0120	0,0154	0,0185	0,0038	0,0082
0,0117	0,0181	0,0151	0,0151	0,0151	0,0075	0,0116	0,0096	0,0075	0,0096	0,0075	0,0116	0,0096	0,0075	0,0096
0,0833	0,0833	-0,0370	0,0074	0,0833	0,0062	0,0062	-0,0027	0,0062	0,0062	0,0833	0,0833	-0,0370	0,0833	0,0074
0,0117	0,0181	0,0117	0,0151	0,0117	0,0075	0,0116	0,0075	0,0075	0,0075	0,0117	0,0181	0,0117	0,0117	0,0151
0,0038	0,0038	0,0154	0,0038	0,0038	0,0023	0,0023	0,0095	0,0051	0,0023	0,0023	0,0023	0,0095	0,0051	0,0023
0,0038	0,0082	0,0120	-0,0016	-0,0185	-0,0013	-0,0027	-0,0040	-0,0027	0,0062	-0,0171	-0,0370	-0,0542	-0,0370	0,0074
0,0074	0,0131	0,0114	0,0074	0,0074	0,0117	0,0208	0,0181	0,0037	0,0117	0,0117	0,0208	0,0181	0,0037	0,0117
0	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0116	0,0116	0,0116	0,0116	0,0030	0,0289	0,0289	0,0289	0,0289	0,0240
0,0014	0,0080	0,0114	0,0023	0,0076	0,0014	0,0080	0,0114	0,0023	0,0076	0,0044	0,0261	0,0371	0,0076	0,0076
-0,0585	-0,0444	-0,0833	-0,0171	-0,0556	0,0080	0,0061	0,0114	-0,0114	0,0076	0,0261	0,0197	0,0371	-0,0371	0,0076
0,0114	0,0114	0,0066	0,0023	0,0076	0,0114	0,0114	0,0066	0,0023	0,0076	0,0371	0,0371	0,0213	0,0076	0,0076
0	0	0	0	0	0,0116	0,0116	0,0067	0,0116	0,0116	0	0	0	0	0
0,0833	0,0128	0,0833	0,0833	-0,0556	0,0833	0,0128	0,0833	0,0833	-0,0556	-0,0371	-0,0057	-0,0371	-0,0371	-0,0371
0	0	0	0	0	0,0159	0,0130	0,0185	0,0185	0,0185	0	0	0	0	0
0,0014	0,0039	-0,0114	0,0051	0,0076	0,0022	0,0063	-0,0185	0,0038	0,0124	0,0044	0,0127	-0,0371	0,0076	0,0165
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0159	0,0185	0,0058	0,0185	0,0185	0	0	0	0	0
0,0127	0,0062	0,0145	0,0117	0,0047	0,0127	0,0062	0,0145	0,0117	0,0047	0,0203	0,0098	0,0231	0,0188	0,0188
0	0	0,0000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0116	0,0116	0,0116	0,0075	0,0116	0,0181	0,0181	0,0181	0,0151	0,0181	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,0181	0,0181	0,0181	0,0181	0,0181	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,0099	0,0116	0,0116	0,0116	0,0116	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,0081	0,0081	0,0116	0,0116	0,0116	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,0181	0,0096	0,0181	0,0181	0,0181	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,0155	0,0062	0,0181	0,0181	0,0181	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0,0096	0,0021	0,0181	0,0181	0,0047	0,0154	0,0034	0,0289	0,0289	0,0188

Cov(Hj Hjk)prom

0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0003	0,0006	0,0007	0,0003	0,0004	0,0003	0,0008	0,0009	0,0005
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Tabla 17ccont.

^Hjk	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	2/3	2/4	2/5	2/6	3/4	3/5	3/6	4/5	4/6	5/6
1	-0,0241	-0,0241	-0,1018	-0,0417	-0,0241	-0,0278	0,0167	-0,0241	-0,0278	0,0167	-0,0241	-0,0278	-0,1495	0,0167	-0,0241
2	0,0167	-0,0241	0,0537	0,6252	-0,0278	0,0564	0,1303	0,9583	0,0167	-0,0343	0,459	-0,0241	-0,7007	0,0079	0,6252
3	-0,0124	0,0167	0,2752	-0,0241	-0,0241	-4E-06	0,064	0,0101	0,0101	0,1303	0,0564	0,0564	-0,0343	-0,0343	-0,0417
4	0,0167	-0,0124	0,0471	-0,0124	-0,0124	-4E-06	0,0167	-4E-06	-4E-06	-0,0124	-0,0139	-0,0139	-0,0124	-0,0124	-0,0139
5	-0,0833	0,459	-0,2631	0,1313	-0,0833	0,459	-0,0833	0,1313	-0,0833	0,459	0,0154	0,459	0,1313	-0,0833	0,1313
6	0,0167	-0,0278	-0,0278	-0,0124	-0,0278	0,0167	0,0167	-4E-06	0,0167	-0,0278	-0,0124	-0,0278	0,1387	-0,0278	-0,0124
7	-0,0556	0,064	0,1039	-0,0556	-0,0556	0,064	-0,0343	-0,0556	-0,0556	0,0101	0,064	0,064	-0,0343	-0,0343	-0,0556
8	-0,0343	0,0079	0,029	-0,041	0,3352	-0,0241	-0,0417	0,0154	0,5007	-0,0241	0,0878	0,6669	0,6736	0,5007	0,173
9	0,0565	0,0167	0,2752	-0,0278	-0,0278	0,0129	0,2043	0,0565	0,0565	0,1303	0,0167	0,0167	0,0079	0,0079	-0,0278
10	0	0	0	-4E-06	0,0815	0	0	-4E-06	0,0815	0	-4E-06	0,0815	0,5737	0,0815	0,0198
11	0,0494	0,1685	0,2158	-0,0514	0,022	0,0119	0,0239	0,0239	-0,0377	0,1303	0,1303	-0,0002	-0,3344	-0,002	-0,002
12	-0,0183	0,0119	0,7144	0,0239	-0,0377	0,0394	0,5301	-0,0163	-0,0385	0,9583	0,1303	-0,0002	0,2935	0,6259	-0,002
13	0	0,0251	0,2103	0,1303	-0,0002	0,0251	0,1303	0,1303	-0,0002	-0,0135	-0,0135	-0,0456	-0,3344	-0,002	-0,002
14	0	0,0251	-0,1872	-4E-06	0	0,0251	0	-4E-06	0	0,0251	-0,0103	0,0251	-0,1666	0	-4E-06
15	0,1129	-0,0857	-0,0857	-0,0774	0,6318	0,0986	0,1069	0,1069	0,1102	-0,0917	-0,0917	0,6176	-0,0833	0,6259	0,6259
16	-0,0093	-2E-06	-2E-06	0,0167	-2E-06	0,0119	0,0119	-0,0144	0,0119	0	0,0564	0	-0,4993	0	0,0564
17	-0,0336	0,2375	0,1658	-0,0199	0,022	0,3793	-0,0435	-0,0386	-0,0215	0,2852	0,4507	0,6176	-0,1689	-0,002	-0,0361
18	-2E-06	0,0386	-0,2553	0,0167	-2E-06	0,0876	0	0,0564	0	0,0876	-0,0466	0,0876	-0,4993	0	0,0564
19	0,002	-0,0178	0,0348	-0,0234	-0,0167	0,0222	-0,0104	-0,0104	-0,0743	-0,0183	-0,0183	0,0075	0,2944	-0,0313	-0,0313
20	0,0394	0,0394	0,0394	0,0394	0,0394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0,0833	0,0167	0	0	-4E-06	0,0167	0	-4E-06	0,0167	0	-0,3331	-4E-06	0,0167
22	0	0	0	0,0167	0	0	0	0,0167	0	0	0,0167	0	-0,3331	0	0,0167
23	-2E-06	-2E-06	-2E-06	-0,0119	-2E-06	0	0	-4E-06	0	0	-4E-06	0	-0,1666	0	-4E-06
24	-0,0204	0,0119	0,0119	-0,0129	0,0119	0,0119	0,0119	-0,0129	0,0119	0	-4E-06	0	-0,1666	0	-4E-06
25	0,0394	0	0	0,0167	0	0,0394	0,0394	-0,0257	0,0394	0	0,0167	0	-0,3331	0	0,0167
26	0,041	-2E-06	-2E-06	-0,0083	-2E-06	0,0881	0,0881	-0,0104	0,0881	0	0,0167	0	-0,3331	0	0,0167
27	0,0019	0,0394	0,0394	-0,0257	-0,0523	0,1685	0,1685	0,0311	-0,0761	0	0,0167	0,0815	0,4072	0,0815	-0,0313
Hjk prom	0,0037	0,0359	0,051	0,0218	0,0279	0,058	0,0499	0,0498	0,0196	0,0745	0,0489	0,0978	-0,0801	0,0636	0,0546
Var Hjkpro	5E-05	0,0004	0,0013	0,0006	0,0008	0,0005	0,0005	0,0013	0,0004	0,0017	0,0006	0,0017	0,0041	0,0014	0,0011

Tabla 18a : Valores de variabilidad entre pares de poblaciones considerando la variabilidad existente en cada población y los valores promedio para la heterocigosis entre poblaciones de a pares y la varianza de este valor.

^VarHjk	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	2/3	2/4	2/5	2/6	3/4	3/5	3/6	4/5	4/6	5/6
1	0,0026	0,0026	0,0064	0,0017	0,0026	0,0008	0,0017	0,0026	0,0008	0,0017	0,0026	0,0008	0,0064	0,0017	0,0026
2	0,0017	0,0026	0,0098	0,1536	0,0008	0,0064	0,0176	0,1667	0,0017	0,0051	0,1338	0,0026	0,1054	0,0098	0,1536
3	0,0011	0,0017	0,0098	0,0026	0,0026	0,0002	0,0145	0,0048	0,0048	0,0176	0,0064	0,0064	0,0051	0,0051	0,0017
4	0,0017	0,0011	0,0008	0,0011	0,0011	0,0002	0,0017	0,0002	0,0002	0,0011	0,0002	0,0002	0,0011	0,0011	0,0002
5	0,0069	0,1338	0,0069	0,0692	0,0069	0,1338	0,0069	0,0692	0,0069	0,1338	0,0187	0,1338	0,0692	0,0069	0,0692
6	0,0017	0,0008	0,0008	0,0011	0,0008	0,0017	0,0017	0,0002	0,0017	0,0008	0,0011	0,0008	0,0011	0,0008	0,0011
7	0,0031	0,0145	0,0051	0,0031	0,0031	0,0145	0,0051	0,0031	0,0031	0,0048	0,0145	0,0145	0,0051	0,0051	0,0031
8	0,0051	0,0098	0,0051	0,0092	0,1054	0,0026	0,0017	0,0187	0,1338	0,0026	0,0285	0,1536	0,0187	0,1338	0,0692
9	0,0014	0,0017	0,0098	0,0008	0,0008	-0,0002	0,018	0,0014	0,0014	0,0176	0,0017	0,0017	0,0098	0,0098	0,0008
10	0	0	0	0,0002	0,0304	0	0	0,0002	0,0304	0	0,0002	0,0304	0,0002	0,0304	0,0221
11	0,0132	0,0198	0,0032	0,0032	0,0189	0,0009	0,0105	0,0105	0,0012	0,0176	0,0176	0,0031	0,0031	0,015	0,015
12	0,0014	0,0009	0,152	0,0105	0,0012	0,0033	0,1363	0,0063	0,0025	0,1667	0,0176	0,0031	0,1054	0,1978	0,015
13	0	0,0036	0,0176	0,0176	0,0031	0,0036	0,0176	0,0176	0,0031	0,0088	0,0088	0,0026	0,0031	0,015	0,015
14	0	0,0036	0	0,0002	0	0,0036	0	0,0002	0	0,0036	0,0023	0,0036	0,0002	0	0,0002
15	0,0519	0,0071	0,006	0,006	0,1806	0,0639	0,0569	0,0569	0,0428	0,0083	0,0083	0,2219	0,0069	0,1978	0,1978
16	0,0006	0,0001	0,0001	0,0048	0,0001	0,0009	0,0009	0,0029	0,0009	0	0,0064	0	0,0064	0	0,0064
17	0,0044	0,0997	0,0032	0,007	0,0189	0,1307	0,0032	0,0021	0,0074	0,1185	0,1519	0,2219	0,0051	0,015	0,0047
18	0,0001	0,011	0,0001	0,0048	0,0001	0,0141	0	0,0064	0	0,0141	0,0034	0,0141	0,0064	0	0,0064
19	0,0048	0,0006	0,0006	0,0006	0,0152	0,0072	0,0044	0,0044	0,005	0,0011	0,0011	0,0214	0,0008	0,0137	0,0137
20	0,0033	0,0033	0,0033	0,0033	0,0033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0,0002	0,0017	0	0	0,0002	0,0017	0	0,0002	0,0017	0	0,0011	0,0002	0,0017
22	0	0	0	0,0017	0	0	0	0,0017	0	0	0,0017	0	0,0017	0	0,0017
23	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0	0	0,0002	0	0	0,0002	0	0,0002	0	0,0002
24	0,0004	0,0009	0,0009	0,0006	0,0009	0,0009	0,0009	0,0006	0,0009	0	0,0002	0	0,0002	0	0,0002
25	0,0033	0	0	0,0017	0	0,0033	0,0033	0,0013	0,0033	0	0,0017	0	0,0017	0	0,0017
26	0,0072	0,0001	0,0001	0,0011	0,0001	0,0089	0,0089	0,0044	0,0089	0	0,0017	0	0,0017	0	0,0017
27	0,0085	0,0033	0,0033	0,0013	0,0087	0,0198	0,0198	0,0125	0,0073	0	0,0017	0,0304	0,0017	0,0304	0,0137

Tabla 18b: Valores de varianza para la variabilidad entre pares de poblaciones promediada sobre todos los loci.

Al comparar medidas de subdivisión poblacional, el valor total de F_{st} calculado mediante RAPD indicaría moderada diferenciación de acuerdo a Hartl (1980) ($F_{st} = 0.145$) con un factor de corrección descrito en la ecuación 10a.

Tabla 19: Valor del índice de fijación promedio para las seis poblaciones estudiadas con y sin el factor de corrección correspondiente

Fst	0,1475
Fst s/corr	0,1474
corr	1,4968

b.2 - relaciones fenéticas entre las poblaciones

Los valores de distancias entre poblaciones (Djk Tabla 21) se utilizaron para construir fenogramas utilizando el método de UPGMA (Sneath and Sokal 1973). Todos los cálculos se realizaron según (Lynch & Milligan 1994). El análisis de agrupamiento realizado con las distancias genéticas de Nei calculadas a partir de loci RAPD demostró una concordancia general con las distancias geográficas entre las poblaciones estudiadas (Tabla 22, Fig 8).

Tabla 20: Valores de identidad genética dentro de cada población para cada locus.

Jj= (1-Hj)	RACO	FAMAILLA	ESCOBAR	I. MASCH.	T. VIEJO	H. MOLLE
1	0,5570	0,6836	0,6836	1	0,5570	0,6836
2	0,6836	1	0,5570	0,4654	0,9167	0,6836
3	0,6836	0,8334	1	0,4654	0,5570	0,5570
4	0,6836	1	0,8334	0,6836	0,8334	0,8334
5	0,9167	0,9167	0,5570	0,9167	0,4345	0,9167
6	0,6836	1	0,6836	0,6836	0,8334	0,6836
7	0,4654	0,4654	0,8334	0,5570	0,4654	0,4654
8	0,4654	0,5570	0,6836	0,5570	0,4345	1
9	0,6836	1,1796	1	0,4654	0,6836	0,6836
10	1	1	1	1,0000	0,8334	0,4226
11	0,4561	0,7263	1	0,4654	0,4654	0,6674
12	0,7263	0,6111	1	0,9167	0,4654	0,6674
13	1	1	0,6256	0,4654	0,4654	0,6674
14	1	1	0,6256	1	0,8334	1
15	0,9286	0,4505	0,9000	0,9167	0,9167	0,6674
16	0,8572	0,7263	1	1	0,5570	1,0000
17	0,4561	0,5174	0,9000	0,4654	0,5570	0,6674
18	0,8572	1	0,4894	1	0,5570	1
19	0,7263	0,5174	0,8001	0,6836	0,6836	0,4226
20	0,6111	1	1	1	1	1
21	1	1	1	0,8334	0,6836	1
22	1	1	1	1	0,6836	1
23	0,8572	1	1	1	0,8334	1
24	0,7263	0,7263	1	1	0,8334	1
25	1	0,6111	1	1	0,6836	1
26	0,8572	0,5174	1	1	0,6836	1
27	0,6111	0,4561	1	1	0,6836	0,4226
Jj prom	0,5841	0,5698	0,8418	1	0,6203	0,5531

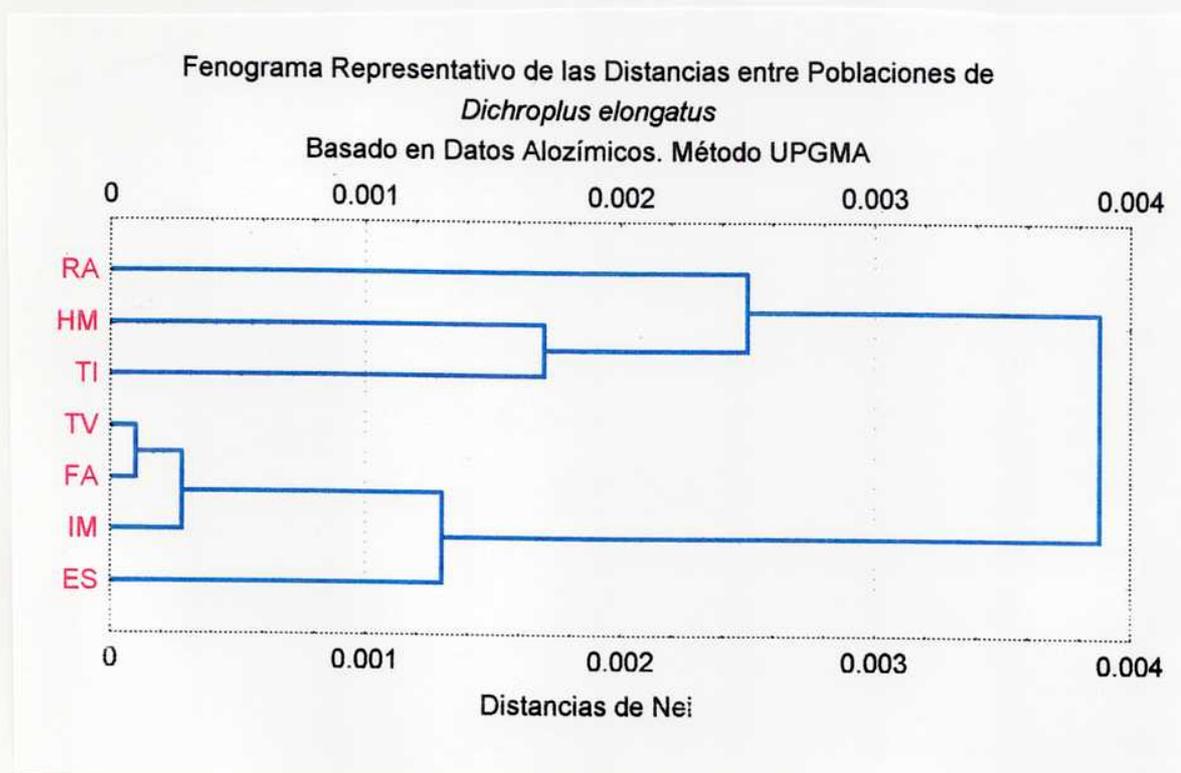
	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	2/3	2/4	2/5	2/6	3/4	3/5	3/6	4/5	4/6	5/6
1	0,6444	0,6444	0,7222	0,5987	0,6444	0,7114	0,8251	0,6444	0,7114	0,8251	0,6444	0,7114	0,928	0,8251	0,6444
2	0,8251	0,6444	0,5666	0,1749	0,7114	0,7222	0,6025	0	0,8251	0,5455	0,2778	0,6444	1,3917	0,5666	0,1749
3	0,7709	0,8251	0,5666	0,6444	0,6444	0,9167	0,5854	0,6851	0,6851	0,6025	0,7222	0,7222	0,5455	0,5455	0,5987
4	0,8251	0,7709	0,7114	0,7709	0,7709	0,9167	0,8251	0,9167	0,9167	0,7709	0,8473	0,8473	0,7709	0,7709	0,8473
5	1	0,2778	1	0,5443	1	0,2778	1	0,5443	1	0,2778	0,4803	0,2778	0,5443	1	0,5443
6	0,8251	0,7114	0,7114	0,7709	0,7114	0,8251	0,8251	0,9167	0,8251	0,7114	0,7709	0,7114	0,6198	0,7114	0,7709
7	0,521	0,5854	0,5455	0,521	0,521	0,5854	0,5455	0,521	0,521	0,6851	0,5854	0,5854	0,5455	0,5455	0,521
8	0,5455	0,5666	0,5455	0,4909	0,3975	0,6444	0,5987	0,4803	0,2778	0,6444	0,4712	0,1749	-0,1779	0,2778	0,5443
9	0,8751	0,8251	0,5666	0,7114	0,7114	1,0769	0,6182	0,8751	0,8751	0,6025	0,8251	0,8251	0,5666	0,5666	0,7114
10	1	1	1	0,9167	0,6298	1	1	0,9167	0,6298	1	0,9167	0,6298	0,343	0,6298	0,6082
11	0,5418	0,5595	0,5122	0,5122	0,5397	0,8512	0,572	0,572	0,7345	0,6025	0,6025	0,8339	0,7998	0,5684	0,5684
12	0,687	0,8512	0,1488	0,572	0,7345	0,7662	0,2338	0,5545	0,6777	0	0,6025	0,8339	0,3975	0,1661	0,5684
13	1	0,7877	0,6025	0,6025	0,8339	0,7877	0,6025	0,6025	0,8339	0,559	0,559	0,6921	0,7998	0,5684	0,5684
14	1	0,7877	1	0,9167	1	0,7877	1	0,9167	1	0,7877	0,7398	0,7877	1,0833	1	0,9167
15	0,5767	1	1	1	0,1661	0,5767	0,5767	0,5767	0,4488	1	1	0,1661	1	0,1661	0,1661
16	0,8011	0,9286	0,9286	0,6904	0,9286	0,8512	0,8512	0,6561	0,8512	1	0,7222	1	1,2778	1	0,7222
17	0,5203	0,4405	0,5122	0,5264	0,5397	0,3294	0,535	0,5758	0,6139	0,3975	0,2778	0,1661	0,6801	0,5684	0,6483
18	0,9286	0,6347	0,9286	0,6904	0,9286	0,6571	1	0,7222	1	0,6571	0,5698	0,6571	1,2778	1	0,7222
19	0,6199	0,781	0,7284	0,7284	0,5912	0,6365	0,6109	0,6109	0,5443	0,7601	0,7601	0,6039	0,3892	0,5844	0,5844
20	0,7662	0,7662	0,7662	0,7662	0,7662	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	0,9167	0,8251	1	1	0,9167	0,8251	1	0,9167	0,8251	1	1,0916	0,9167	0,8251
22	1	1	1	0,8251	1	1	1	0,8251	1	1	0,8251	1	1,1749	1	0,8251
23	0,9286	0,9286	0,9286	0,8572	0,9286	1	1	0,9167	1	1	0,9167	1	1,0833	1	0,9167
24	0,7467	0,8512	0,8512	0,7927	0,8512	0,8512	0,8512	0,7927	0,8512	1	0,9167	1	1,0833	1	0,9167
25	0,7662	1	1	0,8251	1	0,7662	0,7662	0,6731	0,7662	1	0,8251	1	1,1749	1	0,8251
26	0,6463	0,9286	0,9286	0,7787	0,9286	0,6706	0,6706	0,6109	0,6706	1	0,8251	1	1,1749	1	0,8251
27	0,5317	0,7662	0,7662	0,6731	0,5691	0,5595	0,5595	0,5387	0,5155	1	0,8251	0,6298	0,4346	0,6298	0,5844
Jjk prom	0,5881	0,7053	0,7442	0,6359	0,6068	0,6354	0,6923	0,5916	0,6134	0,9125	0,7348	0,6706	0,6813	0,7275	0,6144
Djk	0,1223	0,3291	0,4465	0,1287	0,06	0,4085	0,4944	0,1762	0,4158	0,6102	0,3483	0,321	0,5959	0,4105	0,1069
Var Djk^	0,0312	0,0277	0,0327	0,0259	0,0441	0,0469	0,0412	0,0356	0,0272	0,0087	0,0241	0,0749	0,038	0,0654	0,0529

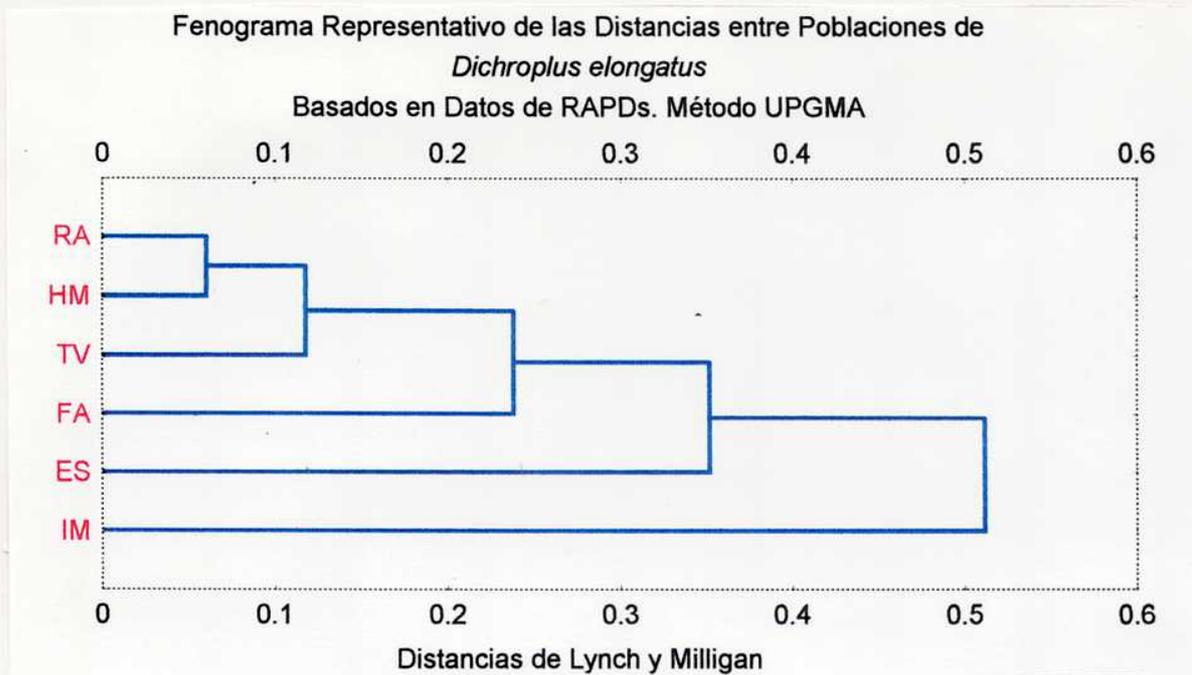
Tabla 21 : Valores de identidad entre poblaciones para cada locus y valores de distancia promedio entre poblaciones (Ec.11a)

Tabla 22: Tabla de valores de heterocigosis interpoblacional promedio para cada par de poblaciones (debajo de la diagonal) y valores de distancia genética entre poblaciones (sobre la diagonal).

	RACO	FAMAILLA	ESCOBAR	I. MASCH.	T. VIEJO	H. MOLLE
RACO	-	0,1223	0,3291	0,4465	0,1287	0,0600
FAMAILLA	0,004	-	0,4085	0,4944	0,1762	0,4158
ESCOBAR	0,036	0,058	-	0,6102	0,3483	0,3210
I. MASCH.	0,051	0,050	0,074	-	0,5959	0,4105
T. VIEJO	0,022	0,050	0,049	-0,080	-	0,1069
H. MOLLE	0,028	0,020	0,098	0,064	0,0546	-

Figura 8: Fenogramas realizados utilizando a) las identidades genéticas de Nei (1977) estimadas mediante los métodos descritos por Nei (1987), con el programa GENIND (Vilardi 1993), incluyendo todas las poblaciones. b) los datos de similitud interpoblacional obtenidos con marcadores RAPD mediante el método UPGMA.





c) Comparación de resultados obtenidos mediante isoenzimas y RAPD

El hallazgo de concordancia entre las distancias genéticas y geográficas no es consistente con los resultados obtenidos mediante estudios alozímicos (donde no se correspondían ambas distancias).

Las matrices de distancias obtenidas a partir de datos isoenzimáticos y de fragmentos amplificados al azar no se corresponden, como se esperaría de dos marcadores neutros. Concordantemente el valor de correlación entre matrices de distancias obtenidas mediante isoenzimas y Rapds realizado mediante el Test de Mantel ($r = 0.029$; $p = 0.459$) muestra que las matrices no se correlacionan significativamente. En el fenograma resultante de los valores de distancia entre poblaciones (D_{jk}) (Fig. 8) se observa que las poblaciones Tucumanas se agrupan de acuerdo con sus distancias geográficas. Las poblaciones de Buenos Aires, sin embargo se diferencian marcadamente entre sí.

II - Estudios entre especies

a) Identificación de los caracteres

Se obtuvo un total de 58 fragmentos de restricción (bandas) en las siete especies analizadas. Estas bandas son el producto de la digestión con nueve enzimas de restricción: *Hae* III, *Hind* III, *Pst* I, *Eco* RI, *Bam* HI, *Xba* I, *Sca* I, *Hha* I y *Alu* I (Figuras 8, 9, 10, 11 y 12).

No se encontró variación intraespecífica para los patrones de restricción de las enzimas analizadas. Dos de las especies en estudio (*S. lemniscata* y *D. elongatus*) presentaron dificultades en la digestión con la enzima *Hae* III, la cual determina doce caracteres (bandas). Las bandas son identificadas por la enzima que generó el fragmento seguida por un número que indica su peso molecular decreciente. A partir de estos datos se construye una matriz de caracteres (Tabla 25) indicando presencia o ausencia para cada una de las bandas en cada una de las especies en estudio.

Especie	HaeIII		HindIII		EcoRI		HhaI		PstI		BamHI		AluI		XbaI		ScaI	
	frag.	Kb	frag.	Kb	frag.	Kb	frag.	Kb	frag.	Kb	frag.	Kb	frag.	Kb	frag.	Kb	frag.	Kb
<i>D. ebrgatus</i>	0	0	0	0	2	3.66 2.75	2	8.92 8.17	2	8.24 7.35	2	9.5 6.19	0	0	3	4.24 3.21 1.26	0	
<i>B. punctulatus</i>	3	3.82 3.07 1.03	2	11.1 5.5	3	4.42 3.66 2.75	2	8.92 8.17	2	8.24 7.35	2	9.5 6.19	6	6.32 4.2 3.21 820 580 125	0	0	4	9.58 5.11 2.53 123
<i>D. bergii</i>	2	4.75 2.91	2	11.1 5.5	3	8.18 6.46 1.63	2	8.92 8.17	2	8.24 7.35	2	9.5 6.19	3	6.32 4.2 3.21	2	3.21 1.26	2	2.55 870
<i>D. vitattus</i>	1	2.61	2	10.3 6.35	0	0	1	8.17	2	8.24 7.35	2	9.5 6.19	2	3.21 580	3	8.36 3.21 1.26	4	9.58 5.11 2.53 1.23
<i>D. pretensis</i>	7	15.8 11.3 6.94 5.02 3.42 2.09 1.43	1	9.34	3	4.42 3.83 2.75	2	8.92 8.17	2	8.24 7.35	2	9.5 6.19	5	5.42 4.1 1.03 820 125	3	4.24 3.21 1.26	2	9.58 5.11
<i>D. patruelis</i>	3	6.94 4.14 2.09	0	0	3	3.66 2.75 2.39	0	0	2	8.24 7.35	2	9.5 6.19	4	5.42 1032 820 125	3	4.24 3.21 1.26	5	9.88 9.58 5.11 2.53 1.23
<i>S. lemmiscatta</i>	0	0	3	8.9 3.24 2.54	2	4.63 2.75	2	8.92 8.17	2	7.12 6.93	2	7.66 5.38	2	3213 580	2	11.7 8.36	4	9.58 5.11 2.55 870

Tabla 23: Identificación de las bandas obtenidas luego de la digestión con nueve enzimas diferentes. Se indica el número de bandas por especie y su peso molecular en kb (Kilobases).

OTU	Hae III											Hind III											Eco RI																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
<i>D. elongatus</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
<i>B. punctulatus</i>	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>D. bergii</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>D. vitattus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>D. pratensis</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>D. patruelis</i>	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>S. lemnicata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

OTU	Hha I							Pst I							Bam HI							Alu I							Xba I							Sca I												
	1	2	1	1	0	0	1	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
<i>D. elongatus</i>	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>B. punctulatus</i>	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. bergii</i>	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. vitattus</i>	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. pratensis</i>	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. patruelis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. lemnicata</i>	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 25: Matriz de caracteres (bandas) ordenadas por enzima según peso molecular decreciente. 0 = ausencia, 1 = presencia.

Figura 9: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con HindIII junto con el marcador de PM, lambda digerido con la misma enzima, utilizando como sonda el ADNmt de *Caledia captiva* y la interpretación del patrón de bandas obtenido.

Referencias: 1: plásmido pCc11 (contiene fragmento de 3kb)

2 y 3 : *Scotussa lemniscata*; 4 y 5 : *D. patruelis*; 6 y 7 : *D. pratensis*; 8 y 9 : *D. vitattus*; 10 y 11: *D. bergii*; 12: *D. punctulatus* y 13: *D. elongatus*.

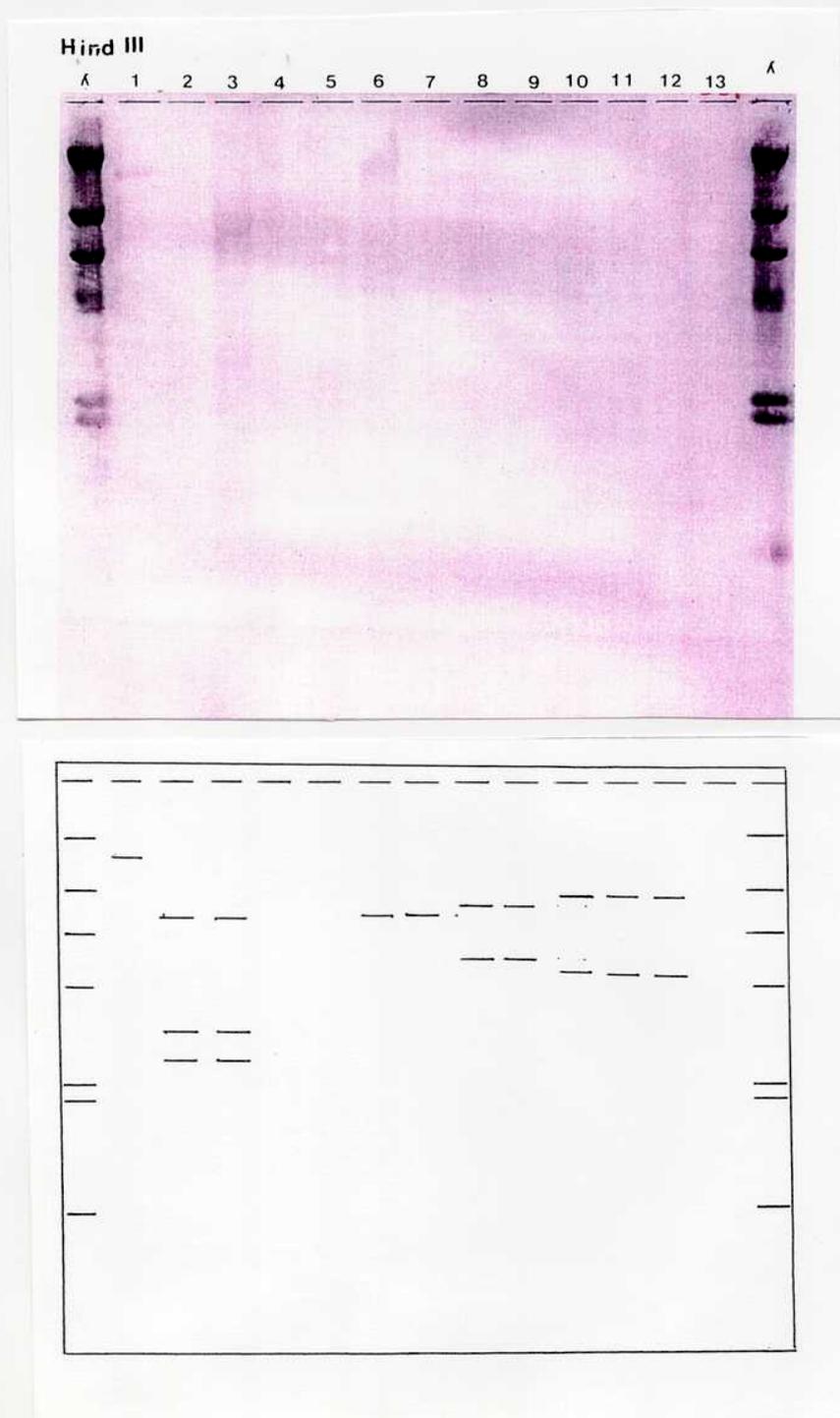


Figura 10: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con HaeIII junto con el marcador de PM, lambda digerido con HindIII, utilizando como sonda el ADNmt de *Caledia captiva* y la interpretación del patrón de bandas obtenido.

Referencias: 1 6 : pruebas con otras especies; 7: *Scotusalemniscata*,
8: *D. patruelis*; 9: *D. pratensis*; 10: *D. vitattus*; 11: *D. bergii*;
12: *D. punctulatus*; 13: *D. elongatus*.

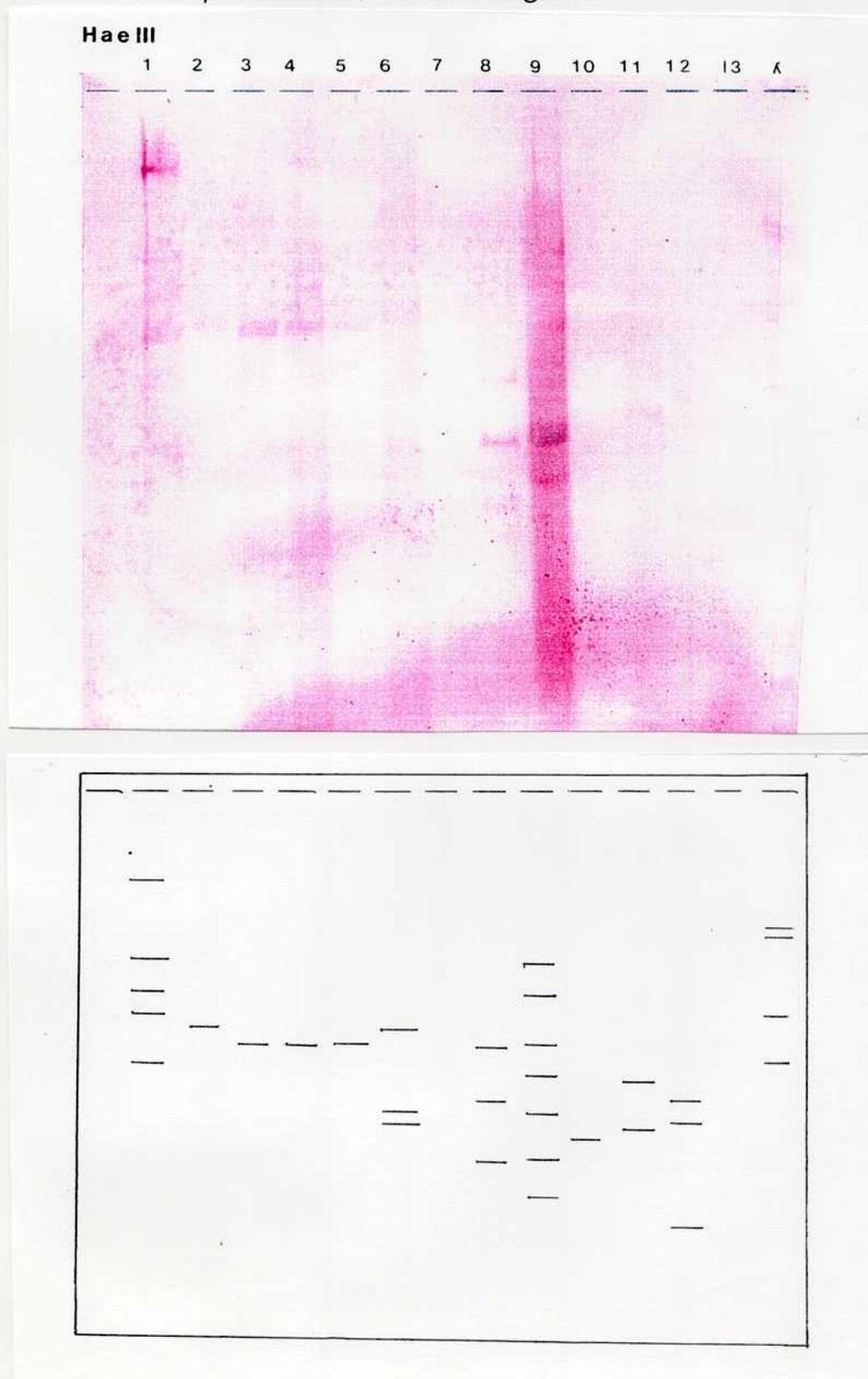


Figura 11: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con Sca I junto con el marcador de PM, lambda digerido con HindIII, utilizando como sonda el ADNmt de *Caledia captiva* y la interpretación del patrón de bandas obtenido.

Referencias: SL: *Scotussa lemniscata*; pa: *Dichroplus patruelis*; , pr: *D. pratensis*; vi: *D. vitattus*; be: *D. bergii*; pu: *Baeacris punctulatus*; .

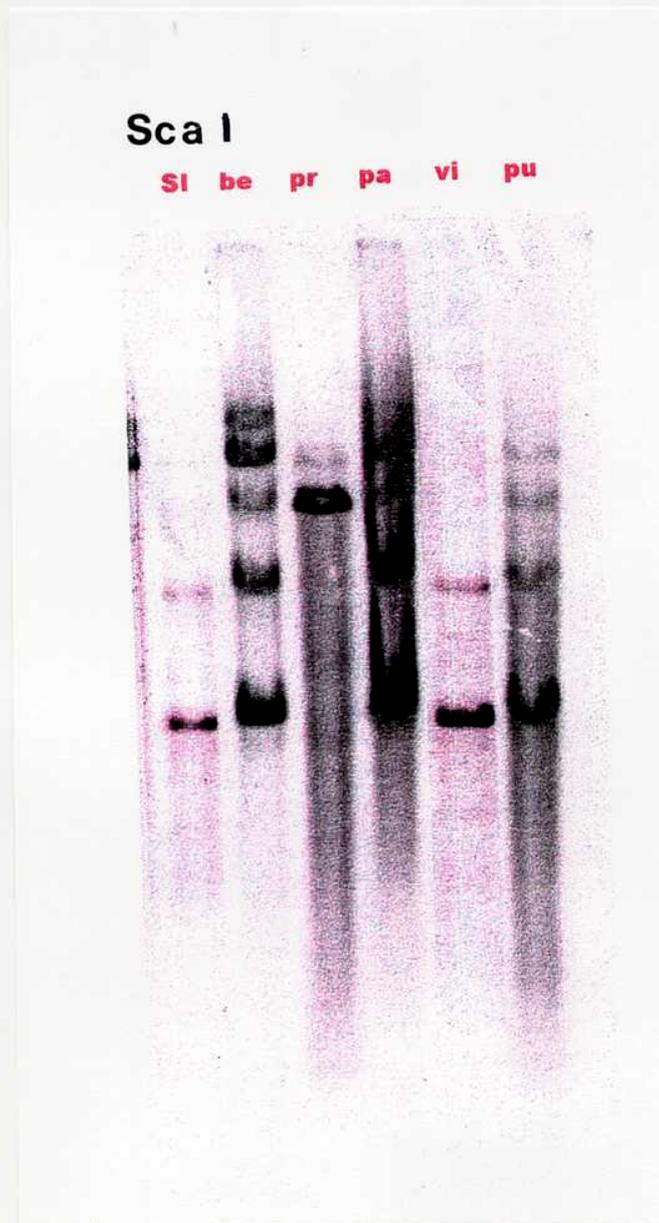


Figura 12: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con Alu I junto con el marcador de PM, lambda digerido con HindIII, utilizando como sonda el ADNmt de *Caledia captiva* y la interpretación del patrón de bandas obtenido.

Referencias: SL: *Scotussa lemniscata*; pa: *Dichroplus patruelis*; , pr: *D. pratensis*; vi: *D. vittatus*; be: *D. bergii*; pu: *Baeacris punctulatus*; .

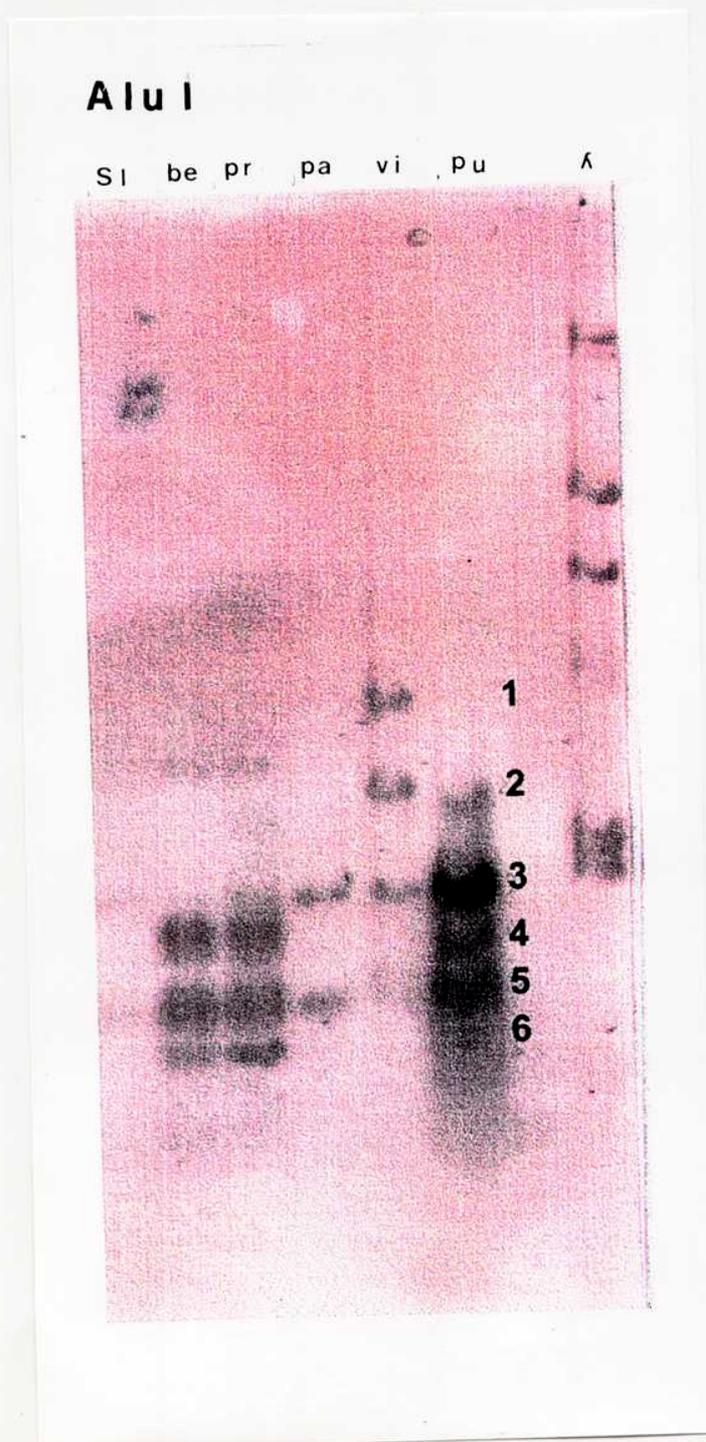


Figura 13: Fotografía del southern blott de especies del género *Dichroplus* y de *Scotussa lemniscata* (outgroup) digeridas con Xba I junto con el marcador de PM, lambda digerido con HindIII, utilizando como sonda el ADNmt de *Caledia captiva* y la interpretación del patrón de bandas obtenido.

Referencias: 1- 6 : pruebas con otra especie. 7: *D. elongatus* ; 8: *Baeacris punctulatus*; 9: *D. bergii*; 10: *D. vitattus*; 11: *D. pratensis*; 12: *Dichroplus patruelis*; ,13: *Scotussa lemniscata*.



b) Algoritmo de Wagner

Este algoritmo exacto se aplica mediante la opción "ie" (implicit enumeration) del programa Hennig86 y a diferencia del algoritmo de Dollo no tiene ninguna restricción respecto del tipo de cambios que puedan sufrir los caracteres.

b.1- cladogramas fundamentales

Se obtuvieron dos cladogramas fundamentales más parsimoniosos, de 76 cambios de longitud. El índice de consistencia del 77% obtenido da una idea de la confiabilidad del cladograma relacionada con su longitud, expresada en función de los cambios esperados con respecto a los observados. El índice de retención del 52% evalúa el porcentaje de homoplasias (paralelismos y reversiones) que ocurren en esos cladogramas con respecto a la peor situación posible (en la que todos los cambios serían homoplásicos)

En las figuras 14 b y c se puede observar que ambos cladogramas presentan una tricotomía basal que involucra a *S. lemniscata* (especie utilizada como grupo externo); a *D. elongatus* y a un grupo monofilético que incorpora al resto de las especies analizadas.

De los 58 caracteres analizados 21 resultan informativos para la formación de grupos (ver fig. 14 a). Los caracteres número 31 y 51 son sinapomorfías del género (novedades evolutivas del género incluyendo a *B. punctulatus*) y los número 18, 20, 33, 47 y 50 son también sinapomorfías del género pero esta vez indicando pérdida del carácter (en el caso de fragmentos de restricción la pérdida puede indicar el surgimiento de un nuevo sitio de restricción dentro del fragmento que causa la "desaparición" de ese fragmento de un tamaño determinado y a su vez puede determinar la pérdida real de un sitio). Seis caracteres (números 32, 35 y 37 - de 0 a 1- y números 34, 36 y 38 - de 1 a 0) originan el grupo monofilético que involucra a todas las especies excepto a *D. elongatus*. Dos sinapomorfias originan la separación de *D. vitattus* (esto es común a ambos cladogramas).

A partir de esta ramificación se obtienen dos posibles árboles de igual longitud que muestran a *D. patruelis*, *D. pratensis*, *D. bergii* y *B. punctulatus* relacionadas de diferente forma, en un caso *B. punctulatus* es especie hermana de *D. bergii* (Fig 14 b) y en el otro caso lo es de *D. patruelis* (Fig. 14c)

b.2- cladograma de consenso estricto

El programa Hennig86 sólo calcula el árbol de consenso estricto incluyendo los grupos que se encuentran en todos los cladogramas fundamentales (opción Nelsen). En nuestro caso, como se desprende de la descripción anterior, este árbol consta de una tricotomía basal que incluye al grupo externo, a *D. elongatus* y a un grupo monofilético del que se desprende primero *D. vitattus* para terminar en una policotomía sin resolver que incluye a las restantes cuatro especies entre las que se encuentra *B. punctulatus*. (Fig 14d)

b.3- otros grupos externos ensayados

Siguiendo la metodología utilizada por Lanteri (1992) se utilizó una especie no descrita como grupo externo con ausencia de todos los caracteres (todos 0). Esto se hizo con el objeto de reemplazar a *S. lemniscata* que tiene un número considerable de datos faltantes ya que no resolvió para una de las enzimas ensayadas (Hind III). Se realizaron dos ensayos diferentes, reemplazando al grupo externo (Fig. 14 e y f) e incluyéndolo en el grupo de especies en estudio (Fig 14g).

En el primer caso se obtienen dos cladogramas fundamentales de longitud 69 con un índice de consistencia del 75% y un índice de

retención del 50%. Ambos comparten una estructura similar a la de los tres cladogramas anteriores con una tricotomía basal que incluye al grupo externo y alternativamente a *D. elongatus* (Fig 14e) y a *D. vitattus* (Fig 14f) y un grupo monofilético que incluye al resto de las especies. En el primer cladograma *D. patruelis* queda como especie hermana de *B. punctulatus* y en el segundo lo es de *D. elongatus*

Al realizar el consenso estricto entre los dos cladogramas se obtiene un cladograma que no resuelve la policotimía que incluye a todas las especies.

Cuando incluimos a *S. lemniscata* dentro del grupo interno se obtiene un único cladograma de características muy diferentes (Fig 14g) y con una longitud mucho mayor, de 82 cambios y con un índice de consistencia del 69% y un índice de retención del 45%. A partir de una tricotomía basal que involucra al grupo externo y a *D. vitattus* se obtienen dos grupos monofiléticos: uno involucra a *D. bergii* y *B. punctulatus* como especies hermanas unidas a *D. pratensis* y otro en el que las especies hermanas son *S. lemniscata* (el grupo externo) y *D. elongatus*. La formación de este último grupo no es sorprendente ya que *D. elongatus* en todos los cladogramas anteriores mostraba pocos caracteres que la diferenciaban del outgroup.

Fig. 14 a : Cladograma fundamental obtenido mediante el Algoritmo de Wagner indicando los cambios que originan cada nodo (o grupo). Verde = sinapomorfías, rojo = homoplasias (reversiones o paralelismos) y azul = autoapomorfías)

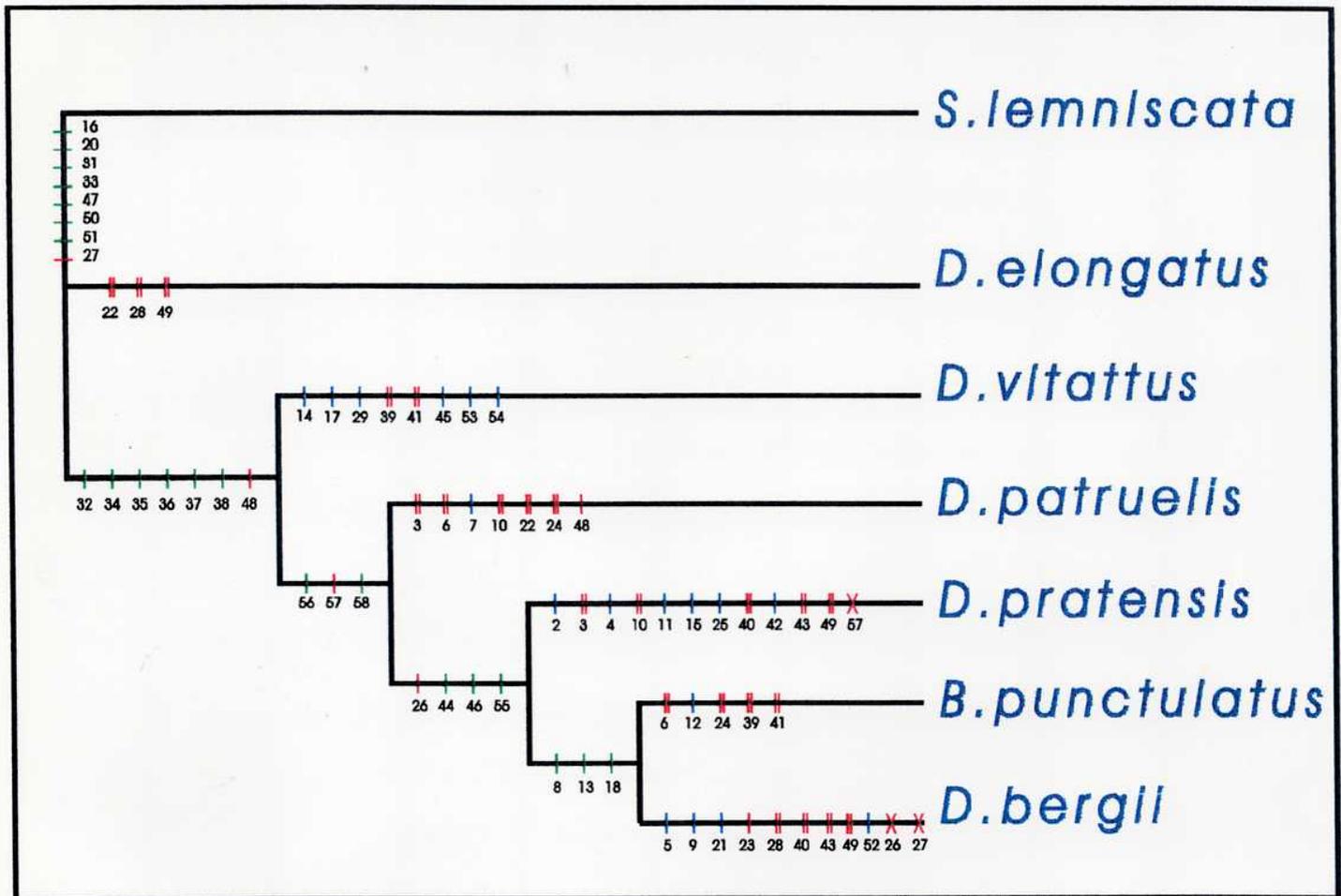


Fig. 14 b y c: Cladogramas fundamentales obtenidos mediante el Algoritmo de Wagner utilizando a *S. lemniscata* como outgroup.

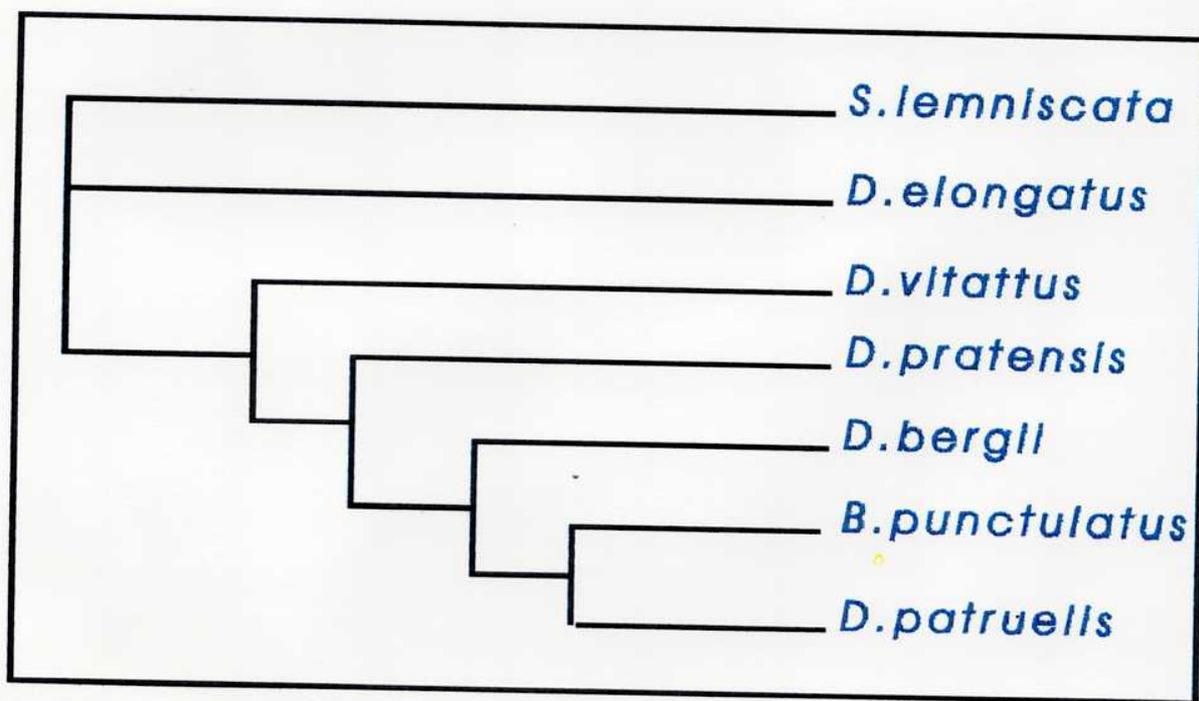
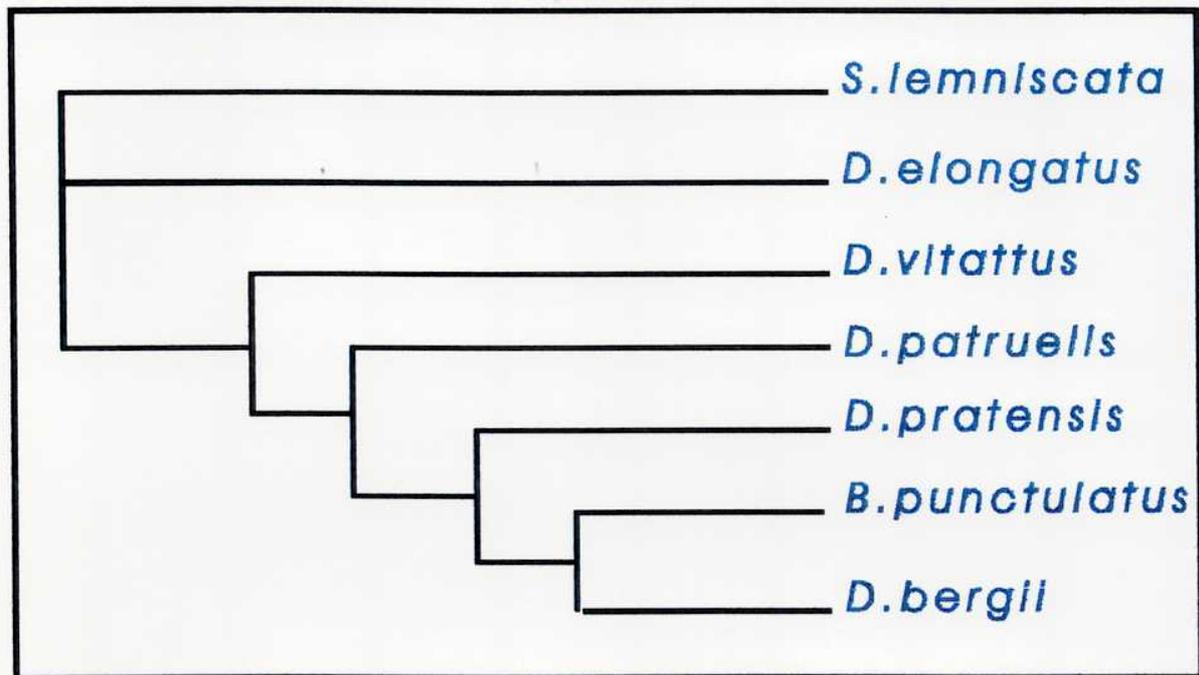


Fig 14 d : Cladograma de consenso estricto para los dos cladogramas fundamentales obtenidos mediante el algoritmo de Wagner utilizando a *S. lemniscata* como grupo externo.

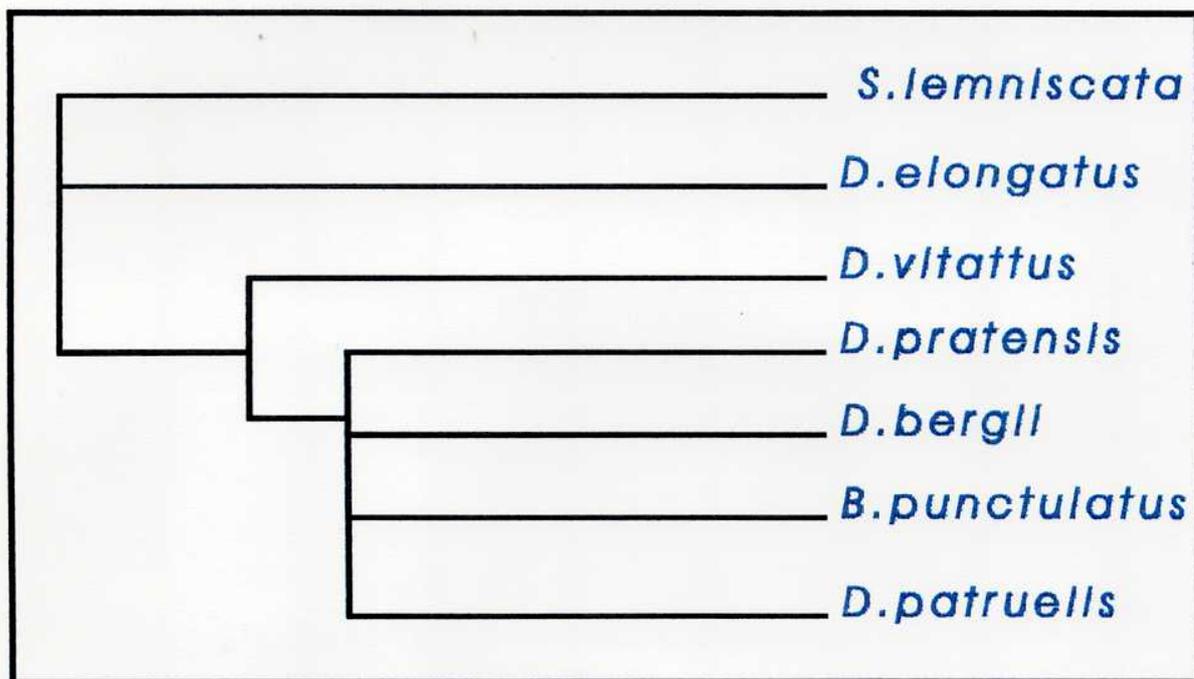


Fig 14 e y f : Cladogramas fundamentales obtenidos mediante el algoritmo de Wagner utilizando el grupo externo artificial.

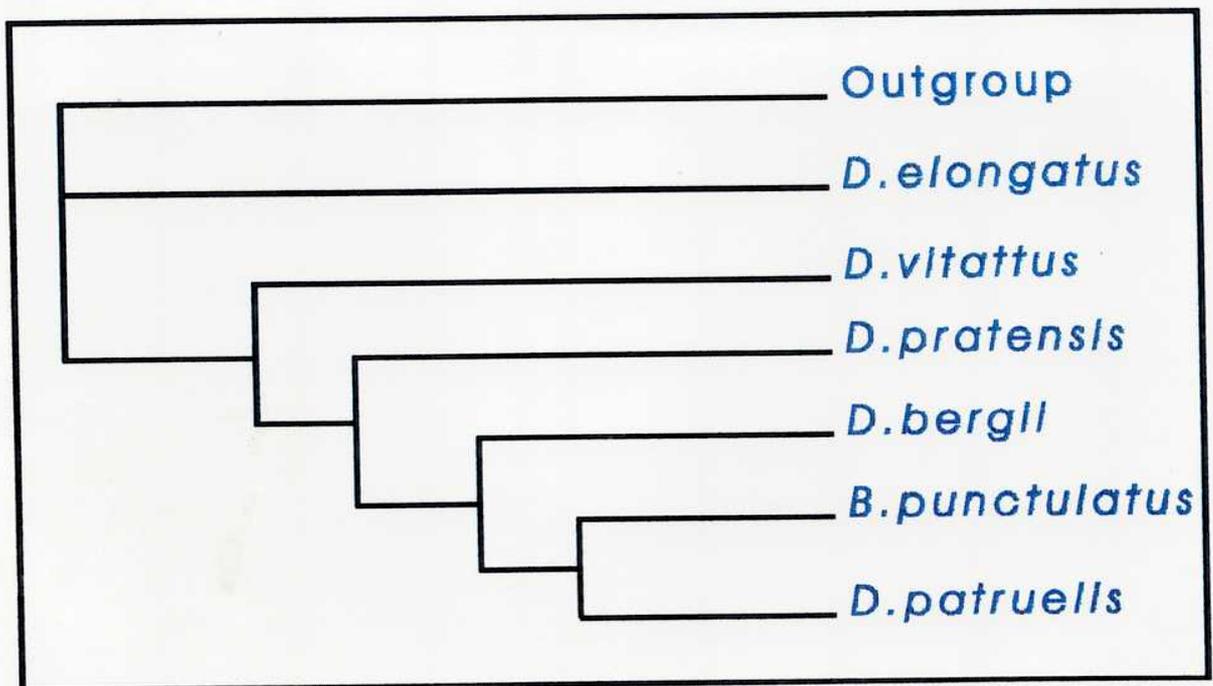
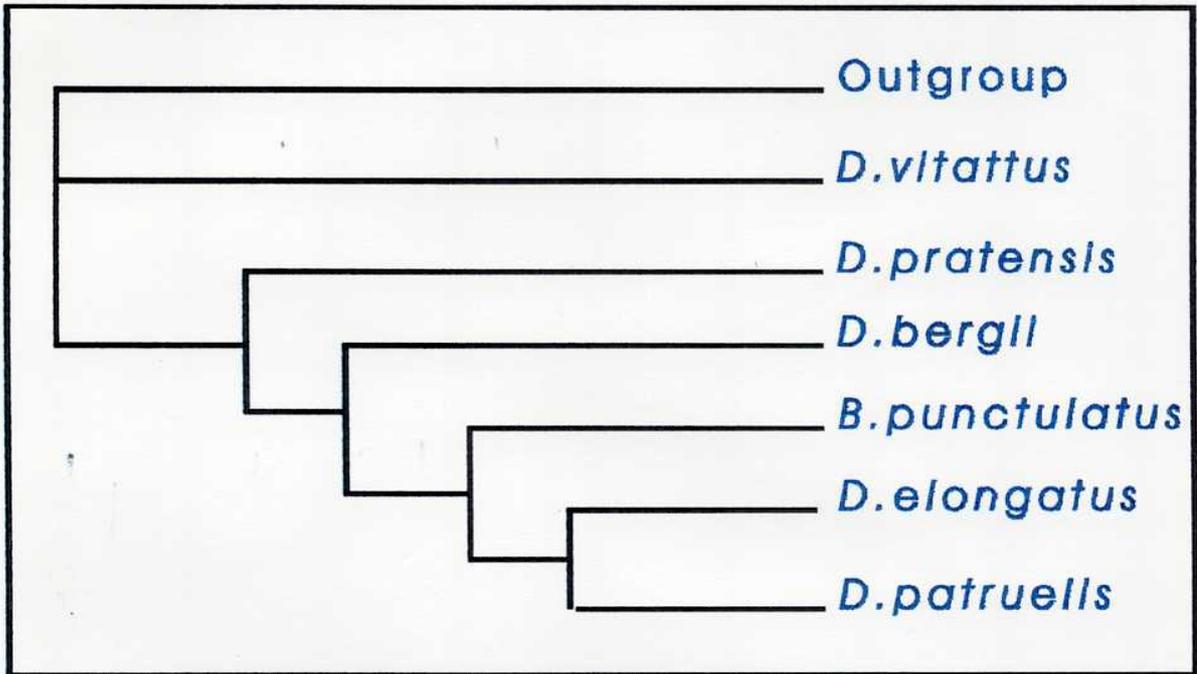
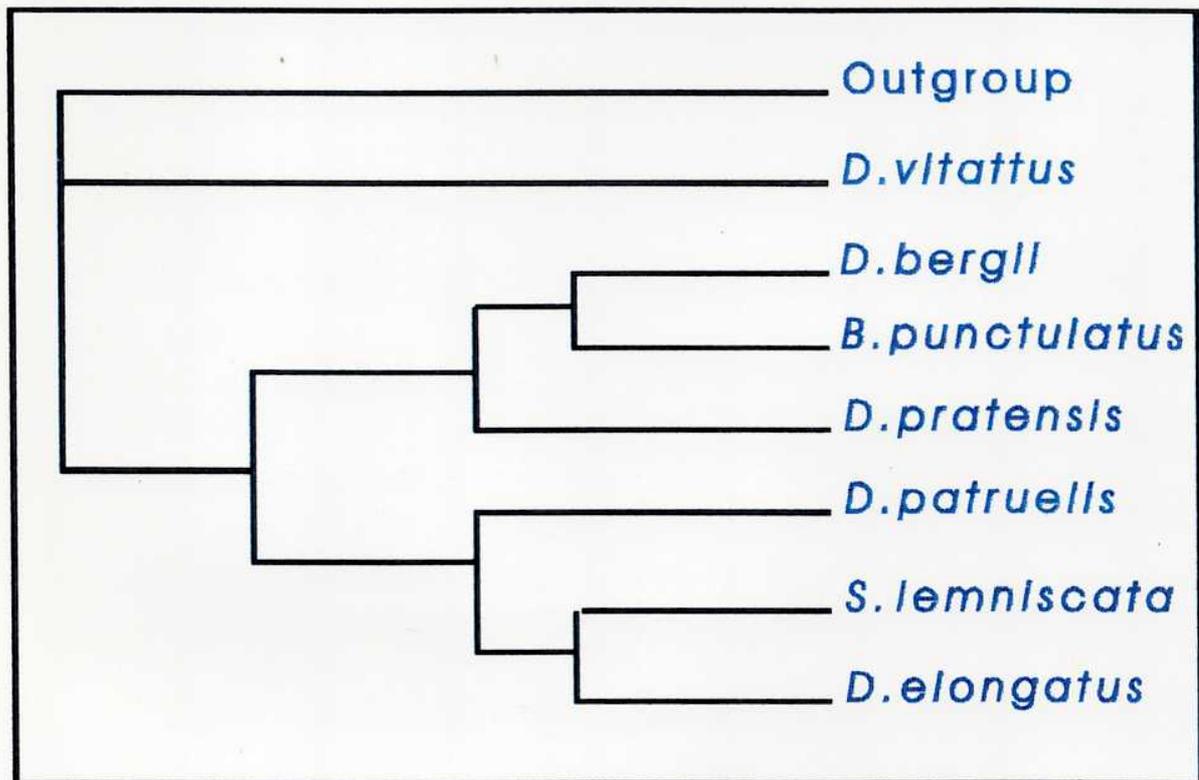


Fig 14 g: Cladograma fundamenta obtenido mediante el algoritmo de Wagner utilizando el grupo externo artificial e incluyendo a *S. lemniscata* en el grupo interno.



c) Algoritmo de Dollo

Se aplica este algoritmo cuya característica es que no permite las ganancias convergentes ni las reversiones a 1 (ganacia, pérdida y ganacia del mismo carácter) utilizando el paquete de programas para inferencia de filogenias (PHYLIP: phylogeny inference package, Joe Felsestein, 1991) mediante el subprograma Dollop. Este programa ejecuta el método de parsimonia de Dollo para fragmentos de restricción.

c.1- cladogramas fundamentales

Al utilizar este algoritmo que funciona con mayores restricciones, *S. lemniscatta* se situa naturalmente como grupo externo obteniéndose dos cladogramas fundamentales (Fig 15 a y b) (este programa no calcula índices). En ambos cladogramas *D. vitattus* es la especie que como grupo monofilético se desprende del grupo externo y luego lo hacen *D. patruelis*, *D. pratensis*, *D. bergii*, *D. elongatus* y *B. punctulatus* formando un grupo monofilético. En un caso las dos primeras se sitúan como especies hermanas (Fig 15 a) y en el otro caso las dos especies restantes (*B. punctulatus* y *D.*

elongatus) forman también un grupo monofilético de especies hermanas (Fig. 15b).

c.2 - cladograma de consenso estricto y de mayoría

Al construir el cladograma de consenso (programa consense) tomando a *S. lemniscata* como grupo externo observamos que, concordantemente a lo descrito anteriormente, *B. punctulatus* queda unida al grupo de especies hermanas formado por *D. bergii* y *D. pratensis*. (Fig 15c).

c.3 - otros grupos externos ensayados

Se utiliza *B. punctulatus* como grupo externo o "outgroup" con el objeto de evaluar la localización del grupo externo natural con respecto a las otras especies en estudio. Se obtuvo un cladograma que muestra que *D. elongatus* se separa primero del grupo externo y da origen a un grupo monofilético que luego da origen a otros dos grupos monofiléticos. Uno de los grupos tiene a *D. vitattus* unida como especie hermana al "outgroup natural" que sería *S. lemniscatta* y a *D. patruelis*. El otro grupo monofilético está compuesto por *D. pratensis* y *D. bergii* como especies hermanas (Fig 15 d)

Fig. 15 a y b: Cladogramas fundamentales obtenidos al aplicar el Algoritmo de Dollo.

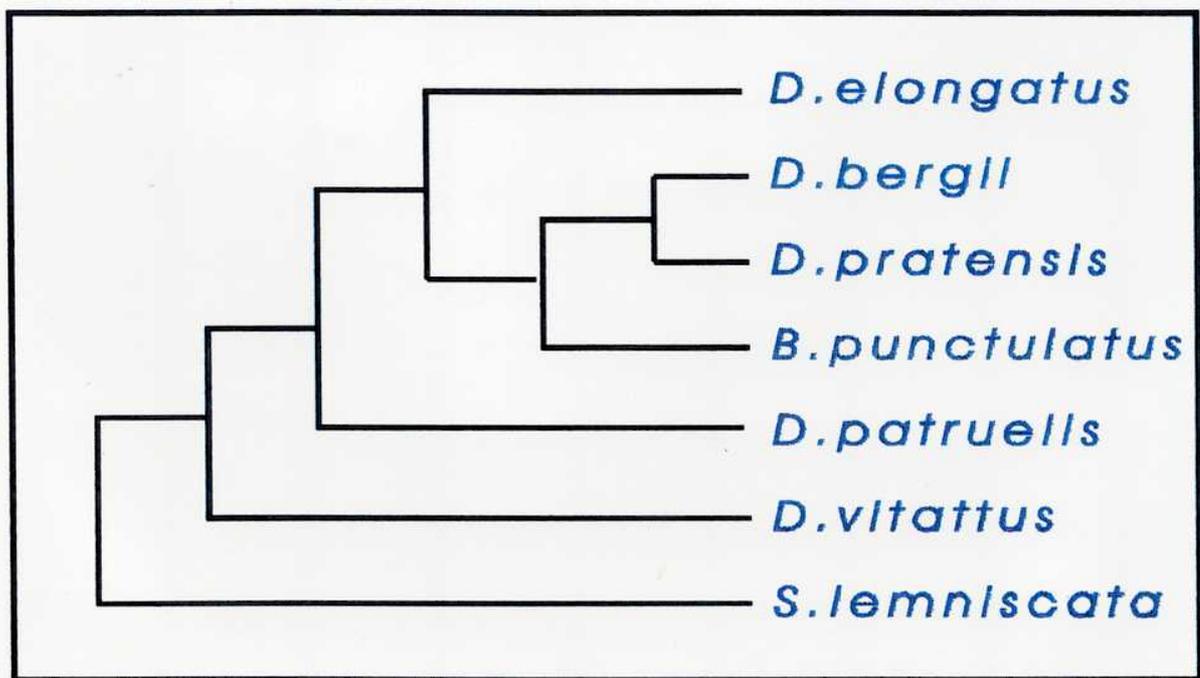
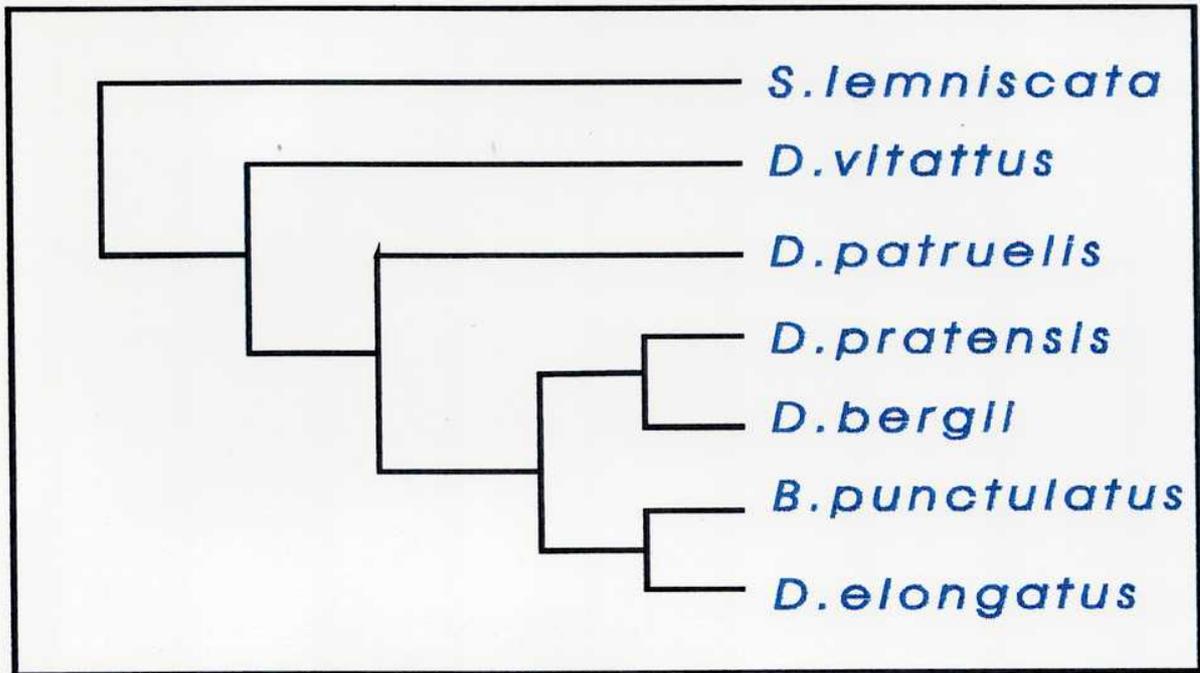


Fig 15 c: Cladograma de consenso estricto y de mayoría obtenido a partir de los cladogramas fundamentales obtenidos al aplicar el algoritmo de Dollo.

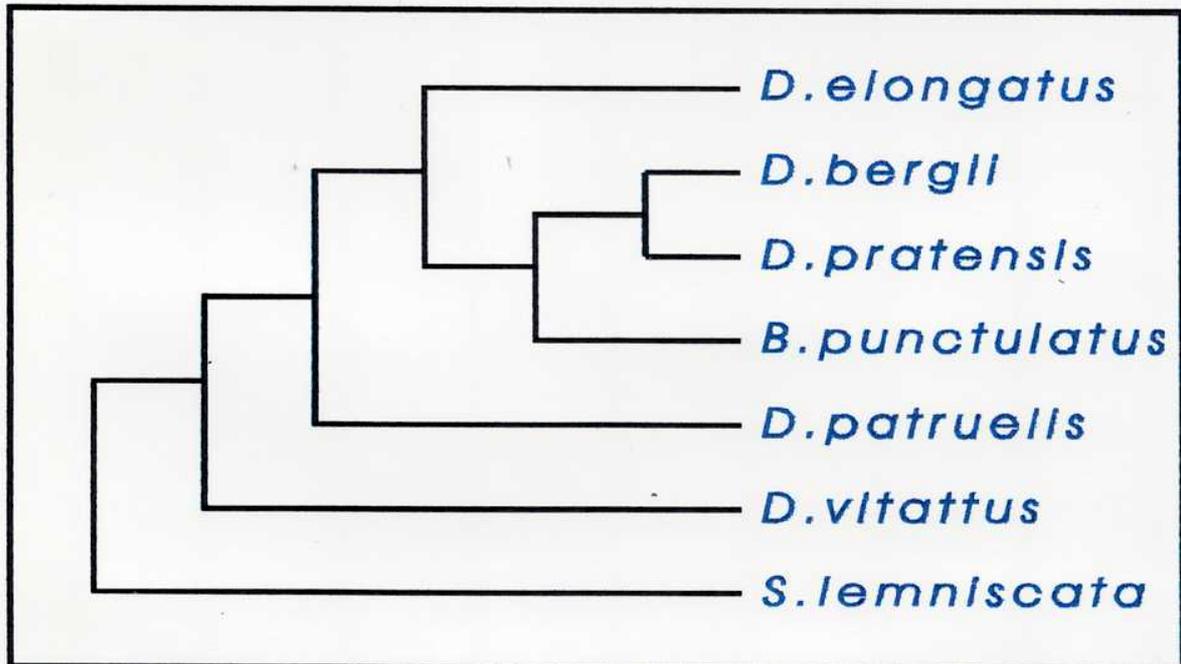
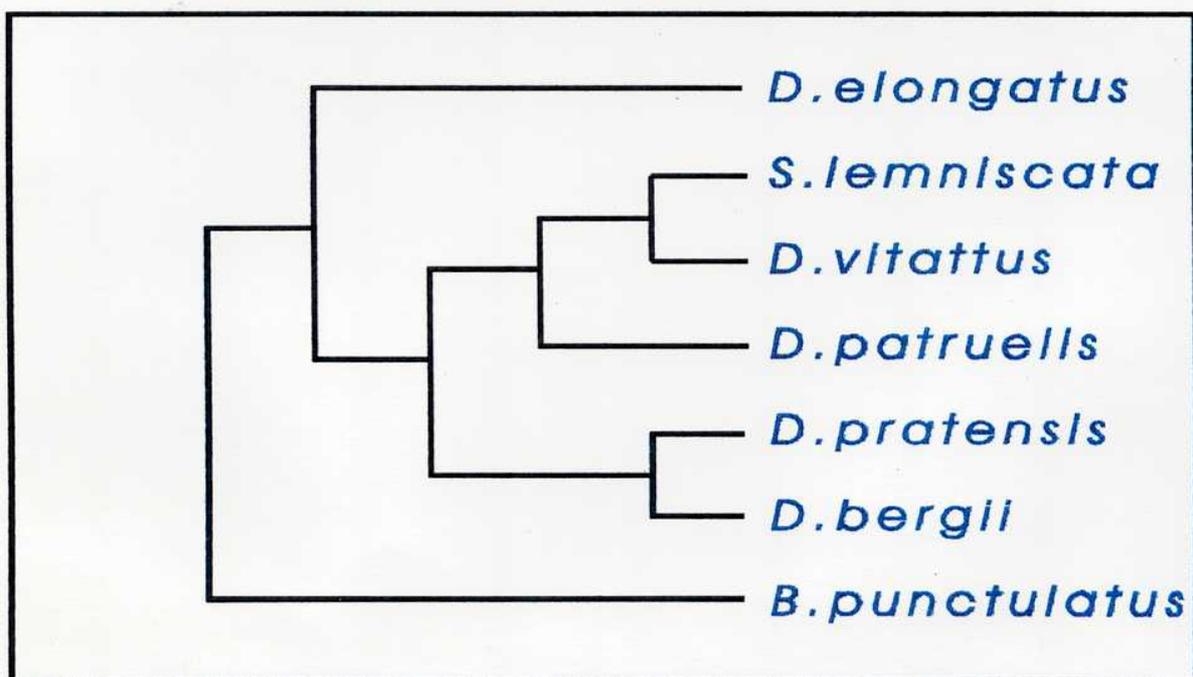


Fig. 15 d: Cladograma de consenso obtenido utilizando a *B. punctulatus* como grupo externo al aplicar el algoritmo de Dollo.



DISCUSION

I - Análisis microevolutivo: patrones de variación entre poblaciones de *Dichroplus elongatus*

El potencial de las isoenzimas como marcadores genéticos no fue inmediatamente predicho cuando la variabilidad isoenzimática fue inicialmente descrita (Hunter y Markert, 1957; Markert y Maller, 1959). La elevada incidencia de polimorfismos alozímicos fue bastante desconcertante. La teoría clásica había predicho que las formas más "eficientes" de una enzima, llegarían a través del tiempo a ser predominantes en las poblaciones, con ocasionales alelos raros producidos por mutación. El descubrimiento en muchas poblaciones de altos niveles de polimorfismos en loci isoenzimáticos, forzó a una reconstrucción de la teoría evolutiva (Kimura y Crow, 1964; Kimura, 1983).

El rol de la selección y la mutación continúa siendo debatido, pero tales desacuerdos no han impedido el uso de estas variantes genéticas en muchas aplicaciones. Ellas fueron aplicadas en numerosos estudios sistemáticos, de evaluación de la variabilidad y de mejoramiento. Algunos ejemplos son la aplicación a estudios sistemáticos en invertebrados (Nair *et al.*, 1971; Ayala, 1974; Ayala *et al.*, 1974), en estimaciones de la pérdida de variabilidad en especies en cautiverio (Wayne *et al.*, 1986), en estudios de patrones de

diferenciación genética entre especies de insectos parásitos de diferentes hospedadores (Feder *et al.*, 1990 a,b).

a) estructuración poblacional

Los estudios electroforéticos realizados en las poblaciones de *Dichroplus elongatus* aquí presentadas muestran un exeso de homocigotas como una característica general. Varias causas pueden ser invocadas para explicar esta desviación de las proporciones esperadas por la Ley de Hardy-Weinberg. 1) Selección en contra de los heterocigotas, 2) Apareamiento preferencial, 3) Heterocigotas para alelos nulos erróneamente considerados homocigotas activos, 4) Análisis de muestras mezcladas con individuos provenientes de dos o más subpoblaciones que difieren en frecuencias alélicas (Efecto Wahlund).

Con respecto a la primera opción, la selección en contra de los heterocigotas en general da origen a condiciones politípicas y no polimórficas (Vilardi, 1986). Que la desviación de las proporciones esperadas se encuentre en los siete loci polimórficos y sea significativa en seis de ellos descarta las opciones dos y tres y apoya la última. La subdivisión poblacional puede deberse a una vagilidad limitada, tal vez determinada por factores comportamentales ya que no se

encontraron barreras efectivas dentro de las localidades muestreadas. Sin embargo, como propone Gill (1981) para especies de saltamontes, esta estructuración puede surgir debido a cambios sutiles en la vegetación, por ejemplo un pequeño matorral puede ser suficiente para aislar dos demos.

En una de las poblaciones de la Provincia de Buenos Aires (ES) se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de machos y hembras para uno de los loci (Ldh-1). Únicamente si este patrón se repitiera en otras poblaciones podría ser atribuido a presiones selectivas diferenciales entre los sexos que a su vez se podrían explicar por las diferentes exigencias de movilidad debido a las estrategias de cortejo. Ldh es una enzima de gran importancia ya que cataliza reacciones relacionadas con la producción de ácido pirúvico y con el movimiento muscular. Asimismo el hecho de haberlo encontrado sólo en dos de las siete poblaciones analizadas puede indicar que estas conclusiones serían apresuradas, debiéndose las diferencias a errores estadísticos.

c) distancias genéticas

Las distancias genéticas de Nei oscilaron alrededor de los valores esperados para poblaciones locales, sin embargo deben ser

consideradas significativas si se tienen en cuenta las estimaciones de F_{st} para tres loci: para Aat1 y Pep1 - en concordancia con lo esperado para loci que responden a una distribución clinal (Singh y Rhonberg, 1987) -, y para Est-3. Estos tres loci son entonces los que aportan más a la diferenciación entre poblaciones y por ende al fenograma. Las relaciones observadas en el análisis de agrupamiento no pueden ser explicadas por las distancias geográficas siendo la mayor discordancia la unión de IM y FA situados a más de 1000 km. de distancia (Fig 6). Al eliminar IM del análisis el fenograma resultante concuerda en forma global con las distancias geográficas. La similitud genética entre IM y FA puede deberse a que ambas tienen frecuencias similares para los loci de más peso al evaluar la diferenciación entre poblaciones (Pep-1 y Est-3).

c) la variación clinal y sus posibles implicancias adaptativas.

La variación clinal ha sido ampliamente estudiada debido a que es una herramienta útil para analizar procesos de adaptación y flujo génico en poblaciones espacialmente estructuradas (Endler, 1973; May *et al.*, 1975; Barton y Hewitt, 1981). Muchos ejemplos demuestran asociaciones entre atributos fenotípicos o genotípicos de una población y algunos aspectos del ambiente físico (Hedrick *et al.*,

1976; Hedrik, 1986; Mc.Donald, 1983; Anderson *et al.*, 1987; Shaw *et al.*, 1988; Confalonieri y Colombo, 1989, 1994).

En las poblaciones de *Dichroplus elongatus* aquí analizadas se verificó una clina latitudinal para el locus Aat-1, siendo el primer ejemplo de distribución clinal alozímica en saltamontes. Este patrón de variación puede ser consecuencia de presiones selectivas diferenciales actuando sobre este locus o sobre loci en desequilibrio de ligamiento, siendo el agente selectivo alguna variable ambiental asociada con la latitud.

Los estimadores Nm calculados pueden ser interpretados como un alto flujo génico entre las poblaciones. Sin embargo la existencia de barreras ecológicas y geográficas entre las poblaciones y la agrupación de las poblaciones en los fenogramas hacen que la migración no sea la explicación más probable para las similitudes encontradas. Esto nos sugiere que las frecuencias alélicas serían mantenidas dentro de un ajustado rango por presiones selectivas, dando incluso en un caso una distribución clinal de frecuencias (AAT).

La enzima aspartato amino transferasa (AAT) cataliza la conversión reversible de aspartato y α -ketoglutarato a oxalacetato y glutamato usando como coenzima al piridoxal-5 fosfato. Fleischer *et al.* (1960) descubrieron dos formas distintivas de la enzima en músculos de corazón de mamíferos. Luego, varios investigadores (J.W. Boyd *et*

al., 1961) han demostrado que una forma de la enzima está presente en la fracción soluble de la célula y que la otra está asociada con la mitocondria. Ambas formas han sido purificadas en una variedad de tejidos de mamíferos (J.W. Boyd *et al.*, 1964) y las dos formas de AAT son, de hecho dos enzimas diferentes. Difieren en su comportamiento electroforético y cromatográfico, curvas de actividad, peso molecular y propiedades inmunológicas (Martinez-Carrion y Tiemeier, 1967). El patrón usual en humanos consiste en una banda anódica mayor y dos bandas menores que representan la forma soluble de la enzima, y una gran banda catódica con por lo menos dos bandas menores que representa la forma mitocondrial .

La intensidad diferencial de las bandas del locus Aat-2 en extractos de pata de *D. elongatus* y su ubicación catódica (Fig.2) sugeriría que las bandas corresponden a la forma mitocondrial de la enzima. Esta se encontraría en mayor concentración que la forma soluble en extractos de pata debido a la presencia de gran cantidad de mitocondrias en el tejido muscular de este insecto saltador.

En las poblaciones estudiadas se volvió a verificar la variación direccional de las frecuencias alélicas (clinas) con la latitud para Aat-1, agregando poblaciones en los extremos del gradiente estudiado: FA (Famaillá) en Tucumán y ES (Escobar) en Buenos Aires (Fig.1). Las frecuencias alélicas de Aat-1 se asocian también en forma

significativa con la temperatura mínima (TMin), identificando así a esta variable climática como la responsable del patrón clinal. En este caso no es sorprendente que la variable climática de más peso sea la temperatura mínima ya que *D.elongatus* a pesar de tener una distribución muy amplia, es susceptible a las bajas temperaturas siendo la temperatura ideal para su reproducción y crecimiento en condiciones de laboratorio es el rango de temperaturas entre 22-28°C (datos recogidos en nuestro laboratorio durante experimentos de cría). En el pez teleósteo *Fundulus heteroclitus* se encontraron diferencias en la estabilidad térmica y/o la cinética de estado estable entre las variantes alélicas del locus Aat-1 (forma citoplasmática) y se estimó el "fitness" (aptitud) diferencial de cada una de las variantes (Powers *et al.*, 1993).

Hay dos hipótesis evolutivas para justificar la existencia de variación clinal en las frecuencias alélicas. La correlación de frecuencias alélicas es una de las formas más comunes en que se evidencia la selección natural sobre loci alozímicos (Endler, 1977). Sin embargo, la dispersión a lo largo de un gradiente ambiental podría también ser la causa de estos patrones de variación (Wysmann y Cavalli-Sforza, 1984). De hecho, una asociación aparente de frecuencias alélicas con una única variable ambiental, como ser una

clina latitudinal correlacionada con la temperatura puede resultar también de procesos combinados de migración y deriva genética.

Ejemplos de patrones repetidos clinales incluyen a seis loci enzimáticos en *Drosophila melanogaster*, en los que se encuentran clinas de frecuencias alélicas en tres continentes (Oakeshott *et al.*, 1981, 1982, 1983, 1984). También hay clinas latitudinales en dos áreas para seis loci en el pez teleosteo *Fundulus heteroclitus* (Powers *et al.*, 1986). En el saltamontes *Trimerotropis pallidipennis* se observaron patrones similares a lo largo de diferentes gradientes altitudinales para polimorfismos de inversión (Confalonieri *et al.*, 1994), así como una clina latitudinal para dos loci de esterasas que se encontrarían presumiblemente en equilibrio de ligamiento con algunas de estas inversiones (Matrajt *et al.*, 1996). La variable ambiental responsable de la variación clinal de las frecuencias de Pep-1¹⁴ y Aat-1²⁰ serían la temperatura máxima absoluta y la temperatura mínima media respectivamente. La diferenciación entre poblaciones medida mediante los valores de F_{st} para estos dos loci son consistentemente significativas como se observa para loci que muestran una distribución clinal en *Drosophila melanogaster* (Singh y Rhomberg, 1987).

Hay cuatro líneas de evidencia que sugieren causas alternativas al "contacto secundario" (interacción entre deriva y migración) para explicar los patrones de variación direccional encontrados para Aat-1

y Pep-1 en *Dichroplus elongatus*. En primer lugar, si se encuentran ejes concordantes para diferentes loci (es decir que las frecuencias alélicas para diferentes loci varían en una misma dirección con respecto a una única variable como en *Quercus petraea* (Zanetto y Kremer, 1995)), el flujo génico en gran escala podría ser responsable de la variación clinal de las frecuencias alélicas. Por otro lado, si se encuentran diferentes variables en asociación con distintos loci entonces se debe invocar a la selección (Barbujani, 1988).

Nuestros resultados apoyarían la hipótesis selectiva ya que Aat-1 y Pep-1 están correlacionados con diferentes variables (Lat, Long, T.Min y T.Max; T.Max.Abs y T.Min.Abs respectivamente) sin mostrar ninguna correlación concordante con ninguna de las nueve variables estudiadas.

En segundo lugar, en el fenograma construido a partir de las distancias genéticas las poblaciones no se vinculan de acuerdo con lo esperado considerando las distancias geográficas; concordantemente, ambas matrices no muestran correspondencia.

En tercer lugar, el flujo génico estimado sería lo suficientemente elevado como para enmascarar las diferencias en las frecuencias alélicas si estas fueran originadas solamente por deriva genética.

Por último, el patron de variación encontrado se mantiene incluso al incluir poblaciones muestreadas en distintos años (Tabla 1).

Esto sugiere que de alguna manera la variación clinal encontrada es estable en el tiempo. Un gradiente temporalmente estable debe ser mantenido por algún tipo de selección, de lo contrario el gradiente ya habría desaparecido.

De esta manera, los resultados obtenidos sugieren la existencia de un probable efecto adaptativo de algunos loci alozímicos, que estaría determinado en última instancia por variables ambientales relacionadas con la latitud.

d) comparación de estimaciones de variabilidad medida a través de diferentes técnicas

En *Drosophila melanogaster* (Begun y Aquadro, 1993) y en *Ceratitis capitata* (Barufi *et al.*, 1995) se encontró mayor variación a nivel del ADN utilizando secuencias no-codificantes que la que había sido detectada en estudios alozímicos. Contrariamente, en otras especies de ortópteros como *Trimerotropis pallidipennis* se encontraron niveles de variación similar para ambos marcadores (RAPDs e isoenzimas) (Confalonieri y Remis, *enviado*).

A partir de los datos de variabilidad resultante se desprende que la variabilidad obtenida mediante isoenzimas no difiere de la obtenida mediante RAPDs para *Dichroplus elongatus*.

En muchos casos donde se clonaron e identificaron productos de amplificación mediante RAPD, se encontró que la mayoría de las secuencias más informativas para estudios poblacionales derivan de secuencias repetitivas en el genoma (Kazan et al., 1992; Haymer y Mc. Innis, 1994; Haymer, 1994). Si muchos de los productos de identificación representan ADN repetitivo deberíamos esperar niveles más altos de variabilidad con marcadores RAPD que con isoenzimáticos. Si seguimos este razonamiento, no sería la semejanza o diferencia entre los estimadores obtenidos por estos dos métodos un indicador de la cantidad de ADN repetitivo presente en un genoma en particular?

Otra posible explicación sería que los "primers" o cebadores utilizados no amplifican regiones de ADN altamente repetitivo y esto podría contestarse únicamente ensayando un mayor número de cebadores, aunque la elección azarosa de las secuencias a amplificar hace que esta explicación sea poco plausible.

El valor de F_{st} calculado mediante RAPD indicaría que la diferenciación es moderada de acuerdo a Hartl (1980) ($F_{st} = 0.145$). Este resultado no es sorprendente ya que en los estudios isoenzimáticos se había demostrado la ocurrencia de flujo génico significativo entre poblaciones. De todos modos, este valor de F_{st} es mucho mayor que el calculado a partir de datos alozímicos ($F_{st} = 0.0367$).

Los estimadores de F_{st} se basan en modelos evolutivos que asumen migración y deriva genética de variantes alélicas neutras entre demos igualmente accesibles (Nei, 1977; Nei y Cheeser, 1983; Matrajt *et al.*, 1995). El hecho que los RAPDs sean considerados marcadores genéticos de relativa neutralidad fenotípica daría más exactitud a este estimador comparado con uno que surge del cálculo utilizando loci alozímicos que muestran alguna evidencia de no-neutralidad. Más aún, los RAPDs pueden brindar un grán número de marcadores, lo que aseguraría también un mejor estimador.

Sin embargo, teniendo en cuenta la relación existente entre los índices de fijación (F_{is} y F_{st}), $[(1 - F_{it}) = (1 - F_{is}) (1 - F_{st})]$, cualquier valor de F_{is} significativamente diferente de 0 resultará en una sobre o subestimación de los valores de F_{st} calculados mediante loci Rapds. Ya que en *D. elongatus* los estudios isoenzimáticos revelaron un exceso de homocigotas en la mayoría de los loci analizados entonces, el valor de F_{st} basado en RAPDs podría ser una sobreestimación del valor real. Esto explicaría la gran diferencia de este valor cuando es comparado con el estimador que surge de marcadores isoenzimáticos.

La falta de concordancia entre los fenogramas realizados a partir de datos alozímicos y de RAPD puede deberse nuevamente al uso de loci con una posible función selectiva. El hecho es que las

distancias genéticas no se corresponden con las geográficas para marcadores alozímicos. Esto reforzaría la noción de selectividad para estos últimos y de neutralidad de los marcadores RAPD (que dan como resultado distancias genéticas y geográficas concordantes).

A la luz de estos resultados que señalan a al menos algunos loci alozímicos como de evidente efecto selectivo y a los loci RAPD como de evidente comportamiento neutral, es recomendable tener precaución en el uso de los estimadores de variabilidad intra e interpoblacional. La utilización conjunta de ambas técnicas sobre el mismo grupo de poblaciones probó ser una herramienta potente e interesante para el análisis, brindando más información que cada técnica por separado.

II - Análisis de las relaciones filogenéticas entre especies del género *Dichroplus*

Las premisas en las que se basan los estudios filogenéticos son: la herencia de características ancestrales y la existencia de una historia evolutiva definida por cambios en estas características. La herencia estable de características está mediada por el genoma. Las diferencias debidas a factores ambientales y epigenéticos no provee información útil y deben ser especialmente evitadas; todos los caracteres de interés deben estar determinadas genéticamente. Por lo tanto, los datos para inferencias filogenéticas reflejan en cierta medida la información proveniente del genoma. Desde esta perspectiva reduccionista, una historia evolutiva completa es sinónimo de un relato paso por paso de mutaciones fijadas en todos los linajes genómicos de interés (Swofford y Olsen, 1990).

Como en cualquier otro nivel de comparación, el ideal es encontrar caracteres que exhiban variación entre, pero no dentro de los grupos (especies) bajo estudio. Más aún, las diferencias entre grupos no deben ser tan grandes como para que la existencia de convergencias y paralelismos oscurezcan la verdadera filogenia. La elección de la secuencia a analizar es crítica para obtener este tipo de balance. Las secuencias con tasa de evolución rápida (alta) y

baja o moderada variación intraespecífica son las más apropiadas para analizar relaciones entre especies muy relacionadas, mientras que aquéllas con tasa evolutivas más bajas pueden proveer caracteres útiles para estudiar divergencias relativamente antiguas (Dowling *et al.*, 1990).

Los estudios filogenéticos realizados utilizando técnicas moleculares pueden ser útiles para contrastar hipótesis planteadas a partir de datos morfológicos del mismo grupo de especies. La complementariedad existente entre estudios sistemáticos que utilizan datos morfológicos y moleculares determina que los resultados obtenidos trasciendan la utilidad de su estudio por separado (Gould *et al.*, 1974; Mickevich y Johnson, 1976; Nixon y Taylor, 1977; Miyamoto 1981; Shaklee y Tamaru, 1981; Best *et al.*, 1986.)

Uno de los temas que genera más controversia al manejar diferentes tipos de caracteres es si deben o no ser combinados en un único análisis. Kluge (1989) toma una posición a favor de la combinación de caracteres al expresar que las clasificaciones deben basarse en "toda la evidencia". Bajo su punto de vista, la clasificación ideal corresponde al árbol más parsimonioso para un grupo de datos que contenga caracteres obtenidos de todas las fuentes de información disponibles. Miyamoto (1985) también argumentó que los árboles más parsimoniosos para caracteres combinados tienen mayor

poder explicativo y por lo que deben ser elegidos. A pesar de que existen situaciones en que combinar grupos de datos puede ser útil, Swoford (1991) encuentra razones de peso para analizar diferentes grupos de datos también en forma separada.

En estudios de sistemática molecular, al igual que en cualquier estudio sistemático, la elección y peso de los caracteres a utilizar es tan determinante del resultado final como la elección del método analítico.

La elección de la molécula de ADN mitocondrial como blanco del análisis se debe a su rápida evolución, lo que la convierte en una herramienta útil para estudiar la filogenia de poblaciones dentro de una misma especie así como para recuperar filogenias de complejos de especies muy relacionadas (Brown y Wright, 1979; Templeton, 1983). La aplicación del análisis del polimorfismo para el largo de los fragmentos de restricción (RFLP) en ADN mitocondrial para el estudio de especies cogenéricas fue ampliamente revisado (Brown, 1983; Avise y Lansman, 1983; Wilson *et al.*, 1985; Birley y Coft, 1986; Avise, 1986; Moritz *et al.*, 1987). En general este enfoque probó ser útil para resolver relaciones entre especies muy relacionadas.

El análisis filogenético de los sitios de restricción de ADNmt ha servido incluso para identificar a la especie que actuó como madre

de otra especie híbrida partenogenética (Brown y Wright 1979; revisado en Moritz *et al.*, 1989).

El objetivo general de estudios que utilizan RFLPs es obtener datos inequívocos sobre la ganancia y pérdida de sitios de restricción. Esta información puede ser utilizada para caracterizar al ADN (cambios en el largo, rearrreglos, etc.), y provee una introspección en los procesos evolutivos a nivel de poblaciones y especies o para formular hipótesis de relaciones filogenéticas.

Hay dos formas fundamentales de encarar el análisis de RFLPs: comparar fragmentos o comparar sitios de restricción. La comparación de fragmentos debe sin embargo ser utilizada sólo en casos de especies muy relacionadas (ej: cogenéricas) ya que ambas proveen evidencia indirecta de la secuencia a analizar.

Del análisis de los polimorfismos para fragmentos de restricción obtenidos en el estudio del género *Dichroplus* mediante la construcción de cladogramas con el Algoritmo de Wagner se desprende que *S. lemniscatta* se dispone naturalmente como grupo externo, tal como se esperaba de acuerdo con los datos morfológicos. *B. punctulatus* queda en posiciones que indicarían una divergencia muy reciente de *D. bergii* en lugar de quedar aislada, o cercana al grupo externo. Esto se contrapone en parte a recientes revisiones morfológicas donde ha sido transferida al nuevo género

Baeacris. *D. vitattus* y *D. pratensis* (que pertenecen al grupo *maculipennis*) no se agrupan como especies hermanas, pero quedan muy cercanas en todos los árboles .

D.bergii que esperaríamos quedara localizada cerca de *S.lemniscata* ya que comparte caracteres morfológicos con esta (*Cigliano com.pers.*) queda localizada como especie hermana o de divergencia muy reciente de *B. punctulatus* en todos los árboles.

El aumento en el largo de los cladogramas obtenidos al reemplazar el "grupo externo" por otro de una especie no descrita indica la conveniencia de usar al outgroup natural: *S. lemniscata*.

Al aplicar en estos mismos datos el Algoritmo de Dollo nuevamente observamos que los datos moleculares compilados en este estudio no se corresponden con la clasificación taxonómica a partir de estudios morfológicos.

La propuesta para un estudio más exhaustivo sería la de incluir caracteres provenientes de genes nucleares y comparar las filogenias obtenidas con los tres métodos (datos morfológicos, secuencia de genes nucleares y evidencia indirecta de la secuencia del ADN mitocondrial mediante RFLP), construyendo matrices que incluyan todos los caracteres. la importancia de incluir datos de distintas fuentes radica principalmente en que si bien los datos moleculares superan en número a los morfológicos generalmente son muy

uniformes, dando como resultado pocos árboles. Se aplicaría entonces la combinación de caracteres, descartando la partición, ya que estudios que combinen ambos enfoques pueden maximizar la cantidad y utilidad de la información y darnos una visión más comprensible de la evolución de los organismos.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "David". The signature is stylized with a large, sweeping initial letter 'D' that loops back.A handwritten signature in black ink, appearing to read "Adria Sepulveda". The signature is written in a cursive style with distinct, connected letters.

BIBLIOGRAFIA

- Abate, T., 1993. Is the invading medfly eligible for California residency?. *Bioscience* 43:3.
- Altukhov, Y.P., 1991. The role of balancing selection and overdominance in maintaining allozyme polymorphism. *Genetica* 85: 79-90.
- Anderson, P.R.; Knibb, W. and Oakeshott, J.G., 1987. Observation on the extent and temporal stability of latitudinal clines for alcohol dehydrogenase allozymes and four chromosome inversions in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 75: 81-88.
- Avise, J.C. y Lansman, R.A., 1983. Polymorphisms of mitochondrial DNA in populations of higher animals. pag. 165-190. M.Nei y R.K. Koehn eds. *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- Avise, J.C., 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser.B* 15:151-158.
- Avise, J.C., Lansman, R. A. y Shade, R. O., 1979. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations.I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics* 92:279-295.
- Ayala, F. J., 1974. Genetic variation, sexual isolation and evolution. En J. H. Bruel eds. *Prospects in behavioural genetics*. Russel Sage foundation.
- Ayala, F. J., 1977. Protein evolution in different species. Is it a random process?. In *Molecular Evolution and Polymorphism*. Kimura Eds.
- Ayala, F. J., Stebbins, G.L. y Valentine, J. W., 1977. *Evolution*. Freeman, San Francisco.
- Ayala, F. J., Tracey, M. L., Barr, L. G., Mc. Donald, J. F. y Peres Salas, S., 1974. Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms. *Genetics* 77: 343 - 384.

- Barbujani, G., 1988. Detecting and comparing the direction of gene-frequency gradients. *J. Genet.* 67: 129-140.
- Bardakci, F. y Skibinski, O. F., 1992. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73: 117-123.
- Barufi, L.; Damiani, G.; Guglielmino, C.R.; Bandi, C. ; Malacrida, A. R. and Gasperi, G. (1995). Polymorphisms within and between populations of *Ceratitix capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity* 74: 425-437.
- Barton, N. y Jones, J.S., 1983. Mitochondrial DNA: new clues about evolution. *Nature* 306: 317-318.
- Barton, N.H. and Hewitt, G.M., 1981. A chromosomal cline in the grasshopper *Podisma pedestris*. *Evolution* 35: 1008-1018.
- Beadle, G.W. y Tatum, E.L., 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora* PNAS USA 27: 499-506.
- Begun, J. and Aquadro, C.F. (1993). African and North American populations of *Drosophila melanogaster* are very different at the DNA level. *Nature* 365: 548-550.
- Benzer, S., 1955. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. PNAS USA 41: 344-354.
- Benzer, S., 1961. On the topology of the genetic fine structure. PNAS USA. 47: 403-415.
- Best, T.L., Sullivan, R.M., Cook, J.A, Yates, T.L., 1986. Chromosomal, genic and morphological variation in the afile kangaroo rat, *Dipodomys agilis* (Rodentia: Heteromyidae). *Syst. Zool.* 35: 311-24.
- Birley, A.J. y Croft, J. H., 1986. Mitochondrial DNAs and phylogenetic relationships, pp 107-137 En: S.K. Dutta ed. DNA systematics. CRC press, Boca Raton, FL.
- Boyd, J. W. 1961. *Biochemical Journal* 81: 434.

- Boyd, J. W. 1964. *Biochim.Biophys .Acta* 113: 302.
- Brown, G.G. y Simpson, M.V.(1981) Intra- and interespecific variation in the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships. *Genetics* 97: 125-143.
- Brown, W.M. y Wright, J.W., 1979. Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). *Science* 203: 1247-49.
- Brown, W.M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. pp 62-88. En: M.Nei y R.K. Koehn eds. *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- Brown, W.M., Preger, E.M., Wang, A y Wilson, A.C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*18: 225-239.
- Camin, J. H. y Sokal, R.R. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution* 19: 311 - 326.
- Carey J.R.1991. Establishment of the Mediterranean fruit fly in California, *Science* 253:1369.
- Cigliano, M. M., de Wysiecki, M.L. & Lange ,C. E., 1995. Disminución de la abundancia de *Dichroplus maculipennis* (ORTHOPTERA: ACRIDIDAE) en comunidades del Sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Soc.Entomol.Argent.* 54 (1-4): 41-42.
- Clarke, B., 1979. The evolution of genetic diversity. *Proc. Roy. Soc London, B* 205:453-474. Citado por Nezo(1984).
- Clegg, M. T. y Allard, R. G. 1972. Patterns of genetic differentiation in the slender wild oat species *Avena barbata*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 1820-1824.

- Clemente, M., Remis, M.I., Vilardi, J. C., Alberti, A., 1994. Supernumerary heterochromatin, chiasma conditions and abnormal sperm formation in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera): intra and interpopulation analysis. *Caryologia* 47 (3-4)
- Colgan, D.J., 1989. Developmental variation and allozymic polymorphisms in the enzymes of glycolysis in grasshoppers. *J.Evol.Biol.* 2:141-151.
- Colgan, D.J., 1992. Interspecific isozymic substitution is not random. *Heredity* 69: 150-159.
- Confalonieri, V.A. and Colombo, P.C., 1989. Inversion polymorphisms in *Trimerotropis pallidipennis* (ORTHOPTERA): clinal variation along an altitudinal gradient. *Heredity* 62: 107-112.
- Confalonieri, V.A., 1994. Inversion polymorphisms and natural selection in *Trimerotropis pallidipennis* (ORTHOPTERA): correlations with geographical gradients. *Hereditas* 121:79-86.
- Confalonieri, V.A.; Vilardi, J.C. and Saidman, B.O., 1993. Allozyme variation between chromosomally differentiated populations of *Trimerotropis pallidipennis* (Orthoptera). *Evolución Biológica*, 6: 39-51.
- Crisci, J. V., 1982. Parsimony in evolutionary theory: Law or methodological prescription?. *J. Theoret. Biol.* 97: 35-41.
- Crisci, J. V., 1977. Clasificación biológica: naturaleza, objetivos, fundamentos. *Obra del centenario del Museo de La Plata. Bot.* 3: 51 - 61.
- Chalmers, K. J.; Waugh, R.; Sprenf, J. I., Simons, A. J. y Powell, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliciridia sepium* and *G. maculata*. *Heredity* 69: 465-472.
- Chapco, W. and Bidochka, M.J., 1986. Genetic variation in prairie populations of *Melanoplus sanguinipes*, the migratory grasshopper. *Heredity* 56: 397-408.

- Chapco, W.; Ashton, N. W.; Mantel, R. K. B. y Antoniskyn, N. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome* 35: 569-574.
- Christiansen, F.B.; O. Frydenberg ;J.P. Hjorth; V. Simonsen 1976. Genetics of *Zoarces* populations IX. Geographic variation at three phosphoglucumutase loci. *Hereditas* 83: 245-256.
- Dobshansky, T. y Ayala, F.J., 1951. *Genetics and the origin of species*. 3ra. ed. Col. Univ. Press. New York.
- Dobshansky, T. y Ayala, F.J., 1973. Temporal frequency changes of enzymes and chromosomal polymorphisms in natural populations of *Drosophila* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70: 680-683.
- Dobshansky, T.; Ayala, F.J.; Stebbins, G.L. and Valentine, J.W., 1980. *Evolution*. W.H. Freeman and Company (Eds.) San Francisco.
- Dowling, T.E., Moritz, C. y Palmer, J.D., 1990. Nucleic acids II: restriction site analysis. En *Molecular Systematics*. Hillis y Moritz eds. Sinauer , Massachusetts, USA.
En M.Nei y R.K. Koehn (eds.) *Evolution of genes and proteins*. 208-233. Sinauer, Sunderland, MA.
- Endler, J.A., 1973. Gene flow and population differetiation. *Science* 179: 243-250.
- Endler, J.A., 1977. Gene flow and population differetiation. *Science* 179: 243-250.
- Erllich, H.A. 1989. *PCR technology* . Stockton Press, New York.
- Farris, J. S., 1970. Mehtods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.* 19: 83-92.
- Farris, J. S., 1977. Phylogenetic analysis under Dollo`s Law. *Syst. Zool.* 26: 77-88.

- Farris, J. S., 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics*, 5: 417-419.
- Feder, J.L., Chilcote, C.A. y Bush, G.L., 1990. Regional, local and microgeographic variation between apple and hawthorn populations of *Rhagoletis pomonella* in Western Michigan. *Evolution* 44(3): 595 - 608.
- Feder, J.L., Chilcote, C.A. y Bush, G.L., 1990. The geographic patterns of genetic differentiation between host associated populations of *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) in the Eastern United States and Canada. *Evolution* 44 (3): 570 - 594.
- Felsenstein, J.F., 1985. Confidence limits as phylogenies. An approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J.F., 1991. PHYLIP Phylogeny inference package Ver 3.4. University of Washington, Seattle.
- Fleischer, G.A.; Potter, C.S.; Wakim, K.G. 1960. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103:229.
- Forey P.L., Humphries C.J., Kitching I.L., Scotland R.W., Siebert D.J. and Williams D.M. 1993. *Cladistics. A practical course in Systematics.* Oxford University Press. New York.
- Fos, M.; Dominguez, M.A.; Latorre, A. y Moya, A. (1990). Mitochondrial DNA evolution in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 87: 4198-4201.
- Gibbons, A., 1991. Systematics goes molecular. *Science* 8: 872- 874.
- Gill, P., 1981. Heterozygosity estimates in the grasshopper *Chorthippus brunneus* (THUNBERG). *Heredity* 46: 269-272.
- Gould, S. J., Woodruff, D.S. y Martin, J.P. 1974. Genetics and morphometrics of *Cerion* at Pongo Carpet: A new systematic approach to this enigmatic land snail. *Syst. Zool.* 23: 518-35.

- Hadrys, H.; Balick, M. y Schierwater, B. 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 55-63.
- Hamrick, J. L. y Allard, R. W., 1972. Microgeographic variation in allozyme frequencies in *Avena bromata*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69: 2100- 2104.
- Harrison, R.G.; Rand, D.M. y Wheeler, W.C., 1985. Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science* 228: 1446-1448.
- Harrison, R.G.; Rand, D.M. y Wheeler, W.C.(1987) Mitochondrial DNA variation in field crickets across a narrow hybrid zone. *Mol.Biol.Evol.*4(2): 144-158.
- Hartl, D. L., 1980. Principles of population genetics. 1st edition. Sinauer Associates. Inc. Sunderland Massachusetts.
- Haymer, D. (1994). Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: What are they and can they tell us anything we don't already know? . *Annals of the entomological society of America*: 87(6): 717-722.
- Haymer D. and Mc. Innis D, (1994). Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome* 37: 244-248.
- Hedrick, P.W., 1983. Genetics of populations. Science books international publishers. Boston USA 629 pags.
- Hedrick, P.W., 1986. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: A decade later. *Ann.Rev.Ecol.Syst.* 17: 535-566.
- Hedrick, P.W.; Ginera, M.E. and Ewing, E.P., 1976. Genetic polymorphisms in heterogeneous environments. *Ann.Rev.Ecol.Sys.* 17: 535-566.
- Hewitt, G.M., 1979. Orthoptera: Grasshoppers and crickets. *Animal Cytogenetics.* Vol 3. Stuttgart: Gebruder Borntraeger, Berlin, 170
- Heywood, V, H. 1975. Contemporary objectives in Systematics. In G. F. Estabrook, de. *Proceedings of the Eighth International Conference on Numerical Taxonomy.* W.H.Freeman & Co., San Francisco, pags. 258-283.

- Hendy, M. D. y Penny, D, 1982. Branch and Bound algorithms to determine minimal evolutionary trees *Maths. Biosci.* 59:277-290.
- Hillis, D.M., 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 23-42.
- Hunter, L. y Markert, C.L., 1957. Histochemical demonstrations of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294 - 1295.
- Kazan, K; Manners, J.M. and Cameron, D. F. (1992). Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interespecific cross in the genus *Stylosantes*. *Genome*: 37: 244-248.
- Kephart, S.R., 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77: 693-712.
- Kimura, M. y Crow, J. F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725 - 738.
- Kimura, M. y Ohta, T., 1971. Theoretical aspects of population genetics. Princeton Uni. Press. Princeton, New Jersey.
- Kimura, M., 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Kimura, M., 1983. The neutral theory of molecular evolution.
- King, J.L. y Ohta, T., 1975. Polyallelic mutational equilibria. *Genetics* 79: 681-691.
- Kluge, A. G., 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicurates* (*Boidae*, *Serpentes*). *Syst. Zool.* 38: 7-25.
- Kluge, A.G. y Farris, J.S., 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.*, 18: 1-32.

- Lansman, R.A., Avise, J. C., Aquadro, C.F., Shapira, J.F. y Daniel, S.W., 1983. Extensive genetic variation in mitochondrial DNAs among geographic populations of deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. *Evolution* 37: 1-16.
- Lanteri, A. A. 1992. Systematics, cladistics and biogeography of a new Weevil genus, *galapaganus* (Coleoptera: Curculionidae) from the Galapagos islands and coasts of Ecuador and Peru. *Transactions of the Am. Entomol. Soc. of America* 118 (2): 227-267.
- Lanteri, A. A. (1995). La sistemática filogenética y los conceptos de especie. *Mendeliana* 11(1): 37-43.
- Lanteri, A. A. 1989. Análisis comparativo de las escuelas clasificatorias actuales. *Actas I Congr. Arg. Entomol.* 51-60.
- Latorre, A.; Hernandez, C.; Martinez, D.; Castro, J.A. Ramón M. y Moya, A., 1990. Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of *Drosophila subobscura*. *Heredity* 68: 15-24.
- Latorre, A.; Moya, A. and Ayala, F.J., 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 83: 8649-8653.
- Lenney Williams, C., Goldson, S.L., Baird, D.B. & Bullock, D.W. , 1994. Geographical origin of an introduced insect pest, *Listronotus bonariensis* (Kuschel), determined by RAPD analysis. *Heredity* 72: 412-419.
- Le Quense, W. J., 1974. The uniquely evolved character concept and its cladistic application. *Systematic Zoology* 18: 201-205.
- Lewontin, R.C., 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. Col. Univ. Press

- Liebermann, J. (1944). Los Acridoideos de Chile. Rev. Chil. Hist. Nat. 48: 3-158.
- Loray, M.A.; Remis, M.I. and Vilardi, J.C., 1991. Parallel polymorphisms for supernumerary heterochromatin in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera): Effects on recombination and fertility. Genetica 84: 155-163.
- Maniatis, T., Fitch, E. F., Sanbrook, J., 1982. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Mantel, N. A., 1967. The detection of disease clustering and a generalizad regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.
- Marchant, A. 1988. Apparent introgression of mitochondrial DNA across a narrow hibrid zone in the *Caledia captiva* species complex. Heredity 60: 36-49.
- Markert, C. L. y Moller, F., 1959. Multiple forms of enzyme tissue ontogenic and species patterns. P.N.A.S.USA 45: 753 - 763.
- Marshall, D. R. y Brown, H.D., 1975. The change state model of protein polymorphism in natural populations. J. Mol. Evol. 6: 149-163.
- Martinez Carrion, M. y Tiemeier, D. 1967. Biochemistry 6: 1715.
- Matrajt, M; Confalonieri, V. & Vilardi, J.C., 1996. Paralell adaptive patterns of allozyme and inversion polymorphisms on an ecological gradient. Heredity in press.
- May, R.M.; Endler, J.A. and McMurtrie, R.E., 1975. Gene frequency clines in the presence of selection opposed by gene flow. Amer. Natur. 109:659-676.
- Mc.Donald, J.F.,1983. The molecular basis of adaptation: A critical review of relevant ideas and observations. Ann.Rev.Ecol.Syst. 14: 77-102.
- Mc.Donald, J.F.,1986. Repeated patterns

- McPheron, B.; Gasparich, G.E.; Han, H.; Steck, G.J. and Sheppard, W.S., 1994. Mitochondrial DNA restriction map for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Biochemical genetics* 32:(1&2) 25-33.
- Megnengneau, B.; Debets, F y Hoextra, R. F., 1993. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Gen.* 23: 323-329.
- Mickevich, M.J. y Johnson, M.S., 1986. Congruence between morphological and allozyme data in evolutionary inference and character evolution. *Syst. Zool.*25: 260-270.
- Milkman, R., 1978. The maintenance of polymorphisms by natural selection. In *Marine organisms, Genetics: Ecology and Evolution*. Battaglia, B. y Breadmore, J.A. eds. 3-22. Plenum press, New York. Citado por Nevo (1984).
- Miller C.E. 1992. A mediterranean fruit fly risk assesment USDA, APHIS, PPD. Washigton DC.
- Miyamoto, M.M., 1981. Congruence among character sets in phylogenetic studies of the frog genus *Leptodactylus*. *Syst. Zool.* 30:281-290.
- Miyamoto, M.M., 1985. Consensus cladograms and general clasifications. *Cladistics* 1:186-189.
- Moritz, C., Adams, M., Donellan, S., Baverstock, P.R., 1989. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei*. *Genetic diversity among bisexual populations. Copoeia*
- Moritz, C., Dowling, T.E. y Brown, W. M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.
- Nair, P. S., Brncic, D. y Kojima, K. 1971. Isozyme variations and evolutionary relationships in the mesophragmatica species group of *Drosophila*. *Studies in genetics VI. Univ. Texas Publ.* 7103: 17 - 28.

- Nei, M. y Chesser, R., 1983. Estimation of fixation indexes and gene diversities. *Ann.Hum.Genet.* 47: 253-259.
- Nei, M., 1972. Genetic distances between populations. *Amer. Natur.* 106: 283-292.
- Nei, M., 1975. *Molecular population genetics and evolution*. North Holland/American Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York.
- Nei, M., 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.
- Nei, M., 1987. *Molecular evolutionary biology*. Columbia University Press.
- Neiman - Sorensen, A., 1956. Blood groups and breed structure as exemplified by three Danish breeds. *Acta Agriculturae Scandinavica* 6: 115-137.
- Nelson G y Platnick, N., 1993. Three-taxon statements: A more precise use of parsimony?. *Cladistics*
- Nevo, E., Berles, A. y Ben-Shlomo, R. 1984. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates. En G.S. Mani ed. *Evolutionary dynamics of genetic diversity*.
- Nixon, S.E., Taylor, R.J., 1977. Large genetic distances associated with little morphological variation in *Polycelis coronata* and *Dugesia tigrina* (Planaria). *Syst. Zool.* 26:152-164.
- Normark, B.B. y A.A. Lanteri, *en prensa*. A phylogenetic study of the genus *Aramigus* (Coleoptera: Curculionidae: Naupactini), integrating molecular and morphological evidence. *Syst. Biol.* 181.
- Oakeshott, J.G.; Chambers, G.K.; Gibson, J.B. AND Willocks, D.A., 1981. Latitudinal relationships of esterase-6 and phosphoglucosmutase

gene frequencies in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 47: 385-396.

Oakeshott, J.G.; Chambers, G.K.; Gibson, J.B.; Eanes, F. AND Willcocks, D.A., (1983). Geographic variation in *g6pd* and *Pgd* allele frequencies in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 50: 67-72.

Oakeshott, J.G.; Gibson, J.B.; Anderson, P.R.; Knibb, W.R.; Anderson, D.G. AND Chambers, G.K., 1982. Alcohol dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase clines in *Drosophila melanogaster* on different continents. *Evolution* 36: 86-96.

Oakeshott, J.G.; McKechnie, S.W. AND Chambers, G.K., 1984. Populations genetics of the metabolically related *Adh*, *Gpdh* and *Tpi* polymorphisms in *Drosophila melanogaster*. 1. Geographic variation in *Gpdh* and *Tpi* allele frequencies in different continents. *Genetica* 63: 21-30.

Penny, D. y Hendy, M.D. (1986). Estimating the reliability of evolutionary trees. *Mol. Biol. Evol.* 3: 403-417.

Powers, D.A., 1993. A Multidisciplinary approach toward resolving the selectionist/neutralist controversy. Symposium XVII International Congress of Genetics. Birmingham, U.K. Pg. 60.

Powers, D.A.; Ropson, I.; Brown, D.C.; Van Beneden, R., Cashon, R.; Gonzalez-Villaseñor, L.I. AND Dimichele, J.A., 1986. Genetic variation in *Fundulus heteroclitus*: geographic distribution. *American Zoology* 26:131-144.

Remis, M.I. y Vilardi, J.C., 1986. Meiotic behaviour and dosage effect of B-chromosomes on recombination in *Dichroplus elongatus*. (Orthoptera: Acrididae) *Caryologia* 39 n.3-4: 287-301.

Ronderos, R. A. y Cigliano, M. M., 1991. The Andean *Dichroplini*: cladistic analysis with description of *Keyacris* n. gen. and *Ponderacris* n. gen. (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae). *Transactions of the American Entomological Society* 117(3-4): 167-191.

- Ronderos, R.A., 1985. Consideraciones sobre la biogeografía de los Melanoplinae en Sudamérica (Orthoptera: Acrididae). In Proc.3rd Triennial Meeting Pan American Acridid Society .
- Russell, J.R.; Hosein, F.; Johnson, E.; Waugh, R. y Powell, W. 1993. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol. Ecol.* 2: 89-97.
- Sáez, F. A. 1956. Caso extraordinario de un ortóptero acridido con ocho cromosomas diploides y mecanismo sexual XY. *Biologica (Santiago, Chile)* 22: 27-30.
- Sáez, F.A. and Perez Mosquera, G., 1971. Citogenética del Género *Dichroplus* (Orthoptera: Acrididae). En "Recientes Adelantos en Biología". R.Mejia & Moguilevsky (eds.), pp.110-120. Buenos Aires.
- Saidman, B. y Naranjo, C. 1982. Variaciones de esterases en poblaciones de *Prosopis ruscifolia* (Leguminosae). *Mendeliana* 5: 61-70.
- Sanchez, N. E y De Wysiecki, M. L., 1983. Estimación del daño causado por acridios en pasturas naturales: I Reducción de forraje debida a *Dichroplus pratensis* Bruner. *Rev. Soc. Arg. Ent.* 42(1-4): 243-250.
- Schaal, B. y W. Anderson, 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Athens, Georgia. Marine Science Technical Report, Ser 74: 3.
- Shaklee, J.B. y Tamaru, C.S., (1981). Biochemical and morphological evolution of Hawaiian bonefishes (*Albula*). *Syst. Zool.* 30:125-46.
- Shaw, C. R., 1965. Electrophoretic variation in enzymes. *Science* 149: 936-943.
- Shaw, C. y R. Prasad, 1970. Starch electrophoresis of enzymes. A compilation of recipies. *Biochemical Genetics* 4: 279-320.

- Shaw, D.D.; Coates, D.J. and Arnold, M.L., 1988. Complex patterns of chromosomal variation along a latitudinal cline. *Genome* 30: 108-117.
- Singh, R.S. y L.R. Rhomberg, 1987. A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. II Estimates of heterozygosity and patterns of geographic differentiation. *Genetics* 117: 255-271.
- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R., 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. De. Freeman. San Francisco.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J., 1981. *Biometry*, 2nd. edn. W.H. Freeman, San Francisco
- Stone, W.; M. Wheeler; F. Johnson y K. Kojima, 1968. Genetic variation in members of the *Drosophila nasuta* and *Drosophila ananassae* subgroups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 59: 102-109.
- Swofford, D.L. y Olsen, G.S., 1990. Phylogeny reconstruction. En *Molecular Systematics*. Hillis y Moritz eds. Sinauer, Massachusetts, USA.
- Swofford, D.L., 1991, When are phylogeny estimates from molecular and morphological data incongruent? in *Phylogenetic analysis of DNA sequences*.pg. 295-333. Miyamoto & Cracraft Eds.Oxford University Press New York.
- Templeton, A.R., 1981. Mechanisms of speciation: a population genetic approach. *Ann.Rev. Ecol. Syst.* 12:23-48.
- Templeton, A.R., 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution* 37: 221-44.
- Tibayrenc, M.; Neubauer, K.; Barnabe, B.; Guerrini, F.; Skarecky, D. y Ayala, F. J., 1993. Genetic characterization of six parasitic

- protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. P.N.A.S. USA 90: 1335-1339.
- Upholt, W.B., 1977. Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. Nucl. Acids. Res. 4: 1257-1265.
- Vilardi, J.C., 1985. Meiotic behaviour in a population of *Dichroplus elongatus* (Orthoptera: Acrididae). Caryologia 38 n.2: 147-160.
- Vilardi, J.C., 1986. Parallel polymorphisms for interstitial C-bands and B-chromosomes in *Zoniopoda tarsata* (Orthoptera: Romaleidae). Genetica 76: 73-80.
- Vilardi, J.C., 1989. Un programa basic para calcular índices de fijación (F). Mendeliana 9(1):67-68.
- Vilardi, J.C., 1993. Programa Basic para estimar indices de distancia y variabilidad genetica y sus errores a partir de muestras pequenas. Mendeliana
- Waugh, R. y Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvment. Titech 10: 186-191.
- Wayne, R. K., Forman, L., Newman, A. K., Simonson, J. M. y O'Brien, S. J. 1986. Genetic monitors of zoo populations: Morphological and electrophoretis assays. Zoo biology 5: 215-232.
- Weeden, J. F. y Wendel, N. F., 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. En: D. G. Soltis y P.S. Soltis eds. Isozymes in plant biology Cap. 1. 5-45. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Welsh, J. y McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using arbitrary primers. Nucleic Acid Research 18: 7213-7218.
- Welsh, J. y McClelland, M. 1991. Polumorphisms generated by arbitrary primed PCR inthe mouse: application to strain identification and genetic mapping. Nucleic Acid Research 19: 303-306.

- White, M.J.D., 1973. *Animal cytology and evolution* 2nd. edition. Cambridge University Press.
- Wijsmann, E.M. y Cavalli- Sforza, L.L., 1984. Migration and genetic population structure with special reference to humans. *Ann. Rev. Ecol & Syst.* 15: 279-301.
- Wiley, E.O., Siegel-Causey, D., Brooks, D.R. y Funk, V.A., 1991. *The compleat cladist: A primer of phylogenetic procedures.* Special publication 19 The University of Kansas, Museum of Natural History. Lawrence Eds.
- Wilson, A.C., Cann, R. L., Carr, S. L., George, M. Jr., Gyllenster, U. B., Helm-Bychowski, K., Higuchi, R. C., Palumbi, S. R., Prager, G. N., Sage, R. D. y Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26:375-400.
- Williams, J.G.K.; Hanafey, M. K.; Rafalski, J.A. y Tingley, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods enzymol.* 218: 704-740.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. y Tingley, S.V. 1990. Dna polymorphisms amplified by arbitrary markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Woodward, M.; Skibinski, D.O.F. and Ward, R.D., 1992. A study of interlocus allozyme heterozygosity correlations: implications for neutral theory. *Heredity* 69: 190-198.
- Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Ann.Eugen.* 15: 323-354.
- Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.