



El Colegio de la Frontera Sur

Diferenciación genética y demográfica de poblaciones
de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) en
México.

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de
“Maestra en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural”

Por

Mayra Carolina Molina Nery

2011

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Diagnósis taxonómica.....	5
2.2. Descripción morfológica	5
2.3. Ciclo de vida	6
2.4. Distribución y hospederos	8
2.5. Flujo Genético.....	9
2.6. Diversidad Genética	12
2.7. Demografía.....	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo general.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. HIPOTESIS	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Sitios de colecta.....	16
5.2. Muestreo.....	18
5.3. Parámetros genéticos.....	18
5.4. Análisis de Datos	19

5.5. Parámetros demográficos.....	21
5.6. Análisis de Datos	23
6. RESULTADOS	23
6.1. Diversidad genética	23
6.2. Estructura y Flujo Genético	28
6.3. Supervivencia	32
7. DISCUSIÓN.....	37
AGRADECIMIENTOS	43
LITERATURA CITADA	43

Índice de figuras

Figura 1.	Adulto de <i>Anastrepha ludens</i> (Loew)	6
Figura 2.	Abdomen y ovipositor de <i>A. ludens</i>	6
Figura 3.	Larva de la mosca de la fruta	6
Figura 4.	Ciclo de vida de <i>A. ludens</i>	7
Figura 5.	Caracterización fitosanitaria de las moscas de la fruta	9
Figura 6.	Análisis de regresión de la heterocigosidad esperada (H_e) de poblaciones de <i>A. ludens</i> contra la temperatura y altitud	26
Figura 7.	Agrupación de poblaciones de <i>A. ludens</i> por medio de UPGMA	28
Figura 8.	Flujo genético (Nm) entre poblaciones de <i>A. ludens</i>	30
Figura 9.	Análisis de regresión del logaritmo natural del flujo genético (Nm) contra el logaritmo de la distancia geográfica (Km) entre pares de poblaciones(A). La distancia genética contra el logaritmo de la distancia geográfica (Km) entre pares de poblaciones (B).	31
Figura 10.	Supervivencia de <i>A. ludens</i> en cada uno de sus estados biológicos. A) Generación Parental, B) Filial 1	34
Figura 11.	Índice de supervivencia global de la Generación Parental en comparación a la Generación Filial 1	35
Figura 12.	Relación entre: A) Supervivencia y H_e y B) Supervivencia y H_o (no significativas)	36

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Caracterización de los sitios de colecta de <i>A. ludens</i> en la República Mexicana.....	17
Cuadro 2.	Enzimas reveladas en poblaciones de <i>A. ludens</i> procedentes de siete estados de la República Mexicana.....	24
Cuadro 3.	Estimadores de diversidad genética de poblaciones de <i>Anastrepha ludens</i> en México. % <i>P</i> , porcentaje de polimorfismo; <i>H_o</i> , heterocigosidad observada; <i>H_e</i> , heterocigosidad esperada bajo el supuesto de Equilibrio de Hardy-Weinberg. <i>F</i> , índice de fijación ($F=1- H_o / H_e$).....	24
Cuadro 4.	Índice de diversidad genética de Shannon (Shannon y Weaver 1949) de siete poblaciones de <i>A. ludens</i> de México.....	25
Cuadro 5.	Valor de χ^2 (Chi-square) para probar Equilibrio de Hardy Weinberg en loci isoenzimáticos de poblaciones de <i>Anastrepha ludens</i>	27
Cuadro 6.	Estadísticos <i>F</i> 's de Wright para evaluar la diferenciación genética de poblaciones de <i>Anastrepha ludens</i> procedentes de siete estados de la República Mexicana.....	29
Cuadro 7.	Flujo genético (<i>Nm</i> , arriba de la diagonal) entre pares de poblaciones de <i>A. ludens</i> procedentes de siete estados de la República Mexicana. Bajo la diagonal distancias geográficas por pares poblacionales.....	29

Cuadro 8.	Número probable de organismos que son posibles inmigrantes con base en un análisis de asignación multilocus IMMANC. Los renglones son la población receptora de inmigrantes y las columnas la población de origen de los inmigrantes. Los inmigrantes pueden ser de más de un origen por lo que la suma de emigrantes no corresponde al total de inmigrantes.....	32
Cuadro 9.	Agrupación Tukey para 4 etapas de desarrollo de <i>A. ludens</i> durante la Generación Parental.....	33
Cuadro 10.	Agrupación Tukey para 4 etapas de desarrollo de <i>A. ludens</i> durante la generación Filial 1.....	33

RESUMEN

En este trabajo se estimó la variación aloenzimática y demográfica, y el flujo genético entre poblaciones de *Anastrepha ludens* en siete estados de la república (Chiapas, Durango, Morelos, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán) para reconocer el grado de conexión o aislamiento entre poblaciones separadas geográficamente. En cada estado se colectaron frutos de *Citrus* spp. infestados con larvas de *A. ludens*, una vez que se obtuvieron las pupas se enviaron al laboratorio de Sexado Genético-Programa MOSCAFRUT en Metapa de Domínguez, Chiapas. Se realizó el análisis genético con ejemplares adultos de cada población. Se estimó la variación aloenzimática en seis loci y el grado de diferenciación genética entre poblaciones y flujo genético (Nm). Mediante un análisis de asignación de genotipos multilocus se estimó el número probable de individuos inmigrantes. La heterocigosidad esperada (H_e) varió de 0.199 a 0.330, el polimorfismo (P) entre 50 y 66%. La diferenciación genética entre poblaciones fue de $F_{ST}=0.09$. El flujo genético (Nm) entre pares de poblaciones varió entre 0.8 y 37 individuos por generación y fue negativamente asociado con la distancia geográfica lineal que separa las poblaciones. El análisis de asignación multilocus reveló un patrón de flujo asimétrico entre poblaciones. Para el análisis demográfico se mantuvieron grupos de 50 parejas de adultos en jaulas a 24°C, durante dos generaciones. Se tomaron muestras de los huevecillos ovipositados a partir de estos se registró la supervivencia en cada uno de los diferentes estados fisiológicos (H-L, L1 a L3, L3-P, P-A). La supervivencia de la población de Morelos fue mayor y significativamente diferente al resto de las poblaciones en la generación parental. En la generación F1 las poblaciones de Chiapas y Durango alcanzaron los valores más altos

de supervivencia y fueron significativamente diferentes al resto de las poblaciones. No se encontró relación entre la heterocigosidad (H_e) y la supervivencia. Se discute la implicación que estos resultados pueden tener sobre las acciones de manejo de la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta.

Palabras Clave: Moscas de la fruta, flujo genético, isoenzimas, supervivencia

1. INTRODUCCIÓN

De las 30 especies del género *Anastrepha* (Familia Tephritidae) que están registradas en México, *Anastrepha ludens* (Loew) es la especie de más amplia distribución; se le conoce comúnmente como la mosca mexicana de la fruta ya que se le considera nativa de este país.

En México *A. ludens* representa un problema fitosanitario, ya que es una plaga de importancia cuarentenaria en la actividad frutícola en el cultivo de la naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) y el mango (*Mangifera indica* L.; Celedonio-Hurtado et al. 1988, Hernández-Ortíz 1992, Aluja et al. 1999, SENASICA 2009), por lo que en la Norma Oficial Mexicana NOM-023-1995 se señalan los procedimientos de control y medidas para el transporte de fruta de una región infestada a una área libre de *A. ludens* (Gutiérrez 2003, SENASICA 2009). Dicha Norma indica las estrategias de combate, entre ellas están las medidas de tipo cultural y biológico. Las medidas de tipo cultural se realizan actividades como la recolecta de frutos antes y después de cada cosecha comercial y su eliminación. Las de control biológico se basan en la cría y liberación de parasitoides en plantaciones o huertos en donde potencialmente se encuentra la plaga, y la Técnica del Insecto Estéril (TIE), que consiste en la liberación de insectos criados en laboratorio, y esterilizados mediante irradiación (utilizando una fuente de Cobalto 60 en un irradiador modelo Gamma beam 127(GB.-127) a 80 Grey), que al aparearse con hembras silvestres se inhibe su reproducción (Gutiérrez 2003).

Para el diseño y mejoramiento de estos métodos de control es necesario profundizar en el conocimiento sobre la biología de la especie de interés (Roderik 1996,

Liedo et al. 2009). Dentro de este conocimiento está el determinar su diversidad genética y su estructura poblacional (Aluja et al 1999, Aluja y Mangan 2008). El análisis de los patrones de diversidad, de flujo genético y la variación en los parámetros demográficos de *A. ludens* puede dilucidar el grado de diferenciación entre poblaciones de *A. ludens*, e inferir a través de métodos de estimación indirectos los factores ecológicos, biológicos, ambientales y antropogénicos que los afectan. La diversidad genética (H_e), flujo genético (Nm) y los parámetros demográficos pueden variar en función de factores ambientales, de la historia geográfica del sitio ocupado, de las distancias geográficas entre las poblaciones, de la capacidad de dispersión de los organismos y de los procesos macro y micro evolutivos (Carey 1982, Celedonio-Hurtado et al. 1988, Groom et al. 2006, Hendrichs 1993, Krainacker et al. 1987, Liedo et al. 1992, Pérez 1987, Sivinski 1993, Vargas et al. 1997).

La amplia gama de condiciones ambientales en las que *A. ludens* puede habitar (de zonas templadas hasta zonas cálidas) y la capacidad de utilizar como hospederos a diferentes especies con escasa relación taxonómica, sugiere que su potencial evolutivo es amplio, lo cual puede llegar a ser una dificultad para el control de sus poblaciones. El potencial evolutivo de una especie se relaciona estrechamente con la cantidad de variación genética de sus poblaciones, entre más variación genética presenten mayor será la respuesta hacia los cambios ambientales (Hoy 2003, Dávila et al. 2005), naturales o inducidos por el humano (Hansky y Gaggiotti 2004). Las tasas y dirección del flujo genético entre poblaciones pueden proporcionar una estimación de la capacidad de dispersión y colonización de nuevas áreas geográficas, siempre y cuando se cuente con la presencia de al menos una de las plantas huésped. El origen

geográfico de nuevas infestaciones podría ser especificado, ya que se podría localizar zonas potenciales de infestación, lo que ayudaría a diseñar medidas de control y cuarentenarias (Vilardi et al. 1990, Krafur 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1. Diagnósis taxonómica

Reino: Animalae

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Tephritidae

Género: *Anastrepha*

Especie: *Anastrepha ludens* (Loew)

2.2. Descripción morfológica

El adulto de *A. ludens* mide cerca de 1.0 cm. Es de color naranja-amarillo, con dos a tres rayas blanquizcas a lo largo del tórax. Las alas son de color claro. La banda en forma de "V" invertida ubicada en la parte apical del ala se interrumpe en la curvatura. La hembra se distingue por tener un ovipositor delgado y más largo que el abdomen (Figura 1 y 2), y lo utiliza para depositar sus huevos debajo del epicarpio de la fruta del huésped. El macho carece de ovipositor. La larva carece de patas, varía en color entre blanco a blanco amarillento y crece hasta 1.0 cm. dentro de la fruta del huésped (Figura 3) (Hernández-Ortíz 1992).



Figura 1. Adulto de *Anastrepha ludens* Loew (Dibujo de Foote 1980, en Aluja 1994).

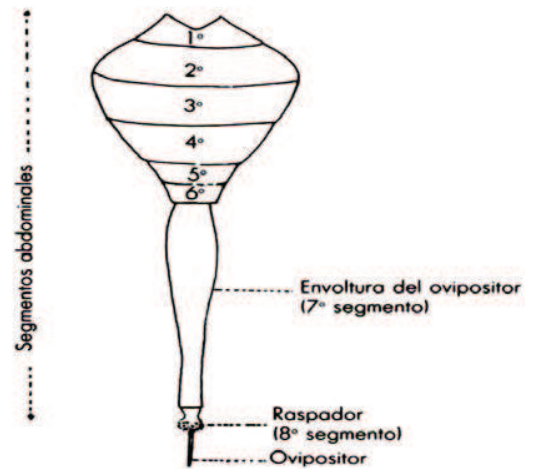


Figura 2. Abdomen y ovipositor de *A. ludens* (Dibujo de Foote 1980, en Aluja 1994).

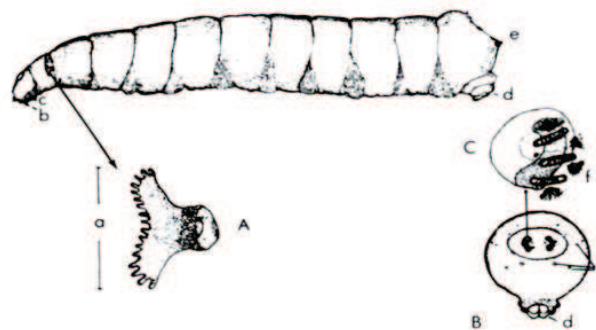


Figura 3. Larva de mosca de la fruta, se muestran diversos caracteres morfológicos distintivos. A= Espiráculo anterior: a) dígitos; b) mandíbulas c) carinas. B= Segmento caudal; vista frontal; d) lóbulos anales; e) tubérculos C= Espiráculo posterior: procesos interespiraculares (Dibujo de Foote 1980, en Aluja 1994).

2.3. Ciclo de vida

La mosca mexicana de la fruta tienen una metamorfosis completa (holometábola), es decir, atraviesan por cuatro estados biológicos diferenciados: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 4). *A. ludens* oviposita sus huevecillos en el interior del fruto, ya sea en forma individual o en grupos de hasta 18 por ovipostura (Díaz-Flescher y Aluja 2003). Días después (2 a 5 días en función de la temperatura), eclosionan las larvas, las que

se alimentan de la pulpa del fruto ocasionando su pérdida por destrucción (Aluja y Mangan 2008).

Las larvas pasan por tres estadios dentro del fruto y puede requerir entre 12 y 16 días aproximadamente, para completar su desarrollo dependiendo de las condiciones ambientales (Pérez 1987). El fruto cae y las larvas, ya en tercer estadio, salen del fruto, se entierran y pupan; posteriormente emergen los adultos. Pérez (1987) encontró que el período de pupa bajo condiciones de laboratorio varía entre 15 y 20 días). Los adultos recién emergidos requieren normalmente de 6 a 14 días para madurar. Los adultos viven en promedio 71 días, aunque algunos llegan a vivir hasta 233 días (Liedo et al 1992, Carey et al 2005). (Christenson y Foote 1960, Bateman 1972, Aluja 1994 Bajo condiciones óptimas esta especie puede completar de 4 a 8 generaciones por año.

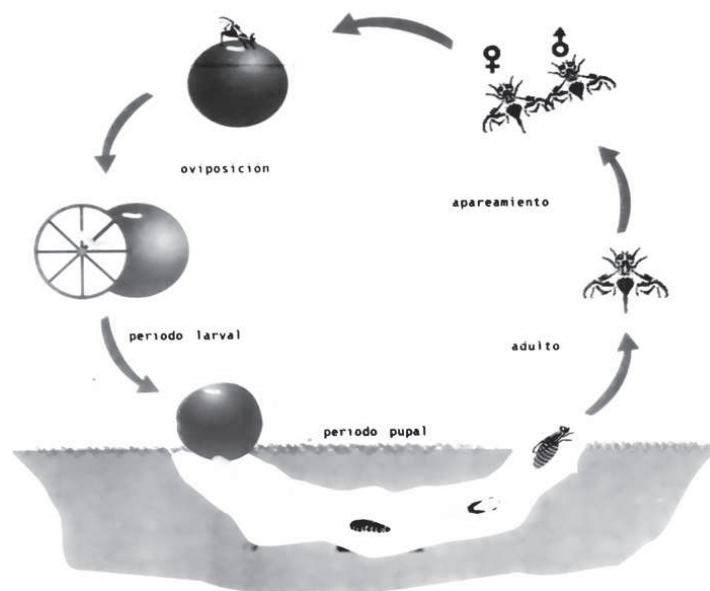


Figura 4. Ciclo de vida de *A. ludens* (CESV, 2005).

2.4. Distribución y hospederos

Anastrepha ludens tiene una distribución que va desde el sur de Estados Unidos de América hasta Costa Rica. En México su presencia se ha registrado en la mayor parte de los Estados (SENASICA, 2009).

Para la Campaña Nacional de Moscas de la Fruta, el territorio Nacional se divide básicamente en tres zonas fitosanitarias: (1) zona libre de moscas, (2) zona de baja prevalencia y (3) zona bajo control fitosanitario (en donde las moscas se presentan en tamaños poblacionales más grandes). Durango es uno de los estados que cuentan con 32 municipios libres y los demás están caracterizados como de baja prevalencia. San Luis Potosí cuenta con 21 libres, 17 en baja prevalencia y el resto (22) bajo control fitosanitario, Tamaulipas cuenta con 27 municipios en baja prevalencia y el resto bajo control fitosanitario. Los otros cuatro estados (Chiapas, Yucatán, Morelos, y Veracruz) están categorizados de “bajo control fitosanitario”. Estas categorías presuponen un manejo diferenciado de las moscas de acuerdo a la categoría, y se permite la movilización de frutas sólo entre zonas que estén en la misma categoría (Figura 5; SENASICA 2009).

En México para *A. ludens* se reconocen 22 plantas hospederas, las especies huésped nativas son *Sargentia greggii* S. Watson y *Casimiroa edulis* Llave & Lex, ambos de la familia Rutaceae y entre las especies asociadas recientemente destacan diversas especies o variedades cultivadas de *Citrus*, dentro de la misma familia Rutaceae, pero también se desarrolla en especies de otras familias de plantas

cultivadas como *Mangífera indica* L. de la familia Anacardiaceae (Hernández-Ortíz 1992).



Figura 5. Caracterización fitosanitaria de las moscas de la fruta (SENASICA 2009).

2.5. Flujo Genético

La diferenciación genética entre poblaciones debidas a la selección natural u otros factores, es disminuida por la tasa de flujo genético. El flujo genético afecta la diferenciación por la constante incorporación de alelos de otra población, lo cual depende del patrón de desplazamiento de los organismos y de su capacidad para superar las barreras biológicas, geográficas y ecológicas. Hay un flujo genético importante entre las poblaciones cuyo patrón está mediado parcialmente por la distancia geográfica que separa a las poblaciones. El aislamiento por distancia

establece que a mayor distancia geográfica mayor diferenciación genética (Rousset 1997, Slatkin 1994).

La estimación del flujo genético en animales puede efectuarse a través de métodos directos e indirectos. Las estimaciones directas se basan en el conocimiento de los patrones de dispersión (movimiento de individuos entre poblaciones), e incluye el reconocimiento de la fase de crecimiento (etapa adulta en *A. ludens*) en la cual se presenta la dispersión. La desventaja es que la estimación está limitada por la escala geográfica; es difícil obtener información sobre dispersiones o movimiento de los individuos a largas distancias (Slatkin 1985 y 1994).

Las estimaciones indirectas se basan principalmente en el comportamiento de las frecuencias alélicas que se obtienen usando algún tipo de marcador molecular. Dependiendo del marcador y de la forma de muestrear los alelos se pueden identificar relaciones genéticas parentales que sugieren el movimiento de genes entre poblaciones (Slatkin 1994, Hedrick 1997). Para estimar el flujo genético de manera indirecta se emplean los estadísticos F , los cuales asumen una población homogénea (T) y llega a ser subdividida (S) hasta el nivel de individuo (I). Dicho de otro modo reparte la variación genética a nivel de individuo, subpoblación y población total. Se trata de una estimación de la probabilidad de que dos alelos sean idénticos por descendencia (Perse y Crandall 2004), por lo que también son estimadores de la endogamia a diferentes niveles jerárquicos F_{ST} (subpoblación), F_{IT} (población total), F_{IS} , (individuos dentro de una población). Estos estimadores están interrelacionados por la siguiente función:

$$1-F_{IT}=(1-F_{ST})(1-F_{IS}).$$

F_{ST} es especialmente importante ya que sugiere el nivel de diferenciación entre poblaciones cuyo valor puede ser alterado por la tasa de flujo genético (Hedrick 1997, Slatkin 1985).

Estos estadísticos pueden ser expresados en términos de las frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas observadas y esperadas (Hartl y Clarck 1997, Hedrick 1997). La F_{ST} puede ser modificada por el número de individuos que se dispersa por generación (Nm) de la siguiente forma:

$$Nm = 1 - F_{ST} / 4F_{ST} \text{ (Hartl y Clarck 1997, Hedrick 1997, Slatkin 1994);}$$

y Nm puede ser interpretado como la tasa de flujo genético que ocurre entre pares de poblaciones (Hedrick 1997, Slatkin 1994).

En los estudios que se han hecho para estimar el flujo genético usando métodos indirectos se ha podido identificar los patrones y las barreras o las condiciones que lo facilitan. En el caso de plantas (Lestani et al. 2005) y en insectos como en *Stegomyia aegypti* L., mosquito vector de la fiebre amarilla (Su et al. 2003), se reconoció la existencia de barreras físicas que impiden el flujo genético entre poblaciones. En algunos casos el alto flujo genético puede promover el mantenimiento de altos niveles de diversidad genética en una especie e implica un aporte constante de genes en una población. Para el caso de especies plaga, presentar altos niveles de diversidad genética puede ser en parte la razón de porqué pueden superar las estrategias de control (Dávila et al. 2005).

En la actualidad el análisis de los patrones de diversidad y de flujo genético pueden ser analizados utilizando marcadores genéticos como las isoenzimas, las cuales son marcadores co-dominantes, y los perfiles producidos permiten derivar parámetros genéticos confiables para estimaciones del nivel de diversidad y grado de diferenciación genética (Hillis et al. 1996). La diversidad y estructura genética de las poblaciones es determinada por la selección natural, por el movimiento diferencial de individuos entre poblaciones, por el tipo de reproducción y por eventos aleatorios (demográficos y ambientales). Dependiendo de la intensidad de cada factor y de la forma que interaccionan será el nivel de diversidad genética y de cómo ésta se distribuye dentro y entre poblaciones (Slatkin 1994, Hedrick 1997, Groom et al. 2006).

2.6. Diversidad Genética

La estimación de la diversidad se basa en la frecuencia promedio de individuos heterocigotos observados (H_o) para diferentes loci moleculares o fenotípicos y su relación con la frecuencia de heterocigotos esperados (H_e) bajo los supuestos del Equilibrio de Hardy Weinberg (EWH), que son tamaño de población grande, apareamiento aleatorio, nula tasa de mutación, ausencia de selección; y que sólo el flujo altera el equilibrio.

Los estudios de genética de poblaciones con especies de Tephritidae muestran un intervalo amplio de heterocigosidad esperada (H_e). Por ejemplo la estimación realizada a partir del análisis isoenzimático de heterocigosidad para la mosca del Mediterráneo (*Ceratitits capitata* Wied) fue entre $H_e=0.005$ y $H_e= 0.186$ (Huettel et al. 1980, Gasperi et al. 1987, Vilardi et al. 1990), esta variación se atribuye al origen

geográfico de las poblaciones estudiadas. En *Bractocera oleae* (Gmelin) se encontraron valores de H_e entre 0.078 y 0.136 (Ochando y Reyes 2000) atribuido a la diferenciación en prácticas agrícolas. Los estudios genéticos con poblaciones de *A. ludens* de Chiapas, indican que existen considerables niveles de variación genética ($H_e = 0.447-0.410$), cuyo mantenimiento y estructura puede estar relacionada con la distancia que separa a las poblaciones (Verónica-Vallejo et al. 2006, Cancino 2007). El hospedero promueve una diferenciación genética considerable entre las poblaciones de *A. ludens*, especialmente de naranja (*Citrus sinensis*) y mango (*Mangifera indica*) (Cancino 2007).

2.7. Demografía

Se ha documentado que el tipo de hospedero influye en algunos parámetros demográficos como la fecundidad, supervivencia, desarrollo larval y adulto (Carey 1982, Celedonio-Hurtado et al. 1988, Hendrichs 1993, Krainacker et al. 1987, Liedo et al. 1992, Pérez 1987, Sivinski 1993, Vargas et al. 1997). En *C. capitata* el hospedero en donde se desarrolla la larva afecta la supervivencia, fecundidad y fertilidad (Carey 1982, Krainacker et al. 1987).

Se han comparado los parámetros demográficos de poblaciones silvestres y de poblaciones adaptadas a laboratorio en varias especies. En general, las poblaciones adaptadas a condiciones de laboratorio presentan menores tiempos de desarrollo, mayores tasas de sobrevivencia y de fecundidad, o que se traduce en mayores tasas de crecimiento poblacional (Liedo et al 1992).

En *Anastrepha obliqua* Macquart, se ha observado que las poblaciones silvestres provenientes de *Spondias mombin* L. (jobo) durante el proceso de adaptación a

laboratorio pasan por un cuello de botella que se presenta de la generación uno a la tres; en atributos como esperanza media de vida, tasa intrínseca de crecimiento y tiempo generacional. Después de 113 generaciones en laboratorio no se tienen variaciones significativas, esto debido a la capacidad de adaptación de estas moscas (Hernández et al. 2009, Liedo et al. 1992). En el caso de *Anastrepha serpentina* (Wiedemann), después de la generación cuatro se apreció un aumento gradual en los indicadores de atributos biológicos (número de huevos por hembra, porcentajes de eclosión, porcentajes de pupación y emergencia de adultos) estabilizándose a partir de la séptima generación, como parte de una favorable adaptación a condiciones de laboratorio (Pinson et al. 2006). En *Anastrepha striata* (Schiner) se han evaluado fecundidad y longevidad, la respuesta en estos parámetros se ha relacionado a la elección que hace la hembra del macho con el que se aparea y a las dietas que consume el macho elegido (Pérez-Staples y Aluja 2004). Los parámetros demográficos parecen ser resultado de la elección del tipo de hospedero, las condiciones ambientales, la historia evolutiva reciente y al comportamiento de apareamiento (Carey 1982, Liedo et al. 1992, Hernández et al. 2009, Pérez-Staples y Aluja 2004)

En estudios comparativos de poblaciones silvestres en *A. ludens*, se ha sugerido que la tasa intrínseca de crecimiento podría depender del hospedero en el que se desarrolla la mosca (Celedonio-Hurtado et al. 1988, Liedo et al. 1992). La irradiación afecta la esperanza media de vida, ya que las moscas irradiadas tienen una esperanza de vida de 3 días para machos silvestres y 2 días para machos de laboratorio después de ser liberados en campo (con 5 días de edad) y basados en un sistema de recapturas en trampas McPhail (Hernández et al. 2007). Estos mismos atributos han sido

evaluados en líneas mutantes de *A. ludens*, desarrolladas bajo condiciones de laboratorio (Quintero et al. 2009).

El propósito de este estudio fue caracterizar la variación genética y demográfica entre poblaciones de *A. ludens* procedentes de siete estados de la República Mexicana (Chiapas, Yucatán, Morelos, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas y Durango), específicamente se estimó (1) la diversidad genética de las siete poblaciones (2) la tasa de flujo genético y su asociación con la distancia geográfica entre pares de poblaciones, (3) la variación en el índice de supervivencia de estados inmaduros, y (4) si hay relación entre la diversidad genética (H_e) y el índice de supervivencia de las poblaciones.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Determinar la variación genética y demográfica entre poblaciones de *A. ludens* de siete estados de la República Mexicana (Chiapas, Yucatán, Morelos, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas y Durango).

3.2. Objetivos específicos

1. Estimar la diversidad genética y flujo genético de siete poblaciones de *A. ludens* y su asociación con la distancia geográfica.
2. Estimar la variación del índice de supervivencia en siete poblaciones de *A. ludens*.
3. Evaluar la correlación entre la variación genética y el índice de supervivencia de

las poblaciones.

4. HIPOTESIS

Las poblaciones de *A. ludens* en México son genética y demográficamente variables. La estructura poblacional se ajusta a un modelo de aislamiento por distancia por las capacidades de movimiento de *A. ludens*, así como los factores que pudieran estar actuando como barreras del flujo de genes.

Se espera encontrar alta variabilidad genética y baja diferenciación genética entre poblaciones de *A. ludens* debido a la alta capacidad de colonización de nuevos hospederos y hábitat de ésta especie.

Se observará menor variación genética en los individuos de poblaciones que presenten alto grado de aislamiento y por lo tanto flujo genético limitado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Sitios de colecta

Se colectaron frutos de *Citrus sinensis* L. Osbeck, *C. paradisi* Makfad y *C. aurantium* L. infestados de *A. ludens* en Chiapas, Yucatán, Morelos, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas y Durango; durante los meses de septiembre 2008 a enero del 2009. Las localidades difieren en clima, en temperatura promedio anual y altura sobre el nivel del mar. El Cuadro 1 muestra las características de cada uno de los sitios de colecta. Las distancias entre los sitios de colecta fueron de 152.5 km a 1569.47 km.

Cuadro 1. Caracterización de los sitios de colecta de *A. ludens* en la República Mexicana.

Estado	Municipio	Sitios de colecta	Hospedero	Clima	Temperatura	Vegetación	Precipitación	Coordenadas en decimales
Chiapas	Comitán	Comitán, Tzimol	<i>Citrus aurantium</i>	Templado-subhúmedo	*17.6	Pino-encino	*1660	-92.134, 16.251
Morelos	Ocuituco	Tlacoatepec, Ocuituco	<i>Citrus sinensis</i>	Semicálido	*15.7	Pino-encino	*1920	-98.773, 18.872
Yucatán	Hunucmá	Hunucmá	<i>Citrus aurantium</i>	Cálido-semiseco	*25.5	Selva baja caducifolia	*8	-89.899, 21.026
Veracruz	Temapache	Sombrerete, Camelia, Nuevo Jalisco, Moralillo	<i>Citrus aurantium</i> , <i>C. paradisi</i>	Cálido-extremoso	*22.4	Selva mediana perennifolia	*40	-97.639, 21.065
San Luis Potosí	Axtla de Terrazas	Casas viejas	<i>Citrus paradisi</i>	Semicálido-húmedo	*22.5	Selva mediana y pastizal	*100	-98.875, 21.438
Tamaulipas	Villa de Guémez	Guémez	<i>Citrus sinensis</i>	Cálido-semiseco	*19.7	Bosque caducifolio y matorral alto	*145	-99.007, 23.919
Durango	Pueblo Nuevo	La Presa, Pie de Cuesta	<i>Citrus aurantium</i> y <i>Citrus paradisi</i>	extremoso	*14.6	espinoso	*2500	-108.385, 27.462

Fuente: * CONABIO, INAFED

5.2. Muestreo

Se colectaron aleatoriamente frutos infestados con larvas del tercer estadio de *A. ludens*. Los frutos fueron trasladados al laboratorio local (Laboratorios de las Juntas Locales), se recuperaron las larvas próximas a pupar y éstas se colocaron en vermiculita para promover su pupación. El material biológico en estado de pupa fue enviado de los diferentes sitios de colecta al Laboratorio de Sexado Genético de la Planta MOSCAFRUT, en Metapa de Domínguez, Chiapas, en donde se mantuvieron en un ambiente de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y Humedad Relativa (HR) de $70\% \pm 5$ hasta la emergencia de los adultos.

5.3. Parámetros genéticos

Cuando los adultos cumplieron 15 días de edad, se eligieron al azar 40 individuos (20 machos y 20 hembras) de cada población, se colocaron en viales y se conservaron a una temperatura de -70°C en ultracongelador hasta la realización de la electroforesis horizontal. Fueron analizados seis loci enzimáticos como marcadores genéticos (Cuadro 2), que se evidenciaron en acetatos de celulosa (Herbet y Beaton 1994). Cada individuo adulto se maceró en $250 \mu\text{l}$ de una solución extractora CAAMP pH 7.0 (concentraciones para un litro: 10.5 gr de ácido cítrico y 12.5 ml de 4-(3-aminopropyl) morpholyne) y se centrifugó a 13,000 rpm (Eppendorf, centrifuga 5415D max: 13200 rpm) durante 3 minutos; el sobrenadante fue recolectado y usado para realizar la separación de las enzimas por electroforesis en acetatos de celulosa.

Los corrimientos de las enzimas se llevaron a cabo en condiciones de temperatura ambiente, a 55 V y 30 mA durante 150 minutos. Con base en el patrón de tinción se reconocieron los loci (6) y el número de alelos (entre dos y tres) de cada genotipo para cada enzima.

5.4. Análisis de Datos

Se estimaron los porcentajes de polimorfismo y las frecuencias genotípicas y alélicas para cada población a partir de la información obtenida en los corrimientos aloenzimáticos. Las frecuencias genotípicas se probaron de acuerdo al equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) mediante una prueba de χ^2 . Se calculó la heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) de las poblaciones, así como el índice de Shannon por loci como medidas de diversidad genética y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) del índice de diversidad de Shannon para determinar diferencias entre poblaciones. Se estimó la relación entre la diversidad genética (H_e) con la temperatura media anual y la altitud mediante regresiones lineales; previa transformación \log_{10} de la altitud para reducir la variación.

Para determinar el grado de similitud genética entre las poblaciones se usó un análisis de agrupación (UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) con base en una matriz de distancias genéticas de Nei (1972). La diferenciación entre poblaciones se estimó a través de los estadísticos F 's de Wright (Hedrick 1997, Weir y Cockerham 1984) a diferentes niveles jerárquicos F_{ST} (subpoblación), F_{IT} (población total), F_{IS} , (individuos dentro de una población). La descripción genética y los análisis se

realizaron con el programa Tools For Genetic Populations Analysis (TFPGA; Miller et al. 1997).

La estimación de las tasas de flujo genético entre pares de poblaciones se realizó calculando el nivel de diferenciación entre pares de poblaciones y estimando el número de individuos que se mueven entre pares de poblaciones con la fórmula de Wright: $Nm = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$ (Hedrick 1997), donde Nm es considerado como el número de individuos que se mueven entre pares de poblaciones. Para analizar la relación de las variables flujo genético y distancia entre pares de poblaciones se hizo una correlación entre Nm contra el logaritmo de la distancia geográfica en km (Slatkin 1994).

Finalmente, el flujo genético se estimó calculando la probabilidad de que un genotipo multilocus fuera producido por padres de la población en la que fue colectada y de que se obtenga de padres de una población distinta, mediante el análisis de asignación IMMANC de Rannala y Mountain (1997). El valor crítico de asignación es el \ln del cociente de la probabilidad de que el genotipo de un individuo sea de la población en la que se colectó y la probabilidad de que se produzca en una población distinta:

$$\ln A = \ln P_c - \ln P_i,$$

Donde P es la probabilidad de que el genotipo multilocus en consideración se haya formado en la población de colecta (c) o en otra población (i). Un valor negativo de $\ln A$ indica que es altamente probable que un genotipo multilocus dado sea derivado de una población distinta a la de colecta (Rannala y Mountain 1997, Bonizzoni et al. 2001).

De esta manera se obtuvo para cada población el número de organismos que son inmigrantes y de qué población provienen.

5.5. Parámetros demográficos

Una vez que emergieron los adultos se colocaron en jaulas (50 parejas por jaula). Las jaulas consistieron en recipientes de plástico con dimensiones de 25 x 12 x 12cm, adecuando en uno de sus lados una perforación cubierta con tela de color blanco y mesh de 1 x 1mm.

Las moscas fueron alimentadas con una mezcla de azúcar y proteína hidrolizada, proporción 3:1, el agua fue suministrada en papel filtro insertado en un recipiente de plástico. A los 10 días de haber colocado los adultos en las jaulas (tiempo requerido para alcanzar la madurez sexual), se les colocaron como dispositivos de oviposición esferas de fucellerone (Zepeda-Cisneros et al. 2007) en el interior de la jaula sobre el piso, para coleccionar los huevecillos diariamente durante 5 días consecutivos. Las esferas fueron remplazadas cada 24 horas, las esferas extraídas fueron disectadas para obtener los huevecillos ahí depositados.

Para determinar la eclosión se tomaron tres muestras de 100 huevecillos cada una, los cuáles fueron alineados sobre papel filtro y tela raso negra que se colocaron dentro de cajas Petri. Se incubaron a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 70 a 80% HR. Siete días después se contó el número de coriones vacíos para estimar los porcentajes de eclosión (supervivencia de huevecillos). Los huevos no alineados fueron utilizados para iniciar nuevas poblaciones. Los huevecillos no alineados se mantuvieron por cuatro días en las mismas condiciones que los alineados, después de este tiempo las larvas

emergidas (primer estadio larval) de cada población se colocaron en contenedores de 7cm cm de diámetro por 8cm cm de altura con dieta larvaria (MOSCAFRUT 2010), 100 larvas por contenedor (tres contenedores). Después de 10 días se revisaron los contenedores y se registró el número de larvas que alcanzaron el tercer estadio larval (supervivencia larval del 1er al 3er estadio) y se separaron de la dieta y se colocaron en vermiculita para inducir la pupación. A los 14 días se revisaron y las pupas formadas se colocaron en jaulas de 10 x 10 x 10cm con tres de los lados forrados de malla y la base de madera, para la emergencia de adultos.

Se registró el número de larvas que puparon y el número de pupas de donde emergieron adultos para estimar los porcentajes de supervivencia. Este procedimiento se llevó a cabo durante dos generaciones en condiciones de temperatura y humedad de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $70\pm 5\%$, respectivamente.

También se estimaron índices de supervivencia para cada población (Stiling 2002). La supervivencia de los huevos (H-L) se estimó por la eclosión en las cajas de Petri. Para la etapa L1-L3 (larva del 1er estadio a larva del 3er estadio), la supervivencia fue estimada a partir de la recuperación de larvas del 3er estadio, para la etapa L3-P (larva del tercer estadio a pupa), a partir de la recuperación de larvas que puparon por cada unidad experimental, y para la etapa P-A (pupa a adulto) a partir de la emergencia por cada jaula. Se calculó el índice de supervivencia de cada estado biológico (H-L, L1-L3, L3-P y P-A); y también se obtuvo la supervivencia global desde la etapa de H-L hasta P-A.

5.6. Análisis de Datos

Para determinar las diferencias en supervivencia entre poblaciones se hizo un análisis de varianza unifactorial (cuyo factor fue población), y pruebas de Tukey de comparación múltiple de medias para la generación parental (GP) y filial 1 (F1). Para realizar los análisis se utilizó el programa estadístico SPSS v.11.5 (Fernández J. M. 2004). Las diferencias en el índice de supervivencia global entre GP y F1 se realizó mediante una prueba de t-Student (Sokal y Rohlf 1995). Finalmente para detectar si hubo o no una relación entre la variación genética (H_e) y el índice supervivencia global, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre dichas variables con el programa estadístico SPSS v.11.5.

6. RESULTADOS

6.1. Diversidad genética

Dos de los seis loci examinados fueron monomórficos (GPI y MDH), y cuatro fueron polimórficos, con presencia de dos y tres alelos (Cuadro 2).

El mayor número de alelos promedio se registro en la población de Morelos y los menores en las de Durango y Yucatán. El porcentaje de polimorfismo fue el igual para seis de las siete poblaciones. La heterocigosidad esperada (H_e) varió de 0.199 a 0.330 (Cuadro 3). El valor más bajo de H_e se registró en la de Durango y el mayor en la de San Luis Potosí. La heterocigosidad observada (H_o) siempre fue menor a la esperada y osciló entre 0.111 y 0.302 (Cuadro 3). Los valores de F (índice de fijación) fueron positivos y alejados del cero para cinco de las poblaciones. Sin embargo, para las

poblaciones de Tamaulipas y Yucatán, el índice de fijación (F) fue cercano a 0 (Cuadro 3), lo que sugiere que están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Cuadro 2. Enzimas reveladas en poblaciones de *A. ludens* procedentes de siete estados de la República Mexicana.

Enzima	Abreviatura	Nomenclatura internacional	No. loci	No. alelos
6- Phosphogluconate Dehydrogenase	6PGDH	EC.1.1.1.44	1	2
Glutamate-oxaloacetate transaminase	GOT	EC 2.6.1.1	1	2
Glucose-6-Phosphate Isomerasa	GPI	EC 5.3.1.5	1	1
Isocitrate Dehydrogenase	IDH	EC 1.1.1.42	1	3
Malate Dehydrogenase	MDH	EC 1.1.1.37	1	1
Malic Enzime	ME	EC 1.1.1.40	1	3

Cuadro 3. Estimadores de diversidad genética de poblaciones de *Anastrepha ludens* en México. % P , porcentaje de polimorfismo; H_o , heterocigosidad observada; H_e , heterocigosidad esperada bajo el supuesto de Equilibrio de Hardy-Weinberg. F , índice de fijación ($F=1- H_o / H_e$).

Estado	N	No. Alelos (promedio)	% P	H_o	H_e	F
Chiapas	40	1.7	66.7	0.171	0.266	0.357
Morelos	40	1.9	66.7	0.111	0.274	0.595
Yucatán	40	1.6	66.7	0.302	0.307	0.016
Veracruz	40	1.7	66.7	0.200	0.318	0.371
San Luis	36	1.7	66.7	0.285	0.330	0.136
Tamaulipas	32	1.7	66.7	0.280	0.310	0.097
Durango	40	1.6	50.0	0.113	0.199	0.432
Promedio	38.3	1.7	64.3	0.209	0.286	0.286

Con base en el índice de diversidad genética de Shannon, la población más diversa fue la de Veracruz y la menos diversa la de Durango (Cuadro 4); sin embargo, de acuerdo con el análisis de varianza, las diferencias entre las poblaciones no fueron significativas ($F=0.115$; $g. l. = 6/41$; $P > 0.05$).

Cuadro 4. Índice de diversidad genética de Shannon (Shannon y Weaver 1949) de siete poblaciones de *A. ludens* de México.

Estado	6PGDH	GOT	ME	IDH	Promedio
Chiapas	0.199	0.692	0.908	0.806	0.434
Morelos	0.325	0.652	0.948	0.685	0.435
Yucatán	0.287	0.681	1.017	0.980	0.494
Veracruz	0.548	0.655	0.831	0.950	0.497
San Luis Potosi	0.606	0.662	0.674	1.025	0.494
Tamaulipas	0.377	0.681	0.865	1.009	0.489
Durango	0.000	0.400	0.918	0.719	0.340

Los análisis de regresión lineal de H_e en función de la temperatura y altitud fueron significativos ($p=0.05$), a menor altitud mayor diversidad genética; mientras que a mayor temperatura mayor diversidad genética (Figura 6).

El Cuadro 5, muestra los loci que está en equilibrio en cada población. Para Morelos no se observó ningún locus en equilibrio, en Chiapas, Veracruz y Durango un locus estuvo en equilibrio, en la población de Yucatán y San Luis Potosí hay dos loci en equilibrio y tres loci en la de Tamaulipas.

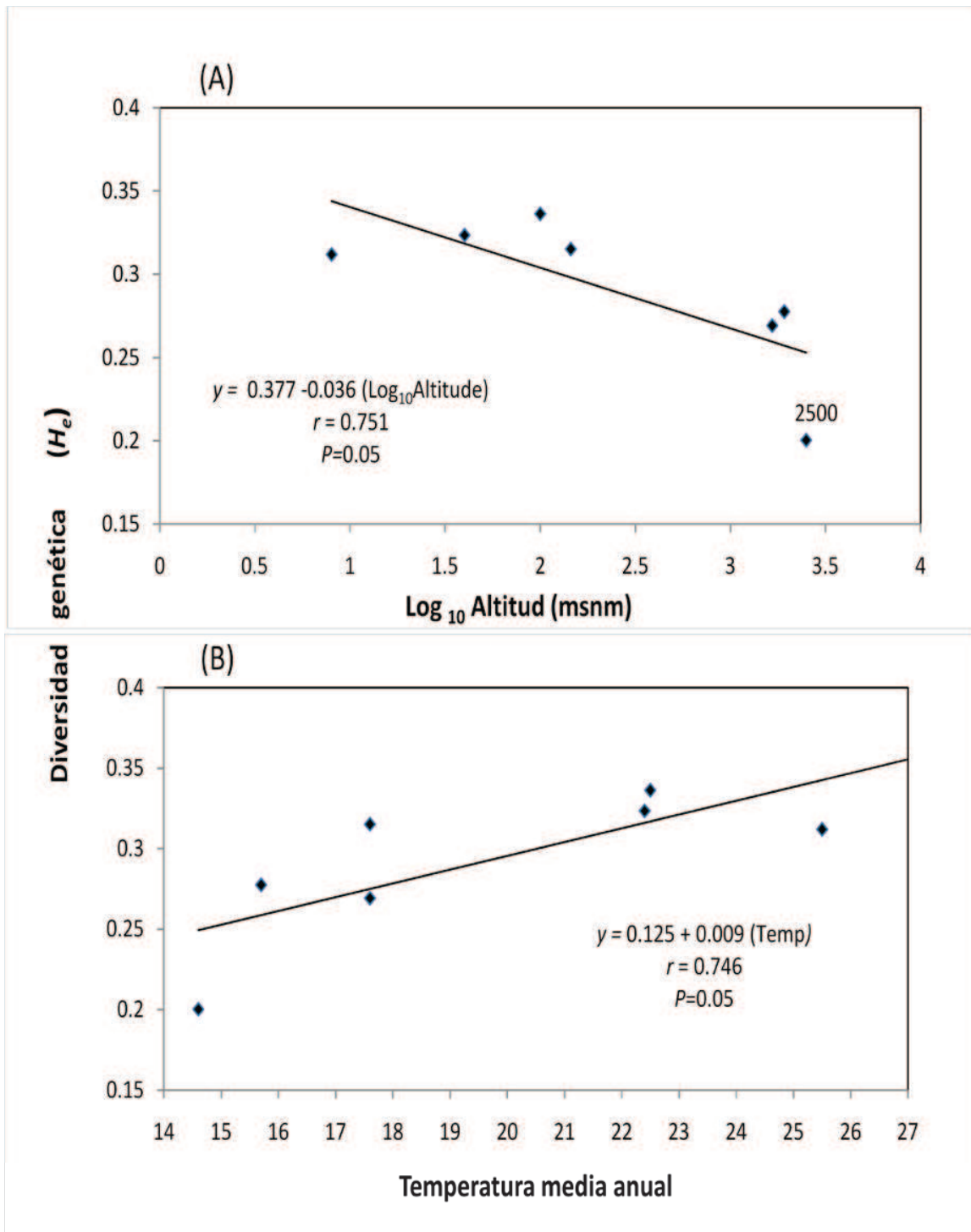


Figura 6. Análisis de regresión de la heterocigosidad esperada (H_e) de poblaciones de *A. ludens* contra la temperatura y altitud.

Para las poblaciones de Chiapas y Durango el locus que se encontró en equilibrio fue IDH. En la población de Yucatán estuvo en equilibrio GOT y ME. En la de Tamaulipas los loci GOT, ME y 6PGDH estuvieron en equilibrio. En la de San Luis Potosí estuvieron en equilibrio 6PGDH y ME. En Veracruz sólo la ME se registró en equilibrio (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valor de χ^2 (Chi-square) para probar Equilibrio de Hardy Weinberg en loci isoenzimáticos de poblaciones de *Anastrepha ludens*.

Estado	6PGDH	GOT	ME	IDH
Chiapas	20.000 **	32.382 **	9.901 *	3.400 ^{NS}
Morelos	40.000 **	16.610 *	27.302 **	10.469 **
Yucatán	36.000 **	1.755 ^{NS}	6.462 ^{NS}	11.401 **
Veracruz	25.149 **	28.072 **	0.320 ^{NS}	12.524 **
San Luis Potosí	0.892 ^{NS}	17.827 **	0.339 ^{NS}	15.590 **
Tamaulipas	1.976 ^{NS}	0.049 ^{NS}	0.617 ^{NS}	15.056 **
Durango	Fijo	32.012 **	18.977 **	7.711 ^{NS}

^{NS}, no significativo; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

En el análisis de agrupación (por UPGMA) se reconocieron dos grupos: uno lo constituyeron las poblaciones de Yucatán, Tamaulipas y Chiapas (Distancia genética = 0.017), a este grupo se le une la de Durango (Distancia genética = 0.042) (Figura 8). El otro grupo que se puede reconocer es el que conformaron las poblaciones de Veracruz, San Luis Potosí y Morelos (Distancia genética = 0.043). Los valores de bootstrap fueron inferiores al 45% para todos los grupos, este hecho indicó la frecuencia de conformación de los distintos nodos en 1000 repeticiones (Figura 7).

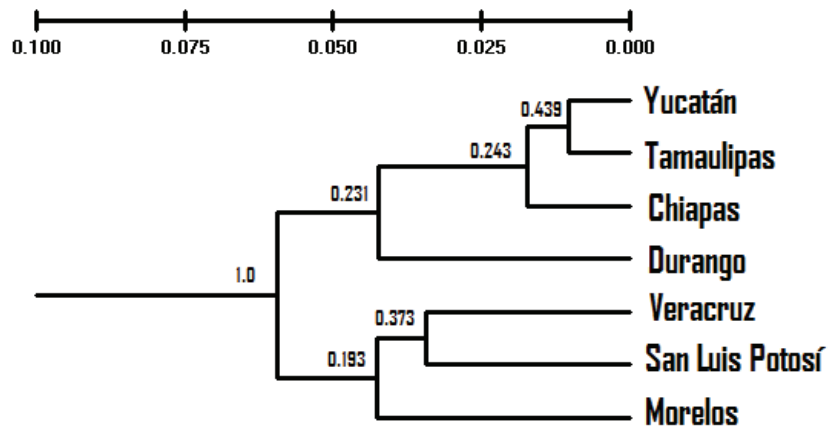


Figura 7. Agrupación de poblaciones de *A. ludens* por medio de UPGMA y con base al coeficiente de distancias genéticas de Nei (1972). Los números en la base de cada grupo representa la probabilidad de agrupación por Bootstrap (1000 repeticiones).

6.2. Estructura y Flujo Genético

Los estadísticos de Wright (Wright 1951) indicaron que hay una probabilidad de 0.362 de que un individuo del conjunto de las siete poblaciones sea endogámico por ancestría (F_{IT}), mientras a nivel de cada población la probabilidad es de 0.297 (F_{IS}) (Cuadro 6). El F_{ST} está indicando que el 91% de la variación o diversidad genética está repartida dentro de las poblaciones (cada estado), y sólo difieren en un 9% (Cuadro 6); lo que indica un nivel de diferenciación moderado entre poblaciones.

El número de individuos que se mueven entre pares de poblaciones va de 0.7 a 37 individuos por generación (Nm). El mayor número de individuos intercambiados (37) se registró entre la de Tamaulipas y Yucatán, cuya distancia geográfica lineal es 854.91 km y el menor flujo se dio entre la de Durango y Veracruz, con una distancia geográfica lineal de 893 km (Cuadro 7, Figura 8).

Cuadro 6. Estadísticos F 's de Wright para evaluar la diferenciación genética de poblaciones de *Anastrepha ludens* procedentes de siete estados de la República Mexicana.

Locus	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	
6PGDH	0.6946 **	0.0665 * *	0.6728 * *	
GOT	0.6481 **	0.0968 **	0.6104 **	
IDH	0.1624 *	0.1083 **	0.0606 ^{NS}	
ME	0.1881 **	0.0832 **	0.1144 ^{NS}	
Promedio	0.3618 **	0.0923 **	0.2968 **	
Jackknifing	0.3450	0.0930	0.2782	
D. E.	0.1473	0.0083	0.1635	
Intervalo de confianza	Superior	0.6633	0.1049	0.6313
al 95% (por Bootstrap)	Inferior	-0.1710	-0.0757	-0.0790

NS, no significativo; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

Cuadro 7. Flujo genético (Nm , arriba de la diagonal) entre pares de poblaciones de *A. ludens* procedentes de siete estados de la República Mexicana. Bajo la diagonal distancias geográficas por pares poblacionales.

	Chiapas	Morelos	Veracruz	Yucatán	San Luis Potosí	Tamaulipas	Durango
Chiapas		1.547	1.453	12.571	2.014	8.341	2.744
Morelos	676.25		3.862	3.256	2.712	3.875	1.191
Veracruz	691.50	246.22		2.915	4.770	6.656	0.700
Yucatán	595.17	903.13	738.15		7.636	37.063	3.276
San Luis	842.85	333.91	152.50	831.19		6.260	1.398
Tamaulipas	1001.29	556.51	349.59	854.91	222.60		1.451
Durango	1569.47	917.45	893.00	1563.15	755.79	717.11	

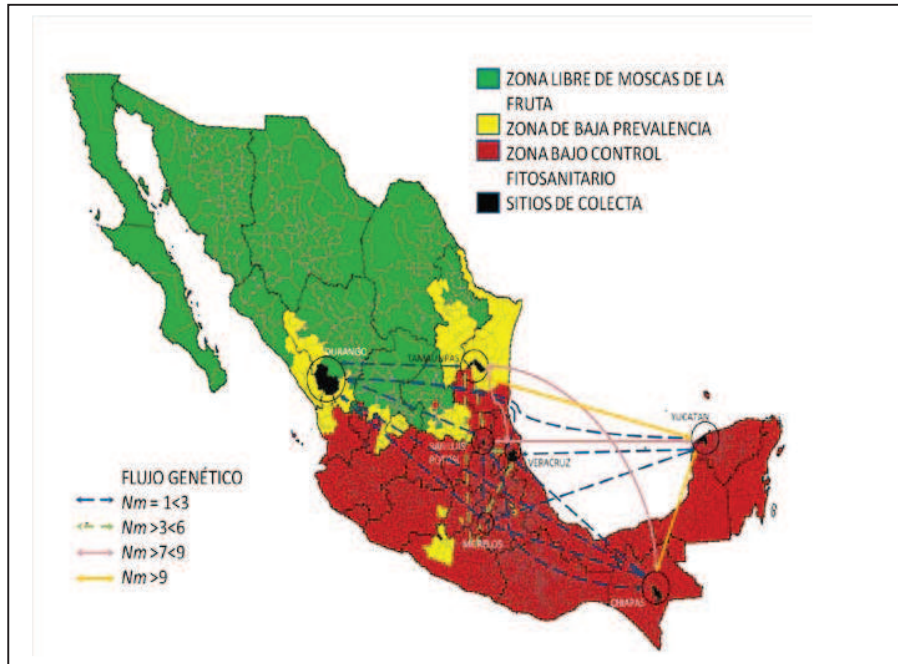


Figura 8. Flujo genético (Nm) entre poblaciones de *A. ludens* en la República Mexicana (SENASICA 2009).

La distancia geográfica lineal mínima entre poblaciones fue entre San Luis Potosí y Veracruz (152.5 km) y la máxima fue entre Chiapas y Durango (1569.47 km). Se encontró una relación negativa entre el flujo genético (Nm) y la distancia geográfica (modelo de aislamiento por distancia entre pares de poblaciones, *stepping-stone*), la distancia geográfica explica el 21% de la variación en flujo genético ($r=-0.458$; $P<0.05$,) (Figura 9A). Este modelo es consistente con el que se deriva de relacionar una medida de distancia genética obtenida mediante la fórmula $F_{ST}/(1-F_{ST})$ contra la distancia geográfica (Rousset 1997). A distancias geográficas lineales mayores es menor el flujo genético (Figura 9A) y mayor la distancia genética (Figura 9B).

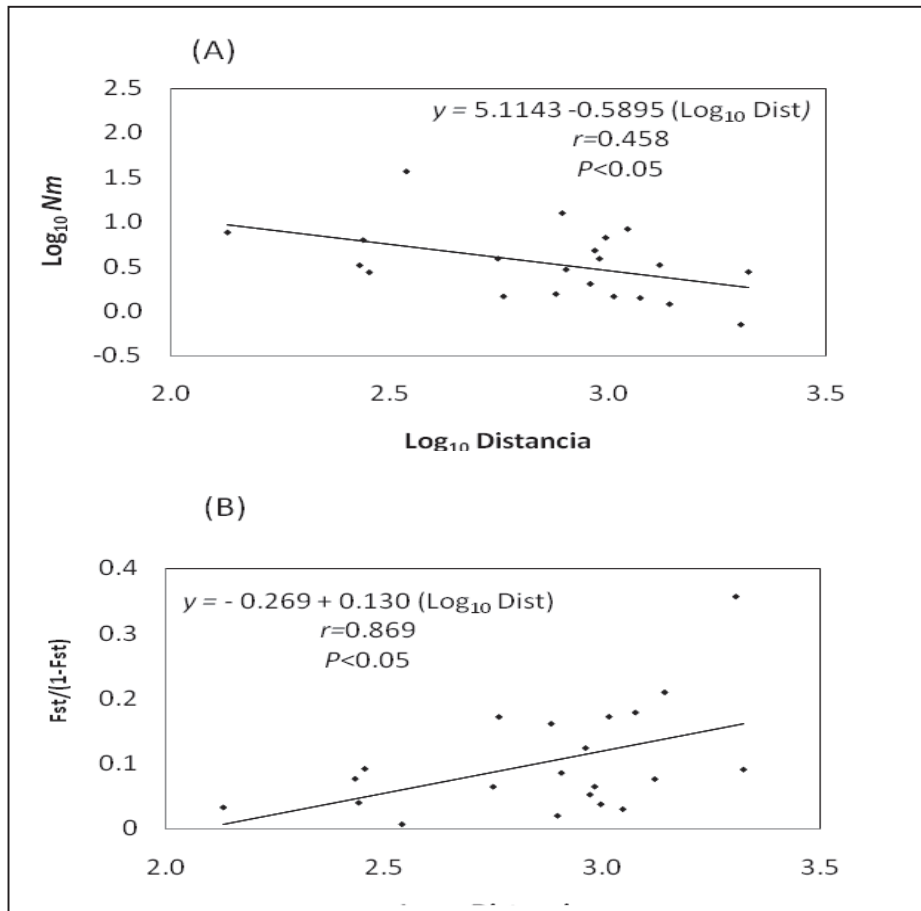


Figura 9. Análisis de regresión del logaritmo natural del flujo genético (Nm) contra el logaritmo de la distancia geográfica (Km) entre pares de poblaciones(A). La distancia genética contra el logaritmo de la distancia geográfica (Km) entre pares de poblaciones (B).

De acuerdo al análisis de IMMANC se encontraron entre 1 y 7 inmigrantes en las poblaciones y todas las poblaciones contribuyen con al menos un inmigrante para cada uno de los Estados a excepción de las poblaciones de Morelos y Yucatán que no hay movimiento de individuos a San Luis Potosí y Tamaulipas, respectivamente (Cuadro 8). El mayor número de inmigrantes se registró en las poblaciones de Chiapas y Tamaulipas. La población de Chiapas recibe de todas las poblaciones pero no es un importante donador de migrantes.

Cuadro 8. Número probable de organismos que son posibles inmigrantes con base en un análisis de asignación multilocus IMMANC. Los renglones son la población receptora de inmigrantes y las columnas la población de origen de los inmigrantes. Los inmigrantes pueden ser de más de un origen por lo que la suma de emigrantes no corresponde al total de inmigrantes.

Poblaciones receptoras	Poblaciones de origen						
	Chis	Dgo	Mor	SLP	Tam	Ver	Yuc
Chiapas (Chis)		7	4	5	5	5	5
Durango (Dgo)	5		1	1	5	3	3
Morelos (Mor)	1	1		4	2	3	3
San Luis Potosi (SLP)	2	3	0		2	3	3
Tamaulipas (Tam)	3	1	4	3		4	0
Veracruz (Ver)	1	4	5	4	1		2
Yucatán (Yuc)	2	1	2	2	3	2	

6.3. Supervivencia

En la generación parental; fueron similares para las siete poblaciones, siendo Morelos la que presentó los valores más altos (Figura 10A). Para la etapa de eclosión (H-L: $F=14.402$; $g.l.=6/166$; $P<0.05$), larva (L1-L3: $F=6.771$; $g.l.=6/166$; $P<0.05$), y emergencia (P-A: $F=5.608$; $g.l.=6/166$; $P<0.05$) las diferencias entre las poblaciones fueron significativas mediante el análisis de comparación de medias Tukey (Figura 10A, Cuadro 9).

En la generación Filial 1 (F1), la población proveniente de Chiapas, presentó los valores más altos de supervivencia en las cuatro etapas de desarrollo (Figura 10B). La población de Durango durante todas las etapas, presentó valores altos pero siempre por debajo de Chiapas. El resto de las poblaciones presentaron valores similares entre

Cuadro 9. Agrupación Tukey para 4 etapas de desarrollo de *A. ludens* durante la Generación Parental.

Población	Etapa evaluada								
	H-L			L1-L3		L3-P		P-A	
Chiapas	A	B		A	B	A	A		
Morelos			D		B	A		B	
Veracruz		C	D	A	B	A	A	B	
Yucatán		B	C	D		A	A	B	
San Luis Potosí	A				B	A	A	B	
Tamaulipas	A			A	B	A	A	B	
Durango		B	C	A		A			

Cuadro 10. Agrupación Tukey para 4 etapas de desarrollo de *A. ludens* durante la generación Filial 1.

Población	Etapa evaluada								
	H-L			L1-L3			L3-P		P-A
Chiapas		C			D		D		C
Morelos	A	B		A	B	C	A		B
Veracruz	A	B		A	B		B		A
Yucatán	A	B			B	C	B	C	A
San Luis Potosí		B	C	A			C	D	A
Tamaulipas	A			A	B		C	D	A
Durango	A	B	C			C	C	D	B

si. Se encontraron diferencias significativas en supervivencia entre poblaciones (Cuadro 10) en la etapa de H-L ($F=12.537$; $g.l.=6/193$; $P<0.05$), L1-L3 ($F=49.988$; $g.l.=6/193$; $P<0.05$), L3-P ($F=22.701$; $g.l.=6/193$; $P<0.05$), y P-A ($F=68.438$; $g.l.=6/193$; $P<0.05$).

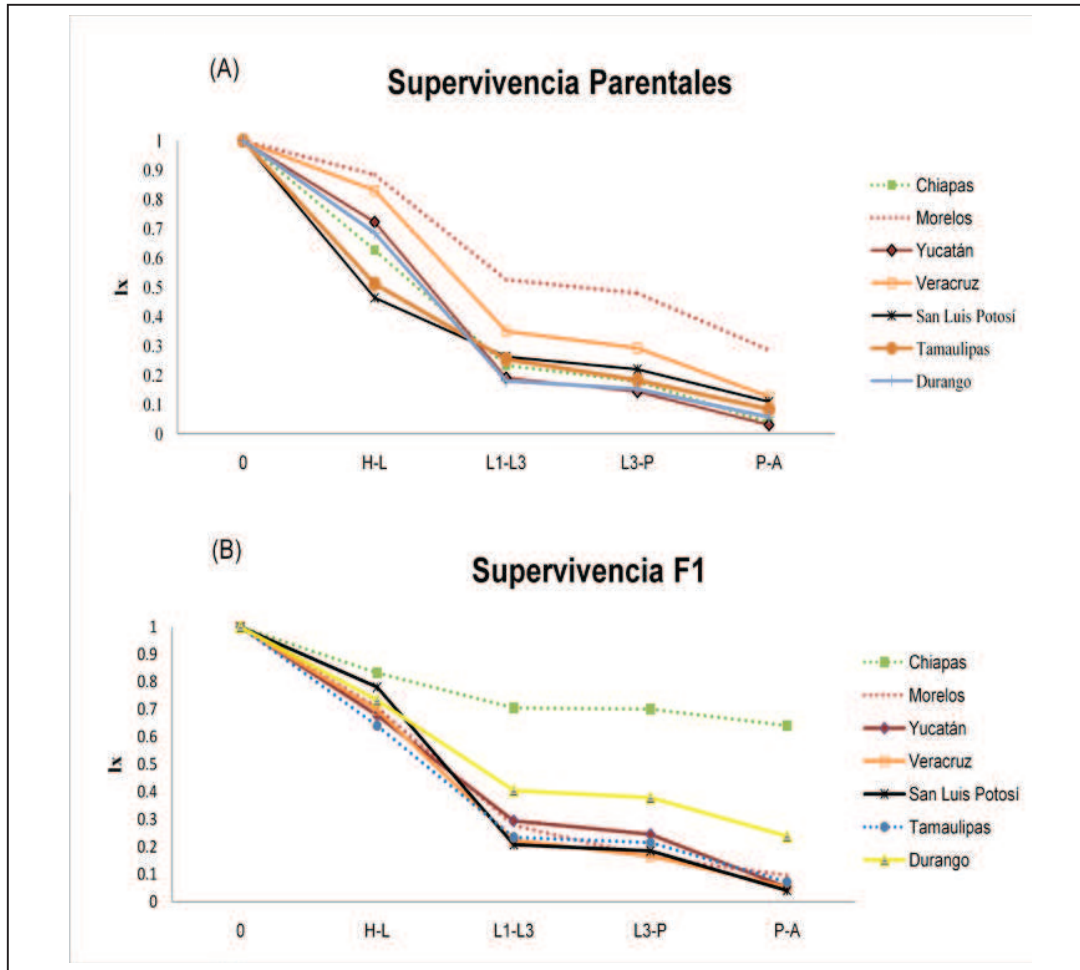


Figura 10. Supervivencia de *A. ludens* en cada uno de sus estados biológicos. A) Generación Parental, B) Filial 1.

En la generación parental el mayor índice de supervivencia global se registró en la población de Morelos (IGS = 0.296) y fue diferente significativamente al resto de las poblaciones ($F=7.536$; $g.l.=6/166$; $P<0.05$). En la generación filial 1 (F1) hubo diferencias significativas entre poblaciones en el índice de supervivencia global ($F=154.172$; $g.l.=6/193$; $P<0.05$), y de acuerdo con la prueba de Tukey se encontró que la población de Chiapas fue diferente significativamente a las otras, seguida por la población de Durango. Las diferencias observadas en los valores de las otras

poblaciones no fueron significativas. De acuerdo a estos resultados se establecieron tres grupos homogéneos de medias: (1) Chiapas, (2) Durango (3) Morelos, Veracruz, Tamaulipas, Yucatán y San Luis Potosí (Figura 11).

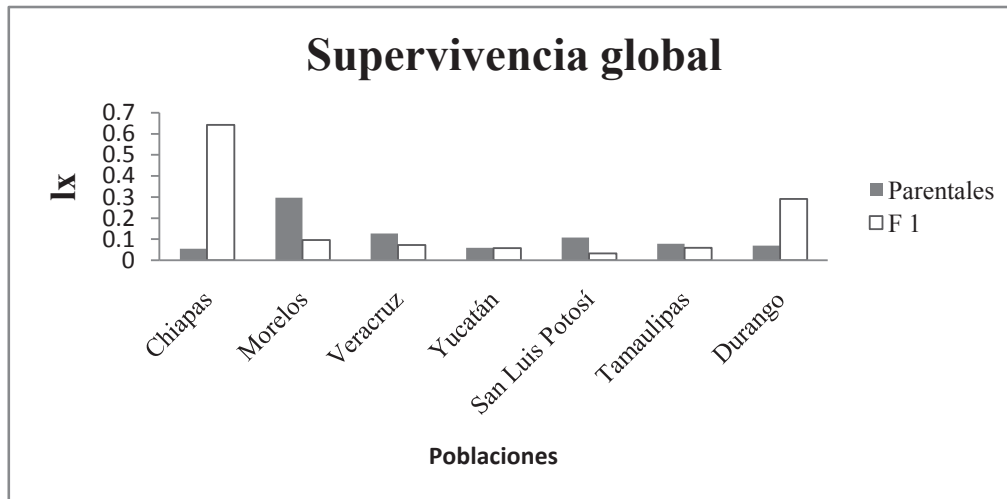


Figura 11. Índice de supervivencia global de la Generación Parental en comparación a la Generación Filial 1.

Las diferencias observadas entre los valores del índice global fueron significativas ($p < 0.05$) entre la parental y la filial 1 en las poblaciones de Chiapas, Morelos, San Luis Potosí y Durango. En las poblaciones de Chiapas y Durango el índice de supervivencia se incrementó (de la parental a la F1), mientras que en poblaciones de Morelos y San Luis Potosí disminuyó (Figura 11). En las poblaciones de Veracruz, Yucatán y Tamaulipas, las diferencias observadas en dicho parámetro no fueron significativas.

No se encontró una relación significativa entre la heterocigosidad esperada y el índice de supervivencia global de la generación parental ($R^2= 0.002$ y $r=0.044$; $P>0.05$), ni entre la heterocigosidad observada ($R^2= 0.222$ y $r=0.471$; $P>0.05$: Figura 12).

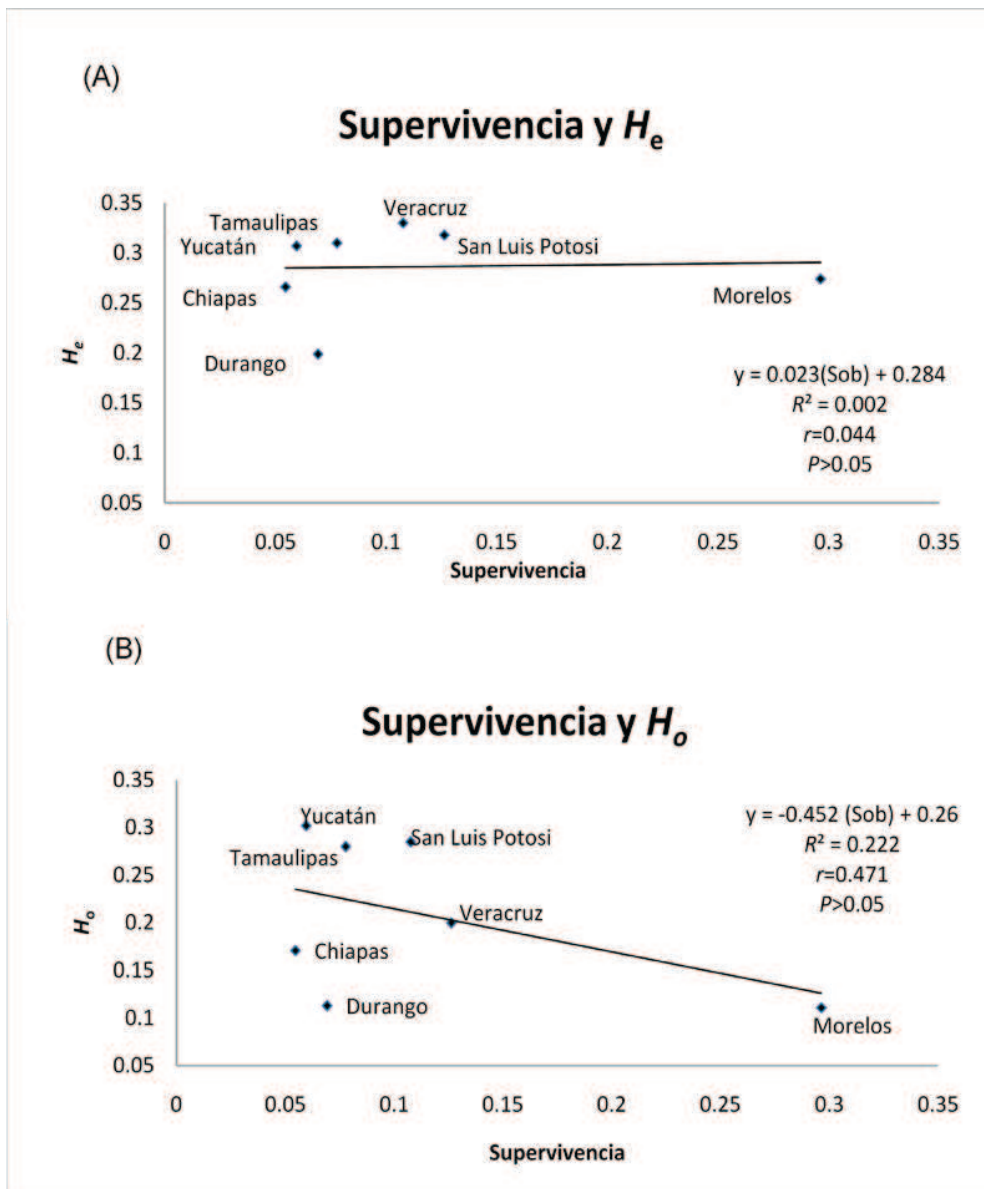


Figura 12. Relación entre: A) Supervivencia y H_e y B) Supervivencia y H_o (no significativas).

7. DISCUSIÓN

Las poblaciones estudiadas de *A. ludens* en México mostraron altos niveles de diversidad genética y una diferenciación moderada entre poblaciones en base al origen geográfico. Las condiciones ambientales de donde proceden las poblaciones en general son distintas y la diversidad genética (H_e) de *A. ludens* se asocia linealmente con la temperatura y la altitud, lo que sugiere que estos factores pueden propiciar un régimen de selección diferente, aunque no suficiente como para contrarrestar totalmente el flujo genético, ya que un individuo que se mueva de una población a otra es suficiente para disminuir la diferenciación genética promovida por selección o deriva genética (Wright 1951).

Bajo una condición de equilibrio, la máxima diversidad genética posible es de 0.5 (H_e). Los valores de H_e para seis de siete poblaciones de *A. ludens* resultaron mayores a la mitad de la diversidad máxima posible ($H_e = 0.25$) en condiciones de equilibrio. Esta diversidad se mantiene posiblemente porque *A. ludens* puede llegar a tener poblaciones con altas densidades como respuesta de su longevidad relativamente larga y alta fecundidad (Leyva et al. 1991, Liedo et al. 1992, Carey et al. 2005). No obstante, los valores de H_e son mayores a los valores de H_o , lo que indica que la heterocigosidad se reduce posiblemente en parte por el apareamiento entre organismos emparentados, lo cual puede ser si el apareamiento se da entre adultos que emergen de un mismo fruto o frutos cercanos que fueron ovipositados por una misma hembra, como se ha reportado con *A. fraterculus* (Alberti et al. 1999). La endogamia también puede ser acentuada por el hecho de que las hembras de *A. ludens* realizan más de una oviposición en un mismo fruto (Díaz-Fleicher y Aluja 2003), y al sistema de

apareamiento en lek, donde un solo macho puede aparearse con un alto número de hembras (Burk 1981, Robacker y Hart 1985, Sivinski y Burk 1989). En poblaciones de *A. ludens* en el Soconusco, Chiapas, también se han estimado altos niveles de endogamia ($F= 0.682$, Verónica-Vallejo et al. 2006).

La diversidad genética, medida como H_e , registrada en este estudio es semejante a la observada en poblaciones de *A. ludens* colectadas en cítricos (*C. sinensis* y *C. paradisi*) en la región del Soconusco, Chiapas ($H_e = 0.410-0.447$; Verónica-Vallejo et al 2006), pero el promedio de las poblaciones de Chiapas ha superado al promedio del presente estudio ($H_{e\text{Chiapas}} = 0.429$ vs $H_{e\text{México}} = 0.286$), los valores obtenidos en este estudio pueden deberse a que las poblaciones provienen de estados que se encuentran en tres categorías fitosanitarias distintas (es decir poblaciones con densidades bajas y altas de moscas, que pueden influir en su diversidad genética por el movimiento de individuos). Sin embargo, *A. ludens* tiene una mayor diversidad genética ($H_e > 0.25$), que otras especies de Tephritidae, por ejemplo en *A. fratecurlus* el valor promedio fue de $H_e = 0.03$; (Morgante y Malavasi 1985), en *Ceratitidis capitata* osciló entre 0.022 y 0.48 (Milani y Malacrida. 1989). Las poblaciones de tefritidos son en general genéticamente poco diversas, pero no ha sido una limitante para adaptarse a nuevos hospederos y ampliar su intervalo de distribución (Bonizzoni et al. 2001, Meixner et al. 2002). Dado que la diversidad de *A. ludens* fue mayor, podría esperarse una mayor capacidad de adaptación a nuevos hospederos y/o ambientes.

En este estudio, la diferenciación entre poblaciones fue moderada ($F_{ST} = 0.092$), estas diferencias genéticas pueden deberse a que en cada estado, *A. ludens* está sometida a presiones selectivas diferentes, lo que se refleja en un patrón de variación

clinal de la diversidad genética (H_e) con respecto a la altitud y temperatura. La diferenciación genética producto de la selección natural, e incluso deriva genética, se ha reconocido en otras especies de moscas de la fruta, como *Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus* (Morgante y Malavasi 1985, Reyes y Ochando 1997, Alberti et al. 1999, 2002). La altitud por sí misma no es factor selectivo, pero ésta se asocia con otros factores que pueden ejercer una selección sobre las poblaciones de *A. ludens*. Por ejemplo la temperatura, con la cual se determinó una asociación y se conoce que influye en la tasa reproductiva de diversos insectos (Bale et al. 2002, Fletcher 1989). Otros factores selectivos están asociados a la disponibilidad y calidad nutricional del huésped, así como a la presencia y densidad de enemigos naturales. La especie y abundancia de los hospederos nativos y no nativos influyen en la capacidad reproductiva y supervivencia de las moscas de la fruta (Aluja et al 2003, Carey 1984, Díaz-Fleischer y Aluja 2003, Krainacker et al 1987, Leyva et al. 1991, Malavasi y Morgante 1981), y al ser éstos componentes importantes de la adecuación, su variación afectará invariablemente a la estructura genética de las poblaciones.

Anastrepha ludes muestra un patrón de diferenciación acorde con el modelo de aislamiento por distancia. Sin embargo, la distancia geográfica no es el único factor que podría estar influyendo en el patrón de flujo genético entre poblaciones, las acciones de manejo establecidas por la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta también pueden influir en las tasas de flujo genético, permitiéndose el tráfico de frutos entre zonas que pertenecen a la misma categoría, lo que sugiere que el patrón de flujo genético también es parcialmente conducido por las actividades humanas (Oliver 2006). La moderada diferenciación entre poblaciones, puede atribuirse como una respuesta a

factores ambientales que favorecen la diferenciación y al flujo genético que se contraponen.

La población de moscas del estado de Durango tiene el menor flujo de genes (Nm) hacia el resto de las poblaciones, su categoría fitosanitaria libre y de baja prevalencia representa una barrera al flujo genético. Tamaulipas es el que tiene el mayor flujo genético con las otras poblaciones especialmente con Veracruz, esto puede deberse a que se considera que el origen de dicha especie es el noreste de México (Plummer et al 1941, Baker et al. 1944) y en esta zona se encuentra en mayor disponibilidad el “chapote amarillo” (*Sargentia gregii*), uno de los hospederos nativos más importantes para *A. ludens* (Hernández-Ortiz 1992). Veracruz (intercambia 5 individuos por generación), Yucatán (7) y Tamaulipas (7). Esto puede ser explicado por las distancias entre San Luis Potosí, Veracruz y Tamaulipas (<223 km). San Luis Potosí y Morelos intercambian 3 individuos a pesar de estar a 333 km, esto puede deberse en parte a que Morelos está separado orográficamente de San Luis Potosí y Veracruz por la Sierra Madre Oriental.

Las poblaciones de *A. ludens* de Yucatán, Tamaulipas, Chiapas y Durango son genéticamente similares, pese a la distancia geográfica que los separa. Yucatán y Tamaulipas intercambian 37 individuos (Nm), la razón del flujo puede ser porque parte de los municipios del estado de Tamaulipas y Yucatán pertenecen a la misma categoría de control (bajo control fitosanitario) y a la alta superficie que es sembrada en estos estados con naranja dulce (*Citrus sinensis*; 13,317 ha y 33,272 ha para Yucatán y Tamaulipas respectivamente; SIAP 2009). En tanto que la población de Chiapas se encuentra geográficamente más cercana a Yucatán y pertenecen a la misma categoría

fitosanitaria, en comparación a la distancia entre los sitios de colecta de las poblaciones de Tamaulipas y Yucatán, esta cercanía y el movimiento de frutos entre estos estados, podría explicar porque son genéticamente similares. Sin embargo, el análisis de flujo genético nos indica la tasa de migración, no así las causas que provocan el flujo de genes. El análisis de asignación muestra la asimetría de flujo genético que puede haber entre pares de poblaciones, por ejemplo Chiapas es el estado que recibe más inmigrantes en comparación a los otros estados, especialmente de Durango y Morelos, pero a la vez de Chiapas es en donde hay una menor salida de individuos, esto puede deberse al movimiento de frutos hospederos, ya que éste movimiento es más probable de zonas de baja prevalencia de moscas de la fruta a zonas bajo control fitosanitario, y no a la inversa, También indica que hay flujo genético suficiente como para producir una homogeneización genética ($F_{ST} = 0$) entre las poblaciones (Wright 1951). La genealogía de las poblaciones puede ser revelada utilizando marcadores moleculares que detecten una mayor variación, como es el ADN genómico o mitocondrial.

En cuanto a supervivencia se ha demostrado que existe variación en *A. ludens* de acuerdo al fruto hospedero en el que se desarrolla en fase larval (Dávila et al 2006, Celedonio et al 1988; Leyva et al 1991). Esta fase es una de las más importantes ya que es en este estado en donde se registra el mayor porcentaje de mortalidad, y a que éste estado ocurre en el interior del fruto hospedero y depende de diversos factores como son las condiciones ambientales en las que se encuentra dicho hospedero. En estudios previos han reportado que en el proceso de adaptación de moscas silvestres *A. ludens* a condiciones de laboratorio, la supervivencia en la etapa H-L va aumentando gradualmente de generación a generación. Una tendencia similar se observó en las

poblaciones de Chiapas y Durango. En los casos de Morelos y San Luis Potosí el efecto fue contrario y en los otros 3 casos las diferencias entre generaciones fueron no significativas.

En la transformación de larva a pupa se ha encontrado que la supervivencia es constante con tendencia a disminuir (Dávila et al 2006, Hernández et al 2009, Pinson et al 2006). Sin embargo, con las poblaciones evaluadas en el presente estudio la supervivencia fue variable para cada población, para la población de Chiapas y Durango la tendencia fue a aumentar de la GP a la F1, mientras que en la de Morelos fue a disminuir y, en Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas y Yucatán se mantuvieron constantes. Generalmente la disponibilidad y características del fruto, tienen que ver con la variación en supervivencia (Aluja, 1994, Celedonio-Hurtado et al, 1988); sin embargo, las condiciones ambientales en las que se encuentran los hospederos pueden influenciar el desarrollo del insecto, como se encontró en este estudio, en donde las moscas silvestres provenientes de diferentes orígenes geográficos mostraron variación en la supervivencia (no existe un patrón de variación). El municipio de Comitán de Domínguez, Chiapas presenta condiciones ambientales similares a las de Pueblo Nuevo Durango. Ocuituco, Morelos y Axtla de Terrazas, San Luis Potosí, registran una similitud en el clima pero difieren en altitud; en cambio, Villa de Güemez, Tamaulipas, Hunucmá, Yucatán y Temapache, Veracruz poseen condiciones climáticas similares, pero difieren en el tipo de vegetación. Sin embargo, no se encontró relación significativa entre temperatura y altitud con la supervivencia. Por lo que los valores observados pudieron ser a causa de la interacción entre factores ambientales, genéticos y a las condiciones de manejo en cada sitio de colecta.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran evidencias de que las poblaciones *A. ludens* son diversas genéticamente, están sujetas a una selección diferencial, cuyo resultado es disminuido por las tasas de flujo genético que son afectadas por la distancia que separa a las poblaciones y al movimiento de frutas (infestadas) entre los estados de acuerdo a la categoría de status fitosanitario. Los patrones de diversidad genética de poblaciones de *A. ludens* en *Citrus* sp. en México, son resultado de una interrelación de la selección natural y flujo genético, asociados a las condiciones climáticas, disponibilidad del hospedero y al manejo fitosanitario.

AGRADECIMIENTOS

A la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta por su apoyo para la realización de esta investigación. Al personal del Laboratorio de Sexado Genético de la planta MOSCAFRUT por su asistencia en la colecta de los organismos en Chiapas y por las facilidades para el desarrollo de los experimentos. Esta investigación forma parte de la tesis de maestría realizada en El Colegio de la Frontera Sur por Mayra Carolina Molina Nery, becaria de CONACyT. Este estudio fue financiado por SEP-CONACYT a través del proyecto SEP-CONACYT 2003-CO-43824 (PLF-LRM).

LITERATURA CITADA

Alberti, A. C., Calcagno G., Saidman B. O., Villardi J. C. 1999. Analysis of the genetic structure of natural population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera. Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. of Am. 92: 731-736.

- Alberti, A. C., Rodriguero M. S., Cendra P.G., Saidman B. O., Vilardi J. C. 2002. Evidence indicatring that Argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) belong to a single biological species. *Ann. Entomol. Soc. of Am.* 95 (4): 505-512.
- Aluja, M. 1994. Bionomics and managements of *Anastrepha*. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 155-178.
- Aluja M., Piñero J., Jácome I., Fleischer F. D. 1999. Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotripanini). pp. 363-374. En: Aluja M. y A. L. Norrbom. 1999. Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior. CRC Press. Washington D. C.
- Aluja, M., Pérez-Staples D., Macías-Ordoñez R., Piñero J., McPheron B., Hernández-Ortíz V. 2003. Nonhost status of *Citrus sinensis* cultivar Valencia and *C. paradisi* cultivar Ruby Red to Mexican *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 1693-1703.
- Aluja S. M., Mangan R. L. 2008. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. *Ann. Rev. Entomol.*, 23: 473-502.
- Bale, J.S., G.J Masters, I.D. Hodkinson, C. Awmack, T.M. Bezemer, V.K. Brown, J. Butterfield, A. Buse, J.C. Coulson, J. Farrar, J.E.G. Good, R. Harrington, S. Hartley, T.H. Jones, R.L. Lindroth, M.C. Press, I. Symrnioudis, A.D. Watt and J.B.

- Whittaker. 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, 8: 1-16.
- Baker , A.C., Stone W.E., Plummer C.C., McPhail M. 1944. A review of studies on the Mexican fruit fly and related Mexican species. United States Department of Agriculture, Miscellaneous Publication No. 531. Washington D.C.
- Bateman, M. A., 1972. The ecology of fruit flies. *Ann. Rev. Entomol.* 17:493-518.
- Bonnizzoni, M, Zheng L., Gulielmino C.R., Haymer D.S., Gasperi G., Gomulki L.M., Malacrida A.R. 2001. Microsatellite análisis of medfly bioinfestations in California. *Mol. Ecol.* 10: 2515-2524.
- Burk, T. 1981. Signaling and sex in acalyprate flies. *Fla. Entomol.* 64: 30-43.
- Cancino, T. R. J. 2007. Estructura Genética de *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae), en poblaciones del estado de Chiapas. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Pp 47.
- Carey J. R. 1982. Demography and population dynamic of the mediterranean fruit fly. *Ecol. Model.* 16: 125-150.
- Carey, J.R. 1984. Host-specific demographic studies of the mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Ecol. Entomol.* 9: 261-270.
- Carey, R.J., Liedo P., Müller H.G., Wang J.L., Senturk D., Harshman L. 2005. Biodemography of a long-lived tephritid: Reproduction and longevity in a large

cohort of female Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*. Exp. Gerontol. 40: 793-800.

Celedonio-Hurtado, H., Liedo, P., Aluja M., Guillen, M. J., Berrigan D., Carey J. R. 1988. Demography of *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* and *A. serpentina* (Diptera: Tephritidae) in México. Fla. Entomol. 71:111-120.

CESV Comité Estatal de Sanidad Vegetal Chiapas. 2005. Manual para el control integrado de la mosca de la fruta. Manual para el productor. Fundación Produce Chiapas A. C., SAGARPA, Gobierno de Chiapas y la DGSV (Dirección General de Sanidad Vegetal).

CONABIO Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. 2010. Temperatura media anual (shape file) de los municipios del Territorio Nacional Mexicano. En: <http://www.conabio.gob.mx>

Christenson, L. D., Foote R. H. 1960. Biology of fruit flies. Ann. Rev. Entomol. 5: 71-192.

Dávila A. 2006. Influence of larval host changes on life history traits across two generations in the Mexican fruit fly. Tesis Maestría. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. 33p.

Dávila O. G., Andraca G. G., Ruíz M. L., Castro R. A., Ramírez C. 2005. Genética poblacional de *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae) en Amatenango del Valle, Chiapas. Entomol. Mex. 4: 857-862.

- Díaz-Fleischer, F., Aluja, M. 2003. Influence of conspecific presence, experience and host quality on oviposition behavior and clutch size determination in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *J. Insect Behav.* 16: 537-554
- Fernández J. M. 2004. Manual de SPSS 11.5 para Windows (aplicado a las Ciencias Documentales). Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Facultad de Matemáticas. Universidad de Murcia. España.
- Fletcher, B.S. 1989. Temperature – development rate relationships of the immature stages and adults of Tephritid fruit flies, pp. 273-289. In A.S Robinson and G. Hooper (Eds.) *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*. World Crop Pests Vol. 3B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands,
- Gasperi, G., Malacrida A. R., Milani R. 1987. Protein variability and population genetics of *Ceratitis capitata*, pp. 149-175. In A. P. Economopoulos (Ed.) *Fruit Flies: Proceedings of the Second International Symposium*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Groom, J. M., Meffe G. M., Carroll C.R. 2006. *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, E.U.A.
- Gutiérrez R. J. M. 2003. Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta: Situación Actual y Perspectivas, pp. 3-12. En: *Memorias del XV Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta*. Programa MOSCAMED-MOSCAFRUT, SAGARPA-IICA. 2003. Metapa de Domínguez. Chiapas, México.

- Hanski I., Gaggiotti O. E. 2004. Ecology, Genetics and Metapopulations. Elsevier Academic Press, New York. United States of America. 683 p.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. Principles of Population Genetics. 3rd editon. Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts, EUA. p 542.
- Hedrick, W. P. 1997. Genetics of Populations. 2a Edition. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts.
- Hendrichs J. 1993. Contribution of natural foods sources to adult longevity and fecundity of *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 86:250-264.
- Herbet, P.D.N., Beaton M.J. 1994. Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophopresis. Helena Laboratorios, Texas, E.U.A.
- Hernández, E., Orozco, D., Flores, B. S., Domínguez J. 2007. Dispersal and longevity of wild and mass-reared *Anastrepha ludens* and *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). Fla. Entomol. 90 (1): 123-133.
- Hernández E., Toledo J., Artiaga-López T., Flores S. 2009. Demographic changes in *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) throughout the laboratory colonizationprocess. J. Econ. Entomol. 102 (2): 542:552.
- Hernández-Ortíz, V. 1992. El género *Anastrepha* en México (Diptera-Tephritidae) Taxonomía, Distribución y sus Plantas Hospederos. Instituto de Ecología. Sociedad Mexicana de Entomología. Xalapa, Veracruz, México.

- Hillis, D. M., Moritz C., Mable B.K. 1996. *Molecular Systematics*, 2a ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, EUA.
- Hoy, J. A. 2003. *Insect Molecular Genetics, An Introduction to Principles and Applications*, 2ed. Academic Press, San Diego California, EUA.
- Huettel, M. D., Fuerst P. A., Maruyama T., Chacraborty R. 1980. Genetics effects of multiple population bottlenecks in the mediterranean fruit flies (*Ceratitidis capitata*) Genetics. 94: 43-47.
- INAFED Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. 2005. Secretaría de Gobernación. México. <http://www.inegi.org.mx>.
- Krafsur E. S. 2005. Role of Population Genetics in the Sterile Insect Technique. Pp 389-406. En: Dyck, V. A., J. Hendrichs, y A. S. Robinson (Eds.). *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer – The Netherlands.
- Krainacker, D. A, Carey J. R., Vargas R. I. 1987. Effect of larval host on life history traits of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Oecologia*. 73: 583-590.
- Leyva, J. L., Browing H. W., Gilstrap F. E. 1991. Development of *Anastrepha ludens* (Ditera: Tephritidae) in several host fruits. *Environ. Entomol.* 20: 1160-1165.
- Liedo, P., Carey J. R., Celedonio H., Guillen J. 1992. Size specific demography of three species of *Anastrepha* fruit flies. *Ent. Exp. et Appl.* 63: 135-142.

- Liedo P., Toledo J., Ruiz-Montoya L. 2009. Manejo evolutivo de plagas: las moscas de la fruta, *Ciencia* 60 (4): 62-70.
- Malavasi, A, Morgante J. S. 1981. Adult and larval population fluctuation of *Anastrepha fraterculus* and its relationship to host availability. *Env. Entomol.* 10: 275-278.
- Meixner, M. D., McPheron B. A., Silva J. G., Gasparich G. E., Sheppard W.S. 2002. The Mediterranean fruit fly in California: evidence for multiple introductions and persistent populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. *Mol. Ecol.* 11: 891-899.
- Milani R., Gasperi G., Malacrida A. 1989. Biochemical genetics, pp 33-56. In: A.S. Robinson y G. Hopper (eds). *Fruit flies their biology, natural enemies and control.* World Crop Pests Vol. 3B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Miller M. P. 1997. TFPGA 1.3. Tools for population genetics analysis: A Windows program for the analysis of allozymes and molecular population genetic data. Northern Arizona University, Arizona.
- Morgante J. S., Malavasi A. 1985. Genetic variability in populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Tephritidae). *Rev. Brazil Genet.* 8: 241-247.
- MOSCAFRUT- Mosca Mexicana de la Fruta. 2010. Control de calidad de ingredientes. En: <http://www.moscasdelafrutamexico.org.mx/moscafrut/cingredientes.htm>.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist.* 106: 283-292

- Ochando M. D., Reyes A. 2000. Genetics population structure in olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin): gene flow and patterns of geographic differentiation. Madrid, Spain. J. Appl. Entomol. 124: 177-183.
- Oliver, J.C. 2006. Population genetic effects of human-mediated plant range expansions on native phytophagous insects. Oikos, 112: 456-463.
- Pérez R., A. 1987. Tasas de supervivencia y reproducción de *Anastrepha ludens* (Loew) en diferentes hospedantes (Tesis de Maestría en Ciencias). Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de México. 89 p.
- Pérez-Staples, D., Aluja M. 2004. *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae): Females that mate with virgin males live longer. Ann, Entomol. Soc. of Am. 97 (6): 1336-1341.
- Perse, D. E., Crandall K. A. 2004. Beyond F_{ST} analysis of population genetic data for conservation. Conservation Genetics. 5: 585-602.
- Pinson P. E. Tejada L. O., Toledo J., Enhkerlin W., Celedonio-Hurtado H., Valle J., Pérez J. N., Liedo P. 2006. Caracterización de la adaptación de *Anastrepha serpentina* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) a condiciones de cría masiva. Folia, Entomol. Mex. 45 (2): 97-112.
- Plummer, C.C., McPhail M., Monk J. W. 1941. The yellow chapote, a native host of the mexican fruit fly. U.S. Dept. Agr. Tech. Bulletin. 775: 1-12.

- Quintero F. J. L., Meza H. J. S., Orozco D. D., Figueroa M. S., Cruz-López L. 2009. Biología y comportamiento sexual del mutante ojos amarillos de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). Acta Zool. Mex. 25 (1): 9-20.
- Rannala B., Mountain J. L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 94: 9197-9201.
- Reyes, A., Ochando M. D. 1997. Fitness of mitochondrial DNA haplotypes in *Ceratitis capitata*. En: Piedade-Guerreiro J. (Ed.) Fruit flies of economic Importance. International Organization on Biological and Integrated control of Noxious Animals and Plants (IOBC). West Palearctic Regional (wprs). Bulletin. 20(8): 175-185.
- Robacker D. C., Hart W. G.. 1985. Courtship and territoriality of laboratory reared Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), in cages containing host and non host trees. Ann. Entomol. Soc. Am. 78: 488-494.
- Roderik G. 1996. Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. Ann. Rev. Entomol., 41: 325-352.
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. Genetics. 145: 1219-1228.
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Noviembre. 2009. Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta. México D. F., México. En: <http://www.senasica.gob.mx>.

Shannon C. E., Weaver W. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

SIAP- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Noviembre 2009. En: <http://www.siap.gob.mx>.

Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 16: 393-430

Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. pp. 3–17. In: L. A. Real (ed.) *Ecological Genetics*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Sivinski J., Burk T. 1989. Reproductive and mating behavior. pp: 343-351. In A.S, Robinson. and G. Hooper (Eds.) *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*. World Crop Pests Vol. 3B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Sivinski J. M. 1993. Longevity and fecundity in the caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae): effects of mating, strain and body size. *Fla Entomol*, 76: 635-644.

Stiling P. 2002. *Ecology, Theories and applications*. Prentice Hall. Upper Saddle River, Nueva Jersey. 347 p.

Sokal R. R., Rohlf F. J., 1995, *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd ed. W.H. Freeman, New York, 887p.

Vargas R. I., Walsh W. A., Kanehisa D., Jang E. B., Amstrong J. W. 1997. Demography of four hawaiian fruit flies (Diptera: Tephritidae) reared a five constants temperatures. *Ann. Entomol. Soc. of Am.* 90: 162-168.

- Verónica-Vallejo R. 2006. Diversidad y estructura genética de poblaciones de *Anastrepha ludens* (Loew) asociadas a diferentes especies huésped en el Soconusco, Chiapas. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. México. pp 35
- Vilardi, J. C., Civetta A., Saidman B. O., Cladera J. L. 1990. Caracterización de tres sistemas isoenzimáticos de adultos de una población de *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera:Tephritidae). Evolución Biológica. 4: 107-118.
- Weir, B. S., Cockerman C. 1984. Estimating F_{st} statistics for the analysis of population structure. Evolution. 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics. 15:323-354.
- Zepeda-Cisneros C. S., Meza S., Ibáñez J., García-Martínez V. 2007. La mosca mexicana de la fruta: Manual de laboratorio para sexado genético. Metapa de Domínguez Chiapas, México. 30pp.

1

Molina-Nery *et al.* : Genetic variation of
Mexican fruit fly in Mexico
Environmental Entomology

Corresponding author

Lorena Ruiz Montoya
Depto. Ecología y Sistemática Terrestre
El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR)
Carr Panamericana y Periférico Sur S/N
Barrio María Auxiliadora. C.P. 29290,
San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México
Tel +967 6749000 ext. 1316
Fax +967 6749000 ext. 1001
lruiz@ecosur.mx

2

3

4

5

**Genetic diversity and gene flow among populations of *Anastrepha ludens*
(Diptera:Tephritidae) in Mexico.**

6

7

8

9

M.C. Molina-Nery¹, L. Ruiz-Montoya¹, C.S. Zepeda-Cisneros² and P. Liedo³

10

11

¹ El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR)-Unidad San Cristóbal. Carr Panamericana y
Periférico Sur s/n, Barrio María Auxiliadora, C.P. 29290, San Cristóbal de las Casas, Chiapas,
México

12

13

14

² Programa Moscafrut. Av. Central Poniente No. 14, 2º Piso, CP 30700, Tapachula, Chiapas,
México

15

16

³ El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR)-Unidad Tapachula, Carretera Antiguo Aeropuerto
km 2.5, CP 30700. Tapachula, Chiapas, México. AP 36.

17

18

19 **Abstract**

20 The genetic diversity and genetic differentiation of *Anastrepha ludens* populations from seven
21 Mexican states (Chiapas, Yucatán, Morelos, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas and
22 Durango) were analyzed. Flies were collected as larvae from infested citrus fruits in each state,
23 after pupation, samples were sent to the laboratory in the “Moscafrut” facility in Metapa,
24 Chiapas, where adults emerged. Genetic diversity was estimated based on expected and
25 observed heterozygosity, mean number of alleles, polymorphism and Shannon diversity index,
26 obtained from allelic and genotypic frequencies of six enzyme loci revealed in cellulose
27 acetate. The degree of differentiation among populations and the rate of gene flow (Nm) were
28 estimated. The likely number of immigrant individuals was estimated by analysis of
29 multilocus genotypes allocation. Expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.199 to 0.330,
30 polymorphism (P) was between 50 and 66%. Genetic differentiation among populations was
31 $F_{ST} = 0.09$. Gene flow (Nm) between pairs of populations ranged from 1 to 37 individuals per
32 generation and was negatively associated with the geographic lineal distance between
33 populations. Multilocus mapping analysis revealed a pattern of asymmetric flow between
34 populations. We concluded that *A. ludens* is a species with relative high genetic diversity and
35 although local populations in Mexico can be genetically differentiated, they are not completely
36 isolated. This genetic diversity results from the interaction between natural selection and gene
37 flow, and both are probably mediated by pest management strategies.

38 **Keywords** : Mexican fruit fly, Population genetics, Gene flow, Genetic diversity, isoenzyme

39

40 **Resumen**

41 Se analizó la diversidad y diferenciación genética de *Anastrepha ludens* de siete estados de
42 México (Chiapas, Yucatán, Morelos, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas and Durango).
43 Las moscas se colectaron en estado de larva en frutos de diferentes especies de *Citrus*. Las
44 moscas en estado de pupa se enviaron al laboratorio facilitado por “Moscafrut” en Metapa de
45 Dominguez (Chiapas) donde los adultos emergieron. La diversidad genética se estimó con
46 base en la heterocigosidad observada (H_o) y esperada y (H_e), número promedio de alelos,
47 porcentaje de polimorfismos e índice de diversidad de Shannon, con base en la resolución de
48 seis loci enzimáticos en acetato de celulosa. El grado de diferenciación entre poblaciones y
49 una estimación indirecta del flujo genético se obtuvo mediante el estadístico F_{ST} . El número
50 probable de inmigrantes se calculó mediante un análisis de asignación multilocus. La
51 heterocigosidad esperada (H_e) osciló entre 0.199 y 0.330, el polimorfismos fue entre 50 y
52 66%. Se registró una diferenciación genética de $F_{ST}=0.09$. El flujo genético entre las
53 subpoblaciones varió de 1 a 37 individuos por generación y estuvo negativamente
54 correlacionado con la distancia geográfica lineal. El análisis de asignación multilocus reveló
55 un patrón de flujo genético asimétrico. Nosotros concluimos que *A. ludens* es una especie con
56 relativo alto nivel de diversidad genética, y las subpoblaciones están moderadamente
57 diferenciadas. La diversidad genética es el resultado de la interacción entre la selección natural
58 local y flujo genético, y ambos son probablemente mediados por las estrategias de manejo
59 fitosanitario.

60

61

62

63 The Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Loew), is widely distributed in Mexico, it has been
64 reported in almost all Mexican states. It has also been recorded in the Southern United States,
65 Belize and Central America (Hernández-Ortíz 1992). It has been found in 22 host plant
66 species, *Sargentia greggii* Wats and *Casimiroa edulis* Llave & Lex of the Rutaceae family are
67 their native hosts. Among commercial crops, *Citrus* spp and *Mangifera indica* are the most
68 important ones (Hernández-Ortíz 1992).

69 The wide range of environmental conditions in which this species is found and its
70 ability to use different, none taxonomically related, plant species as hosts, suggests that this
71 species has considerable evolutionary potential and represents a high risk pest. A species
72 evolutionary potential is closely related to its populations genetic variation. A greater genetic
73 diversity will increase the possibility to respond to natural and human induced environmental
74 changes (Hoy 2003).

75 The patterns of genetic diversity and gene flow can be analyzed using genetic markers
76 such as isoenzymes, which are co-dominant markers. The produced profiles allow deriving
77 reliable estimates of the level of diversity and degree of genetic differentiation (Hillis et al.
78 1996). Genetic diversity and structure of populations is determined by natural selection, by the
79 differential movement of individuals between populations, the type of reproduction and
80 random events (demographic and environmental). Depending on the intensity of each factor
81 and how they interact will be the level of genetic diversity and how it is distributed within and
82 between populations (Slatkin 1994, Hedrick 1997, Groom et al. 2006). Population genetic
83 studies with tephritid species have shown a wide range of genetic diversity (H_e). In *Ceratitis*
84 *capitata* (Wied), using iso-enzymes, heterozygosity values have been between $H_e = 0.005$ and

85 $H_e = 0.186$ (Huettel et al. 1980, Gasperi et al. 1987, Villardi et al. 1990). This variation has
86 been attributed mainly to the geographic origin of the populations sampled. In *Rhagoletis*
87 *pomonella* (Walsh), chromosomal inversion and genetic differentiation associated to host fruit
88 was found from enzyme analysis (Feder et al. 2003). High levels of genetic variation were
89 found in *A. ludens* populations from Chiapas, and this could be attributed to the distance
90 between populations, and in a lesser extent, to the host fruits (Verónica-Vallejo 2006).

91 Knowledge on genetic variability and its distribution among populations of tephritid
92 species has been useful for pest management strategies (Reyes and Ochando 1998, Davies et
93 al. 1999). So far, the genetic diversity of *A. ludens* has not been studied, despite its importance
94 as a citrus and mango pest. Our goals in this study were to determine: (1) the genetic diversity
95 of *A. ludens* populations from seven different states in Mexico, (2) the levels of gene flow
96 between populations, and (3) the relationship between genetic differentiation and geographic
97 distance. This could contribute to better understand how isolated the different populations are
98 and their implications for pest management strategies.

99

100 **Materials and Methods**

101 **Collection Sites.** *A. ludens* flies were collected as larvae from infested citrus fruits
102 (*Citrus aurantium* L., *C. sinensis* Osbeck, *C. paradisi* Makfad.) in Chiapas, Durango,
103 Morelos, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz and Yucatán during September 2008 and
104 January 2009. Table 1 shows the different climate, mean annual temperature, main natural
105 vegetation, altitude over sea level, the decimal coordinates and the hosts collected in each
106 location. Collections were made in small orchards of 500 to 10,000 m².

107 **Sampling.** Fruits infested with third instar larvae were selected at random. These fruits

108 were taken to the local laboratory where larval development was completed. The larvae ready
109 to pupate were placed in containers with vermiculite. After pupation, the insects were mixed
110 and shipped as pupae from the different locations to the Genetic Sexing Laboratory of the
111 “Moscafrut” facility in Metapa, Chiapas, Mexico. Here, the pupae were maintained at 26°C
112 and 70% RH until adult eclosion.

113 **Genetic Analysis.** When adults were 15 days-old, a random sample of 40 individuals
114 (20 males and 20 females) from each location was taken. Adult flies were individually placed
115 in vials, frozen at -70°C temperature and conserved in these conditions until the
116 electrophoresis test. Six enzymatic loci were obtained as genetic markers: 6-
117 Phosphogluconate Dehydrogenase (6PGDH, EC1.1.1.44), Aspartate Amino Transferasa (GOT,
118 EC 2.6.1.1), Glucose-6-Phosphate Isomerasa (GPI, EC 5.3.1.5), Isocitrate Dehydrogenase
119 (IDH, EC 1.1.1.42), Malate Dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), Malic Enzyme (ME, EC
120 1.1.1.40); using CAMMP to pH 7.0 as electrophoresis buffer (see Herbet and Beaton 1994).
121 Each individual adult was macerated in 250 µl of a solution of CAAMP- pH 7.0 and
122 centrifuged at 13,000 rpm during 3 min. The supernatant was used for enzyme separation
123 through electrophoresis in cellulose acetates.
124 Electrophoresis separation was carried out at room temperature, at 55V and 30 mA during 150
125 minutes. The different loci were recognized based on the staining pattern and the number of
126 individuals for each enzyme genotype was recorded. The percent of polymorphism, and
127 genotypic and allelic frequencies were estimated for each population. The deviations of f from
128 Hardy-Weinberg equilibrium (HW) were examined by χ^2 (Chi-square) tests. HW expected
129 (H_e) and observed (H_o) heterocygosity of each population was used as a measure of genetic
130 diversity. The fixation index (f) was calculated by $f = 1 - H_o / H_e$. The deviations from zero

131 were tested by $\chi^2 = Nf^2$ with one degree of freedom (Nei 1977). Also, the Shannon diversity
132 index (S) per loci was estimated. The differences among populations in genetic diversity,
133 expressed as H_e and S , were analyzed by ANOVA. The relationship of genetic diversity (H_e)
134 with mean annual temperature and altitude was analyzed by lineal regression with $\arcsen(x)^{1/2}$
135 transformed data for H_e and \log_{10} transformed data for altitude.

136 The genetic similarity among populations was estimated by Nei's genetic distance (Nei
137 1972), after an UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) analysis, and
138 the reliability of groups was evaluated by bootstrap analysis. The effect of inbreeding was
139 estimated using f , F , and θ statistics from Weir and Cockerham (1984), which are equivalent
140 to Wright's (1951) F -statistics or Hierarchy Fixation index F_{IS} , F_{IT} , and F_{ST} , respectively. The
141 differentiation among population was estimated using F_{ST} (Weir and Cockerham 1984).
142 Jackknife and Bootstrap methods were used to obtain standard errors and confidence intervals
143 of F -statistics. For each locus and average, F_{ST} deviation from zero was tested by means of a
144 Chi-squared test $\chi^2 = 2NF_{st}(k-1)$, where k is the number of alleles, N the total number of
145 analyzed organisms, and $(k-1)(s-1)$ degrees freedom, where s is the number of subpopulations
146 (Workman and Niswander 1970). The statistical test for F_{IS} and F_{IT} was obtained by
147 $\chi^2 = (F's)^2 N(k-1)$, with $k(k-1)$ degrees of freedom (Nei 1977). The genetic descriptions and
148 analysis were made using the "Tools for Population Genetic Analysis" program (TFPGA,
149 Miller 1997).

150 F_{ST} was used to estimate indirectly gene flow (Nm) between pair of population. The
151 gene flow expressed as the number of individuals that move between two populations per
152 generation (Nm) is related with the degree of genetic differentiation (F_{ST}) by the function

153 $F_{ST} \approx 1/(4Nm+1)$, thus Nm can be calculated by $Nm \approx \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$ (Slatkin 1985, 1994), in this
154 way indirect estimation of gene flow (Nm) between pairs populations were estimated. To
155 analyze whether the genetic structure describes an isolation by distance, a regression analysis
156 was done between Nm and lineal geographic distances (km), both variables were previously
157 transformed to \log_{10} (Slatkin 1994). As an alternative method to test isolation by distance, the
158 $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ratio, was used instead of Nm in the regression. The $F_{ST}/(1-F_{ST})$, ratio is
159 approximately $1/4Nm$ and better fits with geographic distance and migration estimation with
160 direct methods (Rousset 1997). Both genetic isolation tests by distance assume an absolute
161 number of individual migrants between pairs of populations. For *A. ludens* populations, it
162 might be relevant to detect the number of immigrants and possible origin. This is why the
163 number of immigrants or offspring of recently immigrants and their probable origin was
164 detected as the probability of a given multilocus genotype was produced by parents of the
165 same or a different population, using the allocation IMMANC analysis (Rannala and
166 Mountain 1997). This analysis assumes that different loci are independently segregated and
167 are in linking equilibrium. The allocation critic value is the \ln of the ratio between the
168 probability that the genotype of an individual occurred in the population of which was
169 collected and the probability of occurrence in a different population:

$$170 \quad \ln A = \ln P_c - \ln P_i$$

171 where P is the probability that the multilocus genotype has been formed in the collected
172 population (c) or in another population (i). A negative value indicates that it is highly likely
173 that a given multiloci genotype was derived from a different population (Rannala and
174 Mountain 1997). When one individual had more than one probable origin, the origin was

175 assigned to the state with the lowest significance value (α), as recommended by Rannala y
176 Mountain (1997).

177

178 **Results**

179 **Genetic diversity.** Only one locus was visualized for all enzymes. Two out of six loci
180 were monomorphic for all populations (GPI and MDH), for 6PGDH and GOT two alleles
181 were recorded, and three for IDH and ME. The largest mean number of alleles was recorded
182 from Morelos and the lowest from Durango and Yucatán (Table 2). The percentage of
183 polymorphism was the same in six populations (66.7 %), in Durango it was 50% (Table 2).
184 The expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.199 to 0.330. The lowest H_e value was
185 recorded from the Durango population and the greatest from San Luis Potosí. The observed
186 heterozygosity (H_o) was always lower than the expected one and ranged from 0.111 to 0.302
187 (Table 2). Consequently, f values (fixation index) were positive and different from zero,
188 except in San Luis Potosí Tamaulipas and Yucatán (Table 2). f values close to zero suggest
189 Hardy-Weinberg equilibrium.

190 Lineal regression analysis showed a negative correlation between genetic diversity (H_e)
191 and altitude (mosl), genetic diversity increases as altitude decreases (Fig. A). The relationship
192 between H_e and the mean annual temperature was positive (Fig. 1 B), as temperature increases,
193 there is greater genetic diversity.

194 According to Shannon diversity index (S), Veracruz was the most diverse population
195 and the least diverse population was Durango (Table 2). However, the analysis of variance do
196 not detected significant differences among populations ($F=0.115$; $f.d. = 6/41$; $P > 0.05$).

197 Table 3 shows the polymorphic loci that were under equilibrium for each population.

198 There were no loci under equilibrium in Morelos. In Chiapas, Veracruz and Durango, only one
199 locus was under equilibrium, in Yucatán and San Luis Potosi two, and three in Tamaulipas.

200 In the cluster analysis (UPGMA), two groups were recognized (Fig. 2): one formed by
201 the populations from Yucatán, Tamaulipas and Chiapas (genetic distance = 0.017). The
202 population from Durango is attached to this group (genetic distance = 0.042). The other group
203 is formed by the populations from Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí and Morelos
204 (genetic distance 0.043). Bootstrap values were below 45% for all groups; this indicates a low
205 frequency of formation of the different nodes in 1000 permutations conducted (Fig. 2)

206 **Population Structure and Gene Flow.** According to F -statistics, there is an average
207 probability of 0.362 that an individual of all the seven populations will be endogamic by
208 ancestry (F_{IT}), while within each population the probability was 0.297 (F_{IS}). High levels of
209 inbreeding were shown by 6GPDH y GOT. The F_{ST} indicates that 91% of the genetic variation
210 is distributed within the seven populations and they only differ in 9%, which suggests a
211 moderate level of differentiation among populations (Table 4).

212 The number of individuals that move between population pairs ranged from 1 to 37
213 individuals per generation (Nm) (Table 5). Nm values were categorized and expressed in a
214 map including the different pest management strategies to see possible explanations of gene
215 flow due to pest control strategies (Fig. 3). The largest exchange of individuals (37) was
216 recorded between Tamaulipas, a low prevalence area, and Yucatán, an area under pest control
217 activities, with a lineal geographic distance of 855 km (Table 5, Fig. 3). The lowest flow (0.7)
218 was between Durango, a low prevalence zone, and Veracruz, an area under pest control
219 activities, with a lineal geographic distance of 893 km. The lowest lineal geographical distance
220 was between San Luis Potosí and Veracruz (152 km) with five individuals moving between

221 populations. Both areas are under pest control activities. The longest lineal distance (1,569
222 km) was between Chiapas, under pest control activities, and Durango, a low prevalence area,
223 with 3 individuals moving between populations per generation. According to the stepping-
224 stone or isolation by distances model, a significant negative correlation was found between the
225 number of migrating individuals (Nm) and the geographic distance ($r = -0.458, P < 0.05$; Figure
226 4A), gene flow decreased 27% per km. The $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ratio was closer related to the
227 geographic distance than Nm ($r = 0.869, P < 0.05$; Fig. 4B). This confirms that the population
228 structure follows an isolation model by distance, and in average, there are seven individuals
229 moving among populations.

230 The multilocus genotype analysis suggested that 59 individuals are immigrants and that
231 immigration is asymmetric. For example, Chiapas has 12 possible immigrants coming from
232 different states, while only Durango and Tamaulipas have immigrants from Chiapas (Table 6).

233

234 **Discussion**

235 Genetic diversity of *A. ludens* populations in Mexico was high, H_e ranged from 0.199
236 to 0.330. Under Hardy-Weinberg equilibrium, the maximum possible genetic diversity is 0.5.
237 A possible explanation for the maintenance of this high diversity could be the large
238 population sizes, due to the longevity and high fecundity rates of this species (Leyva et al.
239 1991, Liedo et al. 1992, Carey et al. 2005). However, expected heterozygosity values (H_e)
240 were greater than observed values (H_o), indicating that heterozygosity is reduced, partly by
241 inbreeding. The lekking mating behaviour of this species, where one dominant male could
242 account for a large fraction of the total number of matings (Burk 1981, Robacker and Hart
243 1985, Sivinski and Burk 1989), could explain this level of inbreeding. Another possible

244 explanation could be if adults coming from the same fruit, mate among them, as has been
245 suggested for *A. fraterculus* (Alberti et al. 1999). High levels of inbreeding were also found in
246 *A. ludens* populations from the Soconusco region, in Chiapas ($F= 0.682$, Verónica-Vallejo
247 2006).

248 The average genetic diversity ($H_e = 0.286$) that we found in this study for *A. ludens* is
249 greater than the one reported for other tephritids. Morgante and Malvasi (1985) found $H_e =$
250 0.03 for *A. fraterculus*. In *Ceratitis capitata*, the range was between 0.022 and 0.48 (Milani et
251 al. 1989). Bonnizzoni et al. (2001) and Meixner et al. (2002) reported lower genetic diversity
252 for *C. capitata* in California, but here this is an invasive species and this lower diversity can be
253 explained as the bottle-neck of a colonization process (Carey 2010).

254 There was a moderate differentiation among populations from different geographic
255 origin. The moderated genetic differentiation among populations could be attributed to
256 selection pressures associated to the environmental conditions. This was reflected in a clinal
257 variation pattern of genetic diversity (H_e) with respect to altitude and temperature.
258 Differentiation due to natural selection, and even genetic drift, has been reported for other
259 tephritid species, such as *C. capitata* and *A. fraterculus* (Morgante et al. 1985, Reyes y
260 Ochando and Ochando 1997, Reyes and Ochando 1998, Alberti et al. 1999, 2002).

261 The altitude factor itself is not selective, but it is associated with other factors that
262 could exert selection. Temperature is an example, which was associated to genetic diversity,
263 and it is known that influences developmental time and reproductive rates of many insect
264 species, including tephritid fruit flies (Bale et al. 2002, Fletcher 1989). Since developmental
265 time and reproductive rates are important fitness components, their variation will invariably
266 affect the genetic structure of populations. Other selective factors could be associated to the

267 type, availability and nutritional quality of hosts, and the presence of natural enemies
268 (Malavasi and Morgante 1981, Carey 1984, Krainacker et al 1987, Leyva et al. 1991, Aluja et
269 al. 2003, Díaz-Fleischer and Aluja 2003, Silva et al. 2010).

270 *A. ludens* genetic diversity, resulted from different environmental conditions, could be
271 reduced by gene flow. The effect of gene flow in genetic populations structure depends on the
272 organisms movement capacity and their ability to overcome geographic and ecological
273 barriers. Isolation due to distance is one of the most common and simple mechanism to
274 decrease gene flow. As distance between populations increases, gene flow decreases (Rousset
275 1997, Slatkin 1994). Our results here are in agreement with this isolation model, the regression
276 model explains 46 % of the variation, and it increased to 87% when the $F_{ST}/1-F_{ST}$ ratio was
277 used for gene flow estimation. Other factors, such as pest management activities, could affect
278 gene flow rates. The Mexican Fruit Fly Campaign divides the national territory in three pest
279 management regions, according to fruit flies presence and population densities: 1) fruit fly free
280 zones, 2) low prevalence zones, and 3) pest control zones (Fig. 3). Durango has 32 counties /
281 municipalities free of fruit flies and the rest (39) is under low prevalence. San Luis Potosí has
282 21 under fly free condition, 17 under low prevalence and the rest (22) under pest control.
283 Tamaulipas has 27 municipalities under low prevalence and the rest (43) is under pest control.
284 The other four states (Chiapas, Yucatán, Morelos and Veracruz) are under pest control
285 activities. These categories represent different management strategies and fruit movement is
286 only allowed within areas under the same category (SENASICA 2009). This suggests that the
287 gene flow patterns could partially be explained by human activities (Oliver 2006),

288 Durango was the state with the lowest gene flow (Nm) to the other populations, and
289 among the states with lower number of immigrants. In addition to distance, its status regarding

290 fruit fly condition (free/low prevalence condition) represents a barrier to gene flow.
291 Tamaulipas was the state with the greatest gene flow rate, especially with Yucatán (Table 5).
292 This could be explained because of *A. ludens* was probably originated in this region, where the
293 availability of its native host, *S. gregii* is greater (Plummer et al. 1941, Baker et al. 1944,
294 Hernández-Ortiz 1992). It is possible then, that the fly population that has been established in
295 this area is one of the oldest (Hernández-Ortiz 1992), and has moved to other parts of the
296 country, facilitated by the establishment of *Citrus* spp. crops, in some cases with large surfaces
297 (SIAP 2009). San Luis Potosí has an relatively high gene flow rate with Veracruz (interchange
298 5 individuals per generation), Yucatán (7) and Tamaulipas (7). This high rate could be
299 explained by the shorter distances between San Luis Potosí, Veracruz and Tamaulipas (<223
300 km). In the case of Yucatan, distance could not explain this high gene flow rate. Despite the
301 short distance between Morelos and San Luis Postosí (333 km) gene flow was low (3). This
302 could be explained by the mountain range between these two locations. Movement among
303 Chiapas, Yucatán, Veracruz and Morelos could be easier because of short distances (<903 km)
304 and because of lower restrictions to fruit movement, since these are areas under the same pest
305 control status. To determine the genealogy of populations, molecular markers based on higher
306 resolution, such as those based on genomic DNA, could be used in the future (Reyes and
307 Ochando 1998, Avise 2000).

308 Yucatan, Tamaulipas, Chiapas and Durango were genetically similar (Fig.2), despite
309 the distance that separates them. Yucatan and Tamaulipas exchange 37 individuals (Nm).
310 Considering the long distance between these two locations and the different phytosanitary
311 status, an alternative explanation could be the direct movement of fruits between these two
312 locations. Chiapas is geographically closer to Yucatan, and this could explain why they are

313 genetically similar.

314 The allocation multilocus analysis (Table 6) revealed a qualitatively similar pattern, but
315 with some specific differences. This analysis shows that gene flow is asymmetric. For example
316 Tamaulipas has immigrants from Veracruz, but Veracruz has not immigrants from
317 Tamaulipas, which is odd given their proximity. Chiapas was the state that received more
318 immigrants from virtually every state, but fewer individuals leave Chiapas.

319 Both analysis of gene flow indicate that there is sufficient interchange among
320 populations to reduce genetic differentiation. According to Wright (1951), one migrant
321 individual is enough to produce genetic homogeneity among populations.

322 Our results provide evidence that *A. ludens* populations are genetically diverse and that
323 they are under differential selection factors. The effect of this selection factors is decreased by
324 the gene flow rates, and these rates are affected mainly, by the distance between populations
325 and the movement of host fruits that is regulated by pest control measures. In conclusion, the
326 patterns of genetic diversity of *A. ludens* populations in citrus hosts in Mexico, are the result of
327 the interaction of natural selection and gene flow, and both are associated to the environmental
328 conditions and pest management measures.

329

330 **Acknowledgments**

331 We thank the support from the “Campaña Nacional Contra Moscas de la Fruta” (CNCMF) for
332 the collections of *A. ludens* in several states of Mexico, and to the staff of the Genetic Sexing
333 Laboratory at the “Moscafrut” facility for collections in Chiapas and laboratory facilities.
334 Financial support was provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
335 México, through grant: SEP-CONACYT 2003-CO-43824 (granted to PLF-LRM); and by

336 scholarship to MCMN (CVU/Becario: 249165/213435), this is a partial fulfillment for her
337 Master of Science degree.

338

339 **References Cited**

340 Avise, J. C. 2000. Phyllogeography: The history and formation of species. Harvard University
341 Press, Cambridge, Massachusetts.

342 Alberti, A. C., G. Calcagno, B. O. Saidman, and J. C. Villardi. 1999. Analysis of the genetic
343 structure of natural population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Ann.
344 Entomol. Soc. Am. 92: 731-736.

345 Alberti, A. C., M. S. Rodriguez, P.G. Cendra; B. O. Saidman and J. C. Villardi. 2002.
346 Evidence indicating that Argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera:
347 Tephritidae) belong to a single biological species. Ann. Entomol. Soc. Am. 95: 505-
348 512.

349 Aluja, M., D. Pérez-Staples, R. Macías-Ordoñez, J. Piñero, B. McPherson and V. Hernández-
350 Ortíz. 2003. Nonhost status of *Citrus sinensis* cultivar valencia y *C. paradisi* cultivar
351 Ruby Red to Mexican *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol.
352 96: 1693-1703.

353 Bale, J. S., G. J. Masters, I. D. Hodkinson, C. Awmack, T. M. Bezemer, V. K. Brown, J.
354 Butterfield, A. Buse, J. C. Coulson, J. Farrar, J. E. G. Good, R. Harrington, S. Hartley,
355 T. H. Jones, R. L. Lindroth, M. C. Press, I. Symrnioudis, A. D. Watt and J. B.
356 Whittaker. 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising
357 temperature on insect herbivores. Glob. Change Biol. 8: 1-16.

358 Baker, A. C., W. E. Stone, C. C. Plummer, and M. McPhail. 1944. A review of studies on the

359 Mexican fruitfly and related Mexican species. United States Department of
360 Agriculture, Miscellaneous Publication No. 531, Washington D.C.

361 Bonnizzoni, M., L. Zheng, C. R. Gulielmino, D. S. Haymer, G. Gasperi, L. M. Gomulki and
362 A. R. Malacrida. 2001. Microsatellite analysis of medfly bioinfestations in California.
363 Mol. Ecol. 10: 2515-2524.

364 Burk, T. 1981. Signaling and sex in acalyprate flies. Fla. Entomol. 64: 30-43.

365 Carey, J. R. 1984. Host-specific demographic studies of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis*
366 *capitata*. Ecol. Entomol. 9: 261-270.

367 Carey, J. R. 2010. The Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) invasion on California
368 deepens: Response to an alternative explanation for recurring. Am. Entomol. 56: 158-
369 163.

370 Carey, J. R., P. Liedo, H. G. Müller, J. L. Wang, D. Senturk and L. Harshman. 2005.
371 Biodemography of a long-lived tephritid: Reproduction and longevity in a large cohort
372 of female Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*. Exp. Geront. 40: 793-800.

373 CONABIO. 2010. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
374 Temperatura media anual (shape file) de los municipios del Territorio Nacional
375 Mexicano. Consulted in August 2010 <http://www.conabio.gob.mx>

376 Davies, N., F. X. Villablanca and G. K. Roderick. 1999. Bioinvasions of the Medfly *Ceratitis*
377 *capitata*: Source estimation using DNA sequences at multiple intron loci. Genetics
378 153: 351-360.

379 Díaz-Fleisher, F. and M. Aluja. 2003. Influence of conspecific presence, experience and host
380 quality on oviposition behavior and clutch size determination in *Anastrepha ludens*
381 (Diptera: Tephritidae). J. Insect Behav. 16: 537-554.

382 Feder J. L., J. B. Roethele, K. Filchak, J. Niedbalsky and J. Romero-Severson. 2003.
383 Evidence for inversion polymorphism related to sympatric host race formation in the
384 apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*. Indiana. Genetics 163: 939-953.

385 Fletcher, B. S. 1989. Temperature – Development rate relationships of the immature stages
386 and adults of Tephritid fruit flies, pp. 273-289. In A. S Robinson. and G. Hooper
387 (eds.) Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control. World Crop Pests Vol.
388 3B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

389 Gasperi, G., A. R. Malacrida y R. Milani. 1987. Protein variability and population genetics of
390 *Ceratitidis capitata*, pp. 149-175. In A. P. Economopoulos (ed.) Fruit Flies: Proceedings
391 of the Second International Symposium. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The
392 Netherlands.

393 Groom, J. M., G. M. Meffe y C. R. Carroll. 2006. Principles of Conservation Biology.
394 Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts,

395 Hedrick, W. P. 1997. Genetics of Populations. 2a Edition. Jones and Bartlett Publishers.
396 Sudbury, Massachusetts USA.

397 Herbet, P. D. N. and M. J. Beaton 1994. Methodologies for Allozyme Analysis Using
398 Cellulose Acetate Electrophoresis. Helena Laboratorios, Texas, USA.

399 Hernández-Ortíz, V. 1992. El género *Anastrepha* en México (Diptera-Tephritidae)
400 Taxonomía, distribución y sus plantas hospederos. Instituto de Ecología. Sociedad
401 Mexicana de Entomología. Xalapa, Veracruz, México.

402 Hillis, D. M., C. Moritz and B. K. Mable 1996. Molecular Systematics, 2a ed. Sinauer
403 Associates Inc. Sunderland, Massachusetts.

404 Hoy, J. A. 2003. Insect Molecular Genetics, an introduction to principles and applications,

405 2ed. Academic Press, San Diego, California.

406 Huettel, M. D., P. A. Fuerst, T. Maruyama and R. Chacraborty. 1980. Genetics effects of
407 multiple population bottlenecks in the Mediterranean fruit flies (*Ceratitidis capitata*)
408 Genetics. 94: 43-47.

409 INAFED. 2005. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. 2005.
410 Secretaría de Gobernación, México. Consulted November 2009
411 <http://www.inafed.gob.mx>

412 Krainacker, D. A, J. R Carey and R. I. Vargas. 1987. Effect of larval host on life history traits
413 of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. Oecologia 73: 583-590

414 Leyva, J. L., H. W. Browing and F. E. Gilstrap. 1991. Development of *Anastrepha ludens*
415 (Ditera: Tephritidae) in several host fruits. Env. Entomol. 20: 1160-1165

416 Liedo, P., J. R. Carey, H. Celedonio, and J. Guillen. 1992. Size specific demography of three
417 species of *Anastrepha* fruit flies. Entomol. Exp. Appl. 63: 135-142.

418 Malavasi, A. and J. S. Morgante. 1981. Adult and larval population fluctuation of *Anastrepha*
419 *fraterculus* and its relationship to host availability. Environ. Entomol. 10:275-278.

420 Meixner, M. D., B. A. McPherson, J. G. Silva, G. E. Gasparich and W.S. Sheppard. 2002. The
421 Mediterranean fruit fly in California: evidence for multiple introductions and persistent
422 populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. Mol. Ecol. 11:
423 891-899.

424 Milani, R., G. Gasperi and A. Malacrida. 1989. Biochemical genetics, pp. 33-56. In A. S.
425 Robinson and G. Hopper (eds.). Fruit flies their biology, natural enemies and control.
426 World Crop Pests Vol. 3B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

427 Miller, M. P. 1997. TFGPA 1.3. Tools for population genetics analysis: A Windows program

428 for the analysis of allozymes and molecular population genetic data. Northern Arizona
429 University, Arizona.

430 Morgante J. S. and A. Malvasi. 1985. Genetic Variability in populations of the south
431 American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (*Tephritidae*). Rev. Brazil. Genet. 8:241-
432 247.

433 Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292

434 Nei, M. 1977. *F*-Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Ann.
435 Hum. Gen.41: 225-233.

436 Oliver, J. C. 2006. Population genetic effects of human-mediated plant range expansions on
437 native phytophagous insects. Oikos 112: 456-463.

438 Plummer, C. C., M. McPhail and J. W. Monk. 1941. The Yellow Chapote, a native host of the
439 Mexican fruitfly. U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. 775: 1-12.

440 Rannala, B. and J. L. Mountain . 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes.
441 Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 94, 9197-9201.

442 Reyes, A. and M. D. Ochando. 1997. Fitness of mitochondrial DNA haplotypes in *Ceratitis*
443 *capitata*. En: Piedade-Guerreiro J. (ed.) Fruit Flies of Economic Importance.
444 International Organization on Biological and Integrated Control of Noxious Animals
445 and Plants (IOBC). West Palearctic Regional (wprs). Bulletin. 20: 175-185.

446 Reyes, A. and M. D. Ochando. 1998. Genetic differentiation in Spanish populations of
447 *Ceratitis capitata* as revealed by abundant soluble protein analysis. Genetica 104: 59-
448 66.

449 Robacker, D. C., and W. G. Hart. 1985. Courtship and territoriality of laboratory reared
450 Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), in cages containing host

451 and non host trees. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78: 488-494.

452 Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-Statistics under
453 isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.

454 SENASICA 2009. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
455 Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta. México D. F., México. Consulted
456 November 2009 <http://www.senasica.gob.mx>.

457 SIAP. 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Noviembre 2009.
458 Consulted November 2009 <http://www.siap.gob.mx>.

459 Silva, J. G., V. S. Dutra, M. S. Santos, N. M. O. Silva, D. B. Vidal, R. A. Nink, J. A.
460 Guimaraes and E. L. Araujo. 2010 Diversity of *Anastrepha* spp. (Dipera: Tephritidae)
461 and associated braconid parasitoids from native and exotic hosts in southeastern Bahia,
462 Brazil. *Env. Entomol.* 39: 1457-1465.

463 Slatkin M. 1985. Gene flow in Natural Populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393-430.

464 Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. pp. 3–17. *In* L. A. Real (ed.)
465 *Ecological Genetics*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

466 Sivinski J. and T. Burk. 1989. Reproductive and mating behaviour. pp: 343-351. *In* A.S,
467 Robinson. and G. Hooper (Eds.) *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and*
468 *Control*. World Crop Pests Vol. 3B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

469 Verónica-Vallejo, R. 2006. Diversidad y estructura genética de poblaciones de *Anastrepha*
470 *ludens* (Loew) asociadas a diferentes especies huésped en el Soconusco, Chiapas. Tesis
471 de licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

472 Villardi, J. C., A. Civetta, B. O. Saidman and J. L. Cladera. 1990. Caracterización de tres
473 sistemas isoenzimáticos de adultos de una población de *Ceratitidis capitata* Wied.

- 474 (Diptera:Tephritidae). *Evolución Biológica*. 4:107-118
- 475 Weir, B. S. and C. Cockerman. 1984. Estimating F -statistics for the analysis of population
476 structure. *Evolution* 38: 1358-1370
- 477 Workman, P.L. Niswander J.D. 1970. Populations studies on southwestern Indian tribes II.
478 Local genetic differentiation in the Papago. *Amer. J. Hum. Gen.* 22: 24-49
- 479 Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Ann Eugenics* 15: 323-354

480

481

482

483

Table 1. Characteristics of the collection sites of *Anastrepha ludens* in seven Mexican states. MAT, Mean annual temperature; NSV, Natural surrounding vegetation; mosl, meter over sea level; decimal coordinates of municipality: LW, longitude west; LN latitude North.

State	Municipality	Collection sites	Host	Climate ^a	MAT ^a (°C)	NSV ^b	mosl	Decimal coordinates LW, LN(UTM)
Chiapas	Comitán	Comitán, Tzimol	<i>C. aurantium</i>	Warm temperate- sub humid	17.6	Pine-Oak forest	1660	-92.134, 16.251
Morelos	Ocuituco	Tlacotepec, Ocuituco	<i>C. sinensis</i>	Warm-humid	15.7	Pine-Oak forest	1920	-98.773, 18.872
Yucatán	Hunucmá	Hunucmá	<i>C. aurantium</i>	Warm-semidry	25.5	Tropical dry forest	8	-89.899, 21.026
Veraacruz	Temapache	Sombrenete, Camelia, Nuevo Jalisco, Morallilo	<i>C. aurantium</i> , <i>C. paradisi</i>	Warm-sub humid	22.4	Tropical semi- evergreen forest	40	-97.639, 21.065
San Luis Potosí	Axtla de Terrazas	Casas Viejas	<i>C. paradisi</i>	Warm-humid	22.5	Tropical semi- evergreen forest	100	-98.875, 21.438
Tamaulipas	Villa de Guemez	Guemez	<i>C. sinensis</i>	Warm-semidry	17.6	Tropical dry forest	145	-99.007, 23.919
Durango	Pueblo Nuevo	La Presa, Pie de Cuesta	<i>C. aurantium</i> , <i>C. paradisi</i>	Warm-sub humid	14.6	Thorn scrub forest Tropical dry forest Thorn scrub forest	2500	-108.385, 27.462

484 ^aSource CONABIO (web site consulted in 2010, ^bSource INAFED (web site consulted at 2010)

485 **Table 2. Genetic diversity of *Anastrepha ludens* populations in México. *N*, sample size; *P*,**
 486 **percentage of polymorphism; *S*, Shannon Diversity index; *H_o*, observed heterozigosity;**
 487 ***H_e*, expected heterozigosity; and *f*, Fixation index ($f=1- H_o / H_e$).**

State	N	Allele average	P	<i>S</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>f</i>
Chiapas	40	1.7	66.7	0.434	0.171	0.266	0.357*
Morelos	40	1.9	66.7	0.435	0.111	0.274	0.595**
Yucatán	40	1.6	66.7	0.494	0.302	0.307	0.016 ^{NS}
Veracruz	40	1.7	66.7	0.497	0.200	0.318	0.371*
San Luis Potosí	36	1.7	66.7	0.494	0.285	0.330	0.136 ^{NS}
Tamaulipas	32	1.7	66.7	0.489	0.280	0.310	0.097 ^{NS}
Durango	40	1.6	50.0	0.340	0.113	0.199	0.432**
Average	38	1.7	64.3		0.209	0.286	0.286 ^{NS}

488 ^{NS}, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

489

490 **Table 3. χ^2 (Chi-square) statistics to test Equilibrium of Hardy-Hardy Weinberg in**
 491 **Mexican populations of *Anastrepha ludens*.**

State	Enzymatic loci			
	6PGDH	GOT	ME	IDH
Chiapas	20.00**	32.38**	9.90*	3.40 ^{NS}
Morelos	40.00 **	16.61*	27.30**	10.47**
Yucatán	36.00**	1.75 ^{NS}	6.46 ^{NS}	11.40**
Veracruz	25.15**	28.07**	0.32 ^{NS}	12.52**
San Luis Potosí	0.89 ^{NS}	17.82**	0.34 ^{NS}	15.59**
Tamaulipas	1.98 ^{NS}	0.049 ^{NS}	0.62 ^{NS}	15.05**
Durango	Fix	32.01**	18.97**	7.71 ^{NS}

^{NS}, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

492

493

494 **Table 4. *F*-statistics for Mexican populations of *Anastrepha ludens*. CI, Confidence**
 495 **interval at 95%;**

Locus	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
6PGDH	0.695**	0.066**	0.673**
GOT	0.648**	0.097**	0.610**
IDH	0.162*	0.108**	0.061 ^{NS}
ME	0.188**	0.083**	0.114 ^{NS}
Average	0.362**	0.092**	0.297**
Jackknifing	0.345	0.093	0.278
SD	0.147	0.008	0.163
95 % CI from Bootstrapping	0.663-	0.105-	0.631-
(over loci), Lower-upper	0.171	0.076	0.079

496 ^{NS}, no significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

497

498 **Table 5. Number of migrants (Nm) exchanged among populations per generation of**
 499 ***Anastrepha ludens* in Mexico, calculated by $Nm = [(1/F_{ST}) - 1]/4$. Nm , values rounded above**
 500 **of diagonal and geographic distance (km) below the diagonal.**

501

State	Chiapas	Morelos	Veracruz	Yucatán	San Luis	Tamaulipas	Durango
					Potosí		
Chiapas		2	2	13	2	8	3
Morelos	676.25		4	3	3	4	1
Veracruz	691.50	246.22		3	5	7	1
Yucatán	595.17	903.13	738.15		7	37	3
San Luis	842.85	333.91	152.50	831.19		6	1
Potosí							
Tamaulipas	1001.29	556.51	349.59	854.91	222.60		1
Durango	1569.47	917.45	893.00	1563.15	755.79	717.11	

502

503

504

505

506 **Table 6. Number of possible immigrants of *Anastrepha ludens* detected by multilocus**
 507 **genotype analysis (IMMANC test, Rannala and Mountain 1997).**

508

Collect State	Immigrant from							Number of Immigrants
	Chis	Dgo	Mor	SLP	Tam	Ver	Yuc	
Chiapas (Chis)		4	3	1	1	0	3	12
Durango (Dgo)	5		0	1	0	1	0	7
Morelos (Mor)	0	1		2	0	3	0	6
San Luis Potosi (SLP)	0	2	0		1	2	1	6
Tamaulipas (Tam)	3	0	3	2		3	0	11
Veracruz (Ver)	0	4	1	4	0		0	9
Yucatán (Yuc)	0	1	1	2	2	2		8
								59

509

510

511 Figure 1. Regression analysis of expected Heterozygosity (H_e) on log of altitude and (A)
512 annual mean temperature (B), of populations of *Anastrepha ludens* in Mexico. Numbers
513 within graph A are altitude (mosl) without transformation.

514

515 Figure 2. UPGMA tree bases on Nei's genetic distance. Number at base of each cluster is
516 bootstrap probability on 1000 iterations.

517

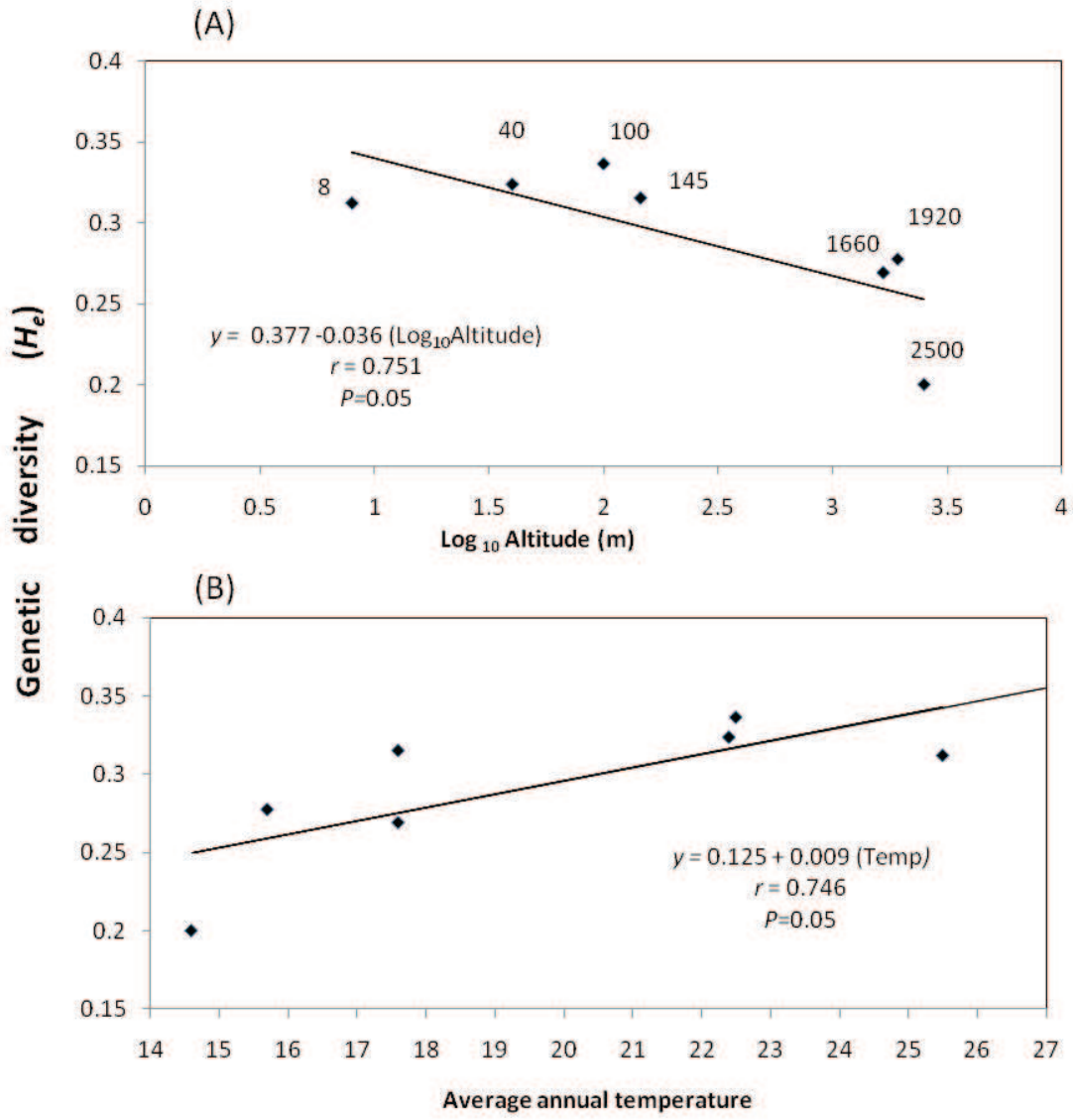
518 Figure 3. Illustration of gene flow (Nm) in pair wise comparison of populations of *Anastrepha*
519 *ludens* in México. The color indicate the status of population control (SENASICA, 2009) and
520 line show the number of individual that move between pair of populations (Nm).

521

522 Figure 4. Regression analysis of gen flow on geographic distance (km). (A) Regression of
523 $\log_{10}(Nm)$ on $\log_{10}(\text{km})$. (B) Regression of $F_{ST}/(1-F_{ST})$ on $\log_{10}(\text{km})$

524

525



527

528

529

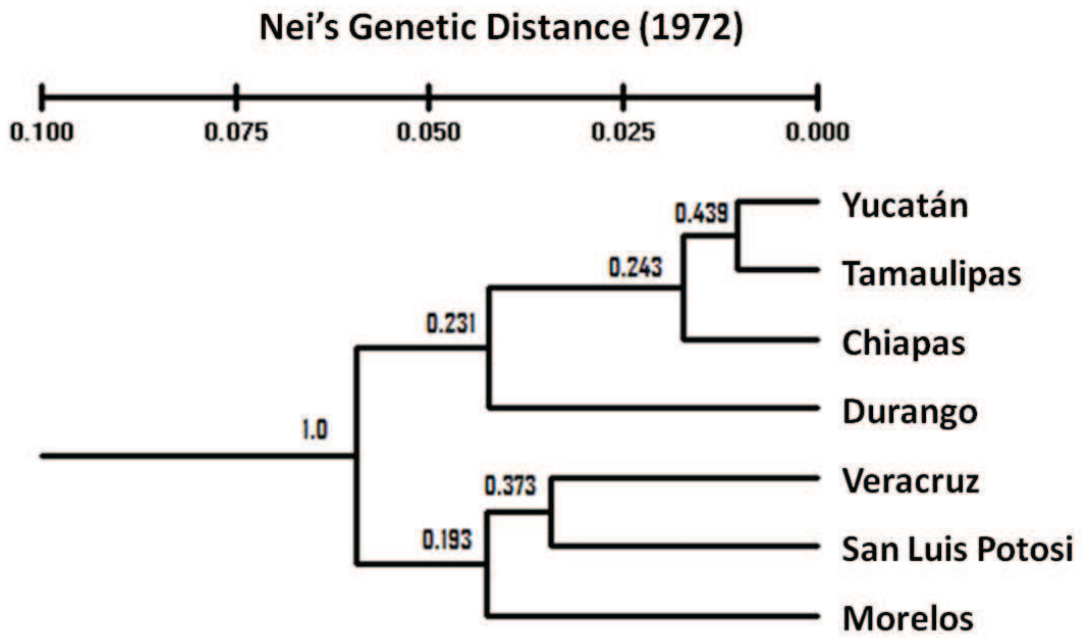
530

531

532

533 Fig. 2

534



535

536

537

538

539

540

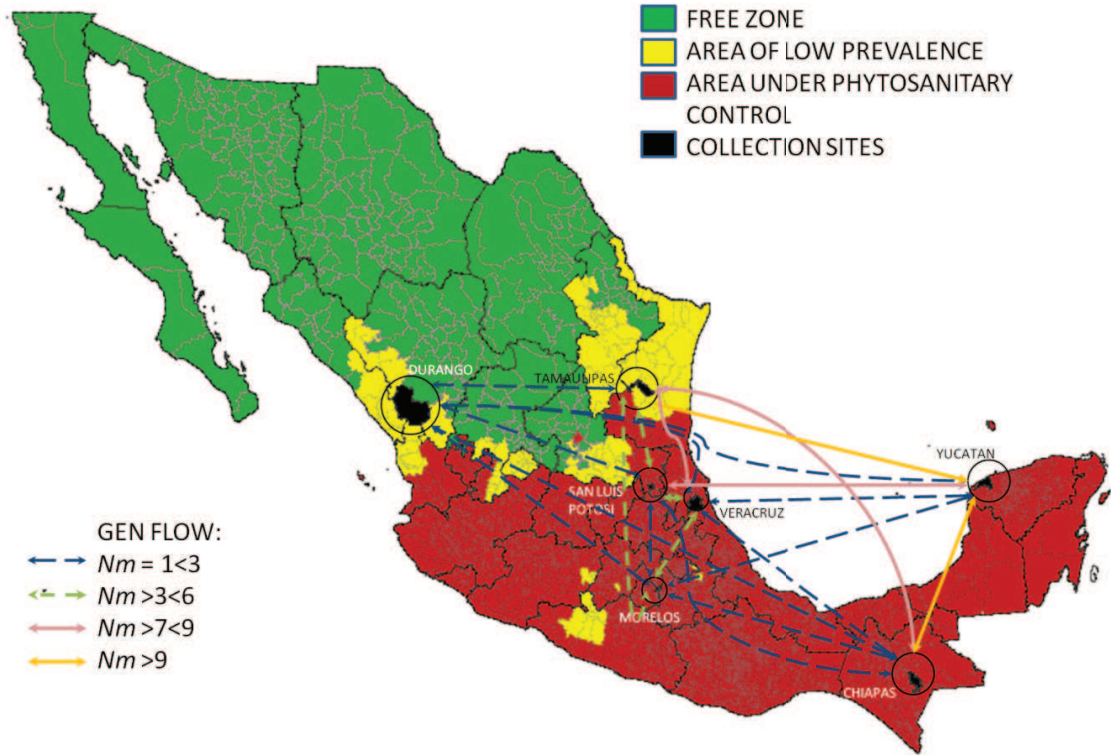
541

542

543

544

545 Figure 3.



546

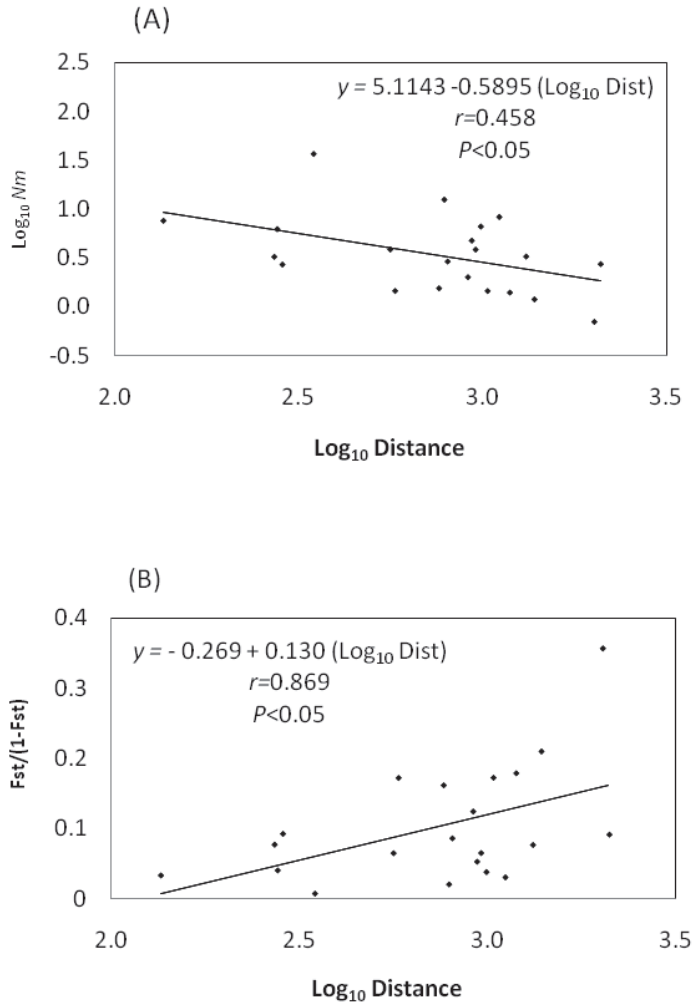
547

548

549

550

551 Figure 4.



552

553

554

555

556

557

558

559