

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



VARIABILIDAD GENÉTICA DE SUBPOBLACIONES DE
Anopheles vestitipennis (Diptera: Culicidae)
MEDIANTE EL USO DE RAPD-PCR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
ENTOMOLOGIA MEDICA

PRESENTA:

BIOL. MARIA HORTENSIA MURILLO SANCHEZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. MAYO DEL 2001



1080124423

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



VARIABILIDAD GÉNICA DE SUPERELACIONES DE
Anopheles trassiparvus (Diptera: Culicidae)
MEDIANTE EL USO DE RAPD-PCR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
ENTOMOLOGÍA Y LA MEDICINA.

PRESENTA:

BIOL. MARIA HORTENSIA MORILLO SANCHEZ,

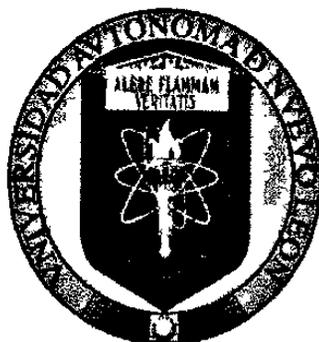
SAN NICOLAS DE LOS GARZA N.L. MAYO DEL 2001



TM
RAC44
- M2
M8
2001



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Variabilidad Genética de Subpoblaciones de *Anopheles vestitipennis*
(Díptera: Culicidae) Mediante el uso de RAPD-PCR.

TESIS

Que para obtener el Grado de Maestro en Ciencias
Con especialidad en Entomología Médica

Presenta

Biól. María Hortensia Murillo Sánchez

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**Variabilidad Genética de Subpoblaciones de *Anopheles vestitipennis*
(Diptera: Culicidae) Mediante el uso de RAPD-PCR.**

TESIS

**Que para obtener el Grado de Maestro en Ciencias
Con especialidad en Entomología Médica**

Presenta

Biól. María Hortencia Murillo Sánchez

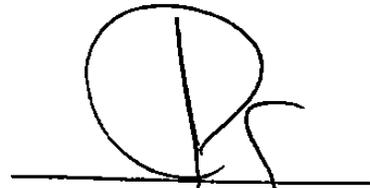
Comisión de Tesis

**Dr. Benito Pereyra Alférez
Presidente**

**Dr. Roberto Mercado Hernández
Secretario**

**Dr. Idefonso Fernández Salas
Vocal**

**Dr. Juan Ignacio Arredondo Jiménez
Asesor Externo**



INDICE.

RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS PARTICULARES	4
ANTECEDENTES	5
<i>Anopheles vestitipennis</i>	5
Control vectorial	7
RAPD-PCR.	8
Complejos de especies y Taxonomía	10
Ciclo biológico de <i>Plasmodium spp.</i>	12
Ciclo biológico en <i>Anopheles spp.</i>	12
Ciclo biológico en el hospedero	13
Historia del paludismo	14
Orígenes del parásito y del vector	14
Descubrimiento de la quinina, del parásito y del ciclo de transmisión	14
Descubrimiento del parásito	15
Descubrimiento del ciclo de transmisión	16
Situación actual del paludismo	17
Genética poblacional	18
Procesos de especiación y formación de nuevas especies	33
Distancia y similitud genética	35
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Áreas de estudio	37
Colecciones entomológicas	37
Purificación de DNA de <i>Anopheles vestitipennis</i>	38

Preparación de la técnica de RAPD-PCR:	39
Condiciones de la PCR	40
Electroforesis de las reacciones de RAPD-PCR en geles de agarosa	41
Slección de primers	42
Programa RAPDPLOT	42
Programa Neighbor-Joining/UPGMA 3.5	43
Programa RAPDDIST	44
Programa RAPDFST 4.0.1.	45
RESULTADOS	47
Abundancia y ciclos de picadura	47
Análisis genético	48
Estimación de valores F_{ST} y N_m	48
Análisis intrapoblacional de la Selva	49
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	54
FIGURAS Y TABLAS DE RESULTADOS	55
LITERATURA	92
APÉNDICE	98

DEDICATORIAS.

A mis padres, Agustín y Daisy

A mis hermanos Carlos, Rosario y Eréndira.

A mis cuñados, Pilar y Fernando

A Gastón. Gracias por tu afecto, tu optimismo a prueba de dramas y tu lealtad.

A mis compañeros del CINVESTAV: Tere, Lety, Sr. Juan, Jorge, Ciro, Alma, Rebeca, Vanya, Socorro, Bety. Muchas gracias por los buenos y no tan buenos momentos compartidos.

A mis compañeros de la UNAM: Paco, Citlali, Eligar, Hugo, Bruno, Jacobo, Norma, Verónica y Nuria.

A mis amigos: Toña, Yazí, Paco, Joel, Alejandro, Yunnuen, Maribel, Marcela, Carlos, Tenchis, Marisela, Soraya, Genoveva, Mario.

A Norma, mi amiga y compañera de departamento. ¡Gracias por tu ayuda y amistad!

A todos los integrantes del LABSIG del Tec de Monterrey: Dr. Lozano, Isadora, Paty, Claudia, Nelly, Cristóbal, Chema, Chelo, Alberto, Oscar, Santiago, por su amistad y compañerismo (los taquitos y pasteles y cochinitas a media tarde) en el tiempo que estuve en sus instalaciones terminando la tesis.

A Ricardo Cerda por sus amables sugerencias respecto a mi tesis.

A todo el personal del CIP que me ayudó durante y después de mi estancia en Tapachula.

AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Ildelfonso Fernández Salas, coordinador de la maestría de Entomología Médica de la FCB/UANL, por el apoyo y la formación recibida.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, del Dpto. de Microbiología de la UANL, por su asesoría.

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, jefe del Laboratorio de Entomología Molecular del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV-IPN, por haberme permitido aprender en su laboratorio los fundamentos de la Biología Molecular, y por las facilidades para la realización del proyecto.

Al Dr. Juan I. Arredondo Jiménez, director del CIP-INSP, por permitirme realizar la tesis, y por su asesoría.

Al Dr. Roberto Mercado, por su revisión de los métodos estadísticos utilizados en el proyecto.

Al Dr. Ricardo Cerda, por sus amables sugerencias respecto a los métodos utilizados en el proyecto.

Al personal técnico del Centro de Investigación de Paludismo, por el apoyo recibido en las colectas de campo de la Selva y la región costera.

Al Dr. Fabián Lozano, jefe del Laboratorio de Información Georreferenciada (LABSIG) del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, por las facilidades otorgadas para la realización del escrito.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación de Paludismo de Tapachula, Chiapas, (CIP-INSP), bajo la dirección del Dr. Juan Ignacio Arredondo Jiménez; en el CINVESTAV-IPN con el Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, y en la Unidad de Genética y Biología Molecular de Microorganismos, FCB/UANL bajo la dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez.

RESUMEN. Con el objetivo de establecer diferencias a nivel genético, abundancia y ciclos de picadura, se colectaron ejemplares *Anopheles vestitipennis* capturados con cebo animal y cebo humano en nueve localidades de la Selva Lacandona y la zona costera del estado de Chiapas y Tabasco. La técnica utilizada para el análisis genético fué la Amplificación Aleatoria de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD-PCR). Los resultados fueron analizados con los programas RAPDPLOT, RAPDDIST y RAPDFST. Seleccionamos diez iniciadores con los que se obtuvieron 60 marcadores polimórficos en 10 individuos de distintas localidades. Estos datos se utilizaron para un análisis intrapoblacional con 40 individuos, y posteriormente se seleccionaron 20 marcadores que aparentemente tienden a discriminar entre individuos de cebo humano y trampa animal para otro análisis entre los mismos individuos. El análisis intrapoblacional de la localidad de Benemérito se realizó con 37 marcadores que aparentemente discriminan entre cebo humano y trampa animal. Las mayores densidades de mosquitos en contacto con humanos correspondieron a San Pedro, López Mateos y Altamira (9.0 ± 0.4 y 17.0 ± 0.8 ; 6.9 ± 0.4 y 5.3 ± 0.2 ; 6.2 ± 0.1 y 6.0 ± 0.1 mosquitos/hora respectivamente, dentro y fuera de las casas,) y más mosquitos se alimentaron en animales en Altamira y Lázaro Cárdenas (13 ± 0.2 , 6.9 ± 0.9 y 4.2 ± 0.1 mosquitos/hora, respectivamente). Las localidades con menor densidad de mosquitos en contacto con humanos y animales fueron El Fortín y Cosalapa, respectivamente (0.7 ± 0 y 0.7 ± 0) y Río Arriba y Cosalapa (0.9 ± 0.3 y 1.3 ± 0). El ciclo de picadura varió según la localidad y sitio donde se colectaron los mosquitos: Entre los mosquitos que se alimentaron antes de media noche, aquellos en contacto con humanos dentro de las casas mostró en general menor frecuencia acumulada de picaduras que los mosquitos que se colectaron en cebo humano, trampa animal y corral, fuera de los domicilios. El análisis de agrupamiento entre las cuatro localidades mostró separación más por localidad que por tipo de captura, mientras que el análisis de agrupamiento intrapoblacional en la localidad de Benemerérito muestra separación entre cebo humano y trampa animal y con una distancia genética mucho mayor entre ambas subpoblaciones ($D=0.2465$) que la reportada por Arredondo-Jiménez *et al*, 1996 ($D=0.07$). En vista del poco soporte que el análisis "bootstrap" otorga a estos resultados, es necesario profundizar en estos estudios para determinar si verdaderamente existe separación genética entre subpoblaciones.

INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa cuyo agente etiológico son distintas especies parásitas del género *Plasmodium* (Microsporidia: Plasmodiidae). Cuatro de estas especies infectan al hombre: *P. vivax* Grassi y Feletti, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. falciparum* (Welch). En México, *P. falciparum* y *P. vivax* son los parásitos prevalentes, principalmente en la región sureste (Oaxaca, Chiapas, Tabasco). El parásito es transmitido de persona a persona por mosquitos del género *Anopheles* Meigen (Diptera: Culicidae). En México, hay 27 especies de este género reportadas (Vargas y Martínez-Palacios 1956, Wilkerson y Strickman, 1990, Kunz *et al*, 1989), pero sólo tres son transmisoras: *Anopheles* (Ny.) *albimanus* Wiedemann, *An. (An.) pseudopunctipennis* Theobald, y más recientemente se incriminó como vector al mosquito *An. (An.) vestitipennis* Dyar y Knab en la Selva Lacandona, en Chiapas, México (Loyola *et al*, 1991; Arredondo-Jiménez, 1995), y en Guatemala (Padilla *et al*, 1992).

La epidemiología del paludismo ha estado, desde tiempos antiguos influida por las migraciones humanas, que han jugado un papel importante en la dispersión y establecimiento fuera de su área endémica. Este fenómeno se ha dado a nivel mundial a causa de guerras, hambre, economías débiles, cambios políticos y desastres naturales, con la aparición de epidemias de paludismo en áreas libres de la enfermedad, de reciente colonización, o en lugares donde no se había presentado desde tiempo atrás (Nájera *et al*, 1998).

Los movimiento migratorios en nuestro país de zonas endémicas a zonas no endémicas y viceversa, influyen en el número de casos de paludismo reportados cada año, así como la temporada de lluvias o secas, al aumentar la población vectorial a causa del aumento de los cuerpos de agua que les sirven de criadero durante las lluvias o al aparecer remansos en los

cursos de agua durante las secas. Por último, las modificaciones ambientales, realizadas a menudo con el propósito de establecer poblaciones humanas, la explotación de recursos naturales y el uso de la tierra con fines agropecuarios trae como consecuencia nuevas condiciones ecológicas donde puede establecerse la enfermedad. La imposibilidad de erradicar el paludismo, como se pretendía a partir de 1955, impone la necesidad de implementar mejoras en los métodos de control.

Un control vectorial adecuado implica, entre otros factores, la necesidad de identificar correctamente a la especie de *Anopheles* transmisora del paludismo (Coluzzi 1988). Sin embargo, en la naturaleza no es raro encontrar COMPLEJOS DE ESPECIES, o especies crípticas (Townsend *et al*, 2000). Así se llaman aquellas especies de organismos que, basándose en caracteres morfológicos y en criterios taxonómicos tradicionales se agrupan en una sola especie, pero sus genotipos son parcial o totalmente distintos, de modo que la posibilidad de entrecruzamiento entre ambos tipos es escaso o nulo. Frecuentemente presentan diferencias de hábitat, distribución, comportamiento, y en especies vectoras, diferencias en las preferencias de hospedero. Esto último es un factor clave al momento de incriminar a la especie vectora dentro de un complejo de especies. Los sistemas tradicionales de identificación taxonómica, han permitido clasificar a los seres vivos con el propósito de facilitar su estudio, pero a medida que el conocimiento avanza con frecuencia este sistema de clasificación se vuelve insuficiente. En el caso de especies vectoras de enfermedades, es determinante la correcta identificación de la especie involucrada en la transmisión, sobre todo en el caso de una epidemia (Coluzzi, 1988; Nájera *et al*, 1998).

A mediados de los ochenta, se diseñó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la cual permite obtener millones de copias de uno o varios fragmentos determinados de DNA dentro del genoma de un individuo (Saiki *et al*, 1985; Mullis y Faloona, 1987). En 1990, se comenzó a utilizar otra técnica, basada en PCR, en el cual se amplifican fragmentos genómicos de un individuo de manera aleatoria utilizando iniciadores arbitrarios,

técnica denominada amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos de DNA (RAPD) (Williams *et al*, 1990), lo cual permite entre realizar estudios de genética poblacional, taxonomía molecular y mapeos genéticos (Michelmore *et al*, 1991; Chapco *et al*, 1992; Haig *et al*, 1994).

La taxonomía molecular es la clasificación e identificación de organismos mediante análisis de características de proteínas y ácidos nucleicos, en vez de caracteres morfológicos (Black,1996). Técnicas como el análisis electroforético de proteínas, secuencias microsátélites, RAPD, DNA mitocondrial, entre otras, constituyen herramientas sin precedentes para realizar estudios (parentesco) entre especies, diversidad genética entre individuos y entre poblaciones y taxonomía.

Para efectos de control vectorial, con estas técnicas es posible identificar aquellos genes involucrados en susceptibilidad o resistencia a patógenos y a insecticidas, definir correlaciones entre características genéticas y comportamientos alimenticios, preferencia de hospederos, hábitats, capacidad vectorial, entre otros. Con un conocimiento más a fondo de una especie vectora es posible establecer mejores medidas de control, y esto se reflejará en el mejoramiento de las condiciones de vida de los habitantes de regiones donde tradicionalmente existen enfermedades transmitidas por vectores.

HIPÓTESIS.

Ho: El estudio de poblaciones simpátricas y alopátricas con tendencias antropofílicas y zoofílicas de *An. vestitipennis* colectadas en diversas poblaciones de Chiapas y Tabasco,

permitirá dilucidar que las diferencias intra- e inter-poblacionales observadas, corresponden al nivel de variación conespecífica.

Ha: El estudio de dichas poblaciones evidencia una diferenciación genética que demuestra la existencia de especiación incipiente, posibilitando encontrar marcadores genéticos simples que tiendan a discriminar entre poblaciones.

OBJETIVO GENERAL

Confirmar la identidad genética de poblaciones de *Anopheles vestitipennis* con diferentes preferencias alimenticias, mediante el uso de la técnica de amplificación aleatoria de DNA polimórfico acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) en los estados de Chiapas y Tabasco.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer los ciclos de picadura de poblaciones de *Anopheles vestitipennis* en contacto con humanos y animales en colectadas en diferentes localidades de la costa y selva Lacandona de Chiapas y Tabasco.
2. Identificar marcadores genéticos simples en las poblaciones antropofílica y zoofílica de *Anopheles vestitipennis* basados en la técnica RAPD-PCR para discriminar entre las variables de esta especie, como primer paso para estudiar las diferencias biológicas entre estas variantes.

ANTECEDENTES

Anopheles vestitipennis

Anopheles (Anopheles) vestitipennis Dyar y Knab pertenece a la serie Arribalzagia (Reid y Knight, 1961; Wilkerson y Peyton 1990); es una especie neotropical con amplia distribución en el continente americano, encontrándose desde San Luis Potosí, México, hasta Sudamérica (Colombia y Venezuela), así como en diferentes islas del Caribe: Cuba, Jamaica, La Española, Puerto Rico y Antillas menores (Komp 1942, Lane 1949, Vargas 1958, Wilkerson y Strickman 1990).

La descripción morfológica original de *An. vestitipennis* lo refiere como un mosquito de apariencia oscura en general, acentuada por abundantes escamas en las alas y manchas amarillas en alas y patas (Dyar y Knab, 1906). Presenta longitud corporal de aproximadamente 5 mm y longitud alar de 4.5 mm. Los tarsos presentan bandas blancas, el tarso posterior es blanquinegro, tarsos y fémures moteados, venas alares negras y abundantes manchas amarillas (Dyar, 1928).

En 1991 Loyola y cols. reportaron el hallazgo de *An. vestitipennis* infectados naturalmente con *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* en la Selva Lacandona. En este estudio se detectaron infecciones con *P. vivax* con una tasa de infección global de 4.67 por 1000 mosquitos (Loyola *et al*, 1991). Este descubrimiento cuestiona su papel en la transmisión de malaria en otras regiones; específicamente en la costa del Pacífico donde abunda localmente en regiones ganaderas (Arredondo-Jiménez *et al*, 1996). Se determinaron varios parámetros entomológicos entre los que destacan la duración del ciclo gonotrófico y la sobrevivencia de las tres especies transmisoras *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis* y *An. vestitipennis*, siendo de 3 días y 0.68 respectivamente para *An. vestitipennis* de la Selva Lacandona y de 2– 3 días y 0.45 – 0.58 respectivamente para *An. vestitipennis* del área costera cercana a Tapachula. La

capacidad vectorial de esta especie en colectas intradomiciliarias fue de 1.35 para *P. vivax* y 2.82 para *P. falciparum*, mientras que en colectas peridomiciliarias fue de 1.9 para *P. vivax* y de 4.0 para *P. falciparum*. Esto lo vuelve el vector de mayor capacidad vectorial en la Selva Lacandona. La especie con mayor capacidad vectorial en la Zona Costera fue *An. pseudopunctipennis* (Villarreal-Treviño *et al*, 1998).

En el estado de Chiapas, México, se ha reportado una amplia distribución de *An. vestitipennis* en por lo menos 19 municipios del mismo (Vargas, 1958). Estudios realizados en seis de estos municipios (Arredondo-Jiménez, 1995), revelaron que el contacto vector-humano es más acentuado en la región norte del estado, en la Selva Lacandona, que en la región sur, en la zona costera. Los estudios realizados sobre comportamiento alimenticio indican que la preferencia por sangre humana no se debe solamente a la disponibilidad relativa de estos hospederos respecto a otros, sino que probablemente es una característica inherente al individuo (Arredondo-Jiménez *et al*, 1996).

Tres subpoblaciones de *An. vestitipennis* colectadas en el estado de Chiapas fueron analizadas por electroforesis enzimática en 1996. Dos de estas subpoblaciones provienen de la misma localidad de la Selva Lacandona (Benemérito de las Américas), pero fueron colectadas con cebo humano y cebo animal, respectivamente. La tercer subpoblación fue colectada en un corral de la región costera del estado, a 280 Km de distancia de la primer población. La similitudes y diferencias entre estas subpoblaciones se determinaron con el coeficiente de similitud genética de Rogers (1972) y la fórmula de distancia genética no sesgada de Nei (1978). Los resultados obtenidos indican que las diferencias y similitudes obtenidas pueden deberse a diferencias genéticas. La distancia genética calculada entre las poblaciones A y B (antropofílica y zoofílica de la Selva Lacandona) es mayor que la calculada entre la población zoofílica de la costa y la población zoofílica de la Selva B y C, a pesar de que estas últimas se encuentran a gran distancia geográfica una de otra (Arredondo-Jiménez *et al*, 1996). La posible existencia de un complejo de especies de *An. vestitipennis* abre un

campo de investigación interesante y necesario para establecer controles adecuados. Hay que tener en cuenta que en el caso de la existencia de COMPLEJOS DE ESPECIES, las especies que los componen, si bien son indistinguibles morfológicamente, a menudo difieren sus hábitats, comportamientos y preferencias alimenticias, entre otras características biológicas, y en el caso de especies vectoras de enfermedades esto significa que una especie determinada de ese complejo puede ser la única responsable de la transmisión, mientras que las otras no. Al momento de establecer una estrategia de control es necesario tener en cuenta las características biológicas que presenta la especie responsable, para enfocar los esfuerzos de control específicamente hacia ésta, y no desviar estos esfuerzos atacando hábitats de las demás especies que no son responsables. La necesidad de una correcta identificación del vector se acentúa en el caso de una epidemia, cuando no se dispone de tiempo para realizar estos estudios, y es necesario establecer inmediatamente un programa de control para cortar en el menor tiempo posible el ciclo de transmisión y detener la epidemia (Black, 1996):

CONTROL VECTORIAL

A pesar de los grandes esfuerzos que durante muchos años se han realizado para su abatimiento, la malaria es un problema de salud mundial que va en aumento. La incidencia de esta enfermedad se ha incrementado sobre todo por el desarrollo de resistencia a insecticidas por parte de las especies vectoras por un lado, y por el otro al desarrollo de resistencia a fármacos por el parásito. Estos factores se exageran por movimientos migratorios cada vez mayores de individuos provenientes de regiones libres de malaria a regiones donde la enfermedad es endémica. Hasta ahora, el control de la malaria a gran escala ha consistido en la aplicación de insecticidas químicos para limitar las poblaciones de anofelinos vectores. La aparición de la resistencia a insecticidas, junto con los elevados costos que implica el desarrollo de nuevos insecticidas, y el daño que los efectos residuales de estos causan en el medio ambiente han estimulado el interés por desarrollar métodos alternativos para el control de la malaria. Lo que se necesita es desarrollar una nueva generación de metodologías que

tengan un impacto profundo y duradero en el ciclo de transmisión del parásito. La biotecnología y la biología molecular pueden proveernos de las herramientas necesarias para desarrollar tales metodologías. La elaboración de vacunas potencialmente efectivas contra la malaria, y la producción de larvicidas por biotecnología son ejemplos claros del alcance de estas disciplinas (Crampton *et al*, 1992). El descubrimiento de cepas de insectos vectores relativamente refractarios o resistentes a la invasión por patógenos de vertebrados, y la implicación de genes responsables de estas características, ha despertado el interés por desarrollar un método de control genético enfocado a incrementar las poblaciones resistentes a la infección parasitaria mediante la identificación adecuada de los genes involucrados en la resistencia o susceptibilidad. Con el uso de técnicas bioquímicas y de biología molecular (electroforesis enzimática, marcadores de DNA) se ha establecido la existencia de complejos de especies vectoras. (Gooding *et al*, 1996). En este caso, la biología molecular ha facilitado el desarrollo de nuevas técnicas de identificación taxonómica que, al proporcionar datos más específicos de poblaciones vectoriales, de los que no se disponía antes, ayudan a incrementar la eficacia de las medidas de control que se tomen contra una población en particular (Crampton *et al*, 1992).

Por lo anterior, el objetivo fundamental de este proyecto es corroborar los resultados obtenidos por Arredondo-Jiménez y cols. en 1996, mediante el uso de la técnica llamada RAPD-PCR.

AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RAPD-PCR).

La técnica RAPD-PCR se basa en la replicación exponencial de fragmentos de DNA por medio de PCR, los cuales se utilizan como “marcadores” genéticos con los que se evalúan diferencias y similitudes genotípicas a nivel de individuos y a nivel de poblaciones con alto grado de resolución. Consiste en la amplificación arbitraria de secuencias anónimas a cuyos extremos se unen unas secuencias de nucleótidos complementarias llamadas

“primers” o iniciadores de la reacción. Estos “primers” son sintetizados como secuencias aleatorias con una longitud de 10 bases, del cual un 50-60% son guanina y citosina. (Operon Technologies, Alameda, California). Esta técnica se ha utilizado ampliamente para identificar marcadores genéticos. La secuencia iniciadora debe encontrar una secuencia complementaria que se encuentre situado a no más de 2-3 kilobases de distancia de otro sitio de unión. Estas secuencias repetitivas, directas e invertidas que son los sitios de unión de las secuencias iniciadoras se encuentran frecuentemente en regiones genómicas expuestas constantemente a cambios en tamaño y secuencia por mecanismos como entrecruzamiento desigual, conversión génica y replicación deficiente a nivel de nucleótidos; por lo tanto la amplificación de estas regiones con frecuencia revelan la existencia de polimorfismos (Black, 1993).

Mullis *et al* (1986), describieron la Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR), una técnica novedosa que permite obtener en poco tiempo fragmentos de DNA *específicos* en grandes cantidades. Años después, Williams *et al* (1991), describen la amplificación *al azar* de fragmentos de DNA por PCR. Desde entonces, numerosos estudios demuestran la utilidad de esta última técnica para detectar variabilidad genética entre especies emparentadas, y aún dentro de la misma especie (Roehrdanz, 1993), para detectar diferencias entre las especies que forman un complejo, identificando aquellos marcadores que sirven de referencia para “diagnosticar” a cada especie críptica (Ballinger-Crabtree *et al*, 1992, Kambhampati *et al*, 1993; Wilkerson *et al*, 1993; Andersen *et al*, 1996), para estudios de herencia en parásitos (Howard *et al*, 1996) para establecer correlaciones entre genotipos y patogenicidad de hongos fitopatógenos (Bidochka *et al*, 1994, Perós *et al*, 1997), para estudios de genética poblacional (Lynch y Milligan, 1994; Norris *et al*, 1996; Tabachnick *et al*. 1996; Apóstol *et al*, 1993; 1994 y 1996; Wilkerson *et al*, 1993).

COMPLEJOS DE ESPECIES. IMPORTANCIA DE UNA ADECUADA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La necesidad de la correcta identificación de las especies que conforman un complejo, en el caso de especies vectoras de enfermedades, tiene implicaciones epidemiológicas. Algunas características biológicas y de comportamiento como capacidad vectorial, preferencia de hospederos, hábitats larvarios, comportamiento alimenticio en el adulto, distribución, que son críticas para determinar el programa de control vectorial adecuado, pueden variar notablemente entre especies crípticas (son aquellas que conforman un complejo de especies: indistinguibles a nivel morfológico, pero con aislamiento reproductivo parcial o total), volviendo a unas vectoras y a otras no. Un ejemplo histórico de este fenómeno lo encontramos en el complejo de *An. maculipennis*. A principios de siglo este complejo se consideraba una sola especie con amplio rango de distribución Paleártica (Europa, norte del Sahara, norte de Arabia y centro y norte de Asia). En aquellos tiempos, los malariólogos europeos sabían que la distribución de la malaria era sobre todo costera, y que no coincidía con la amplia y a veces abundante distribución de *An. maculipennis* tierra adentro. Este fenómeno llegó a ser conocido como "anofelismo sin malaria". La primera descripción de una variedad distinta dentro de esta especie se hizo en 1924 por Van Thiel, el cual describió al nuevo componente, *An. atroparvus*, como un mosquito no hibernante, variante de *An. maculipennis*, responsable de la transmisión intradomiciliar de la malaria durante el invierno. En 1926 Falleroni encontró huevecillos de *An. maculipennis* colectados en Italia, de dos distintos colores. A la raza asociada a los huevecillos gris oscuro le llamó *An. labranchiae*, y a la raza de los huevecillos plateados le llamó *An. messeae*. En los años treinta, el uso de la precipitina ayudó a demostrar que *An. maculipennis* es antropofílico (con preferencia por sangre humana) en regiones con paludismo. Al analizar las preferencias alimenticias de las "cepas" reportadas por Falleroni, sólo *An. labranchiae* fue antropofílico y por lo tanto el único responsable de la transmisión de malaria. Investigaciones posteriores dividieron al grupo de

los huevecillos gris obscuro en *An. labranchiae*, *An. atroparvus* y *An. sacharovi*. El grupo de los huevecillos plateados se subdividió en *An. maculipennis*, *An. meseae*, *An. melanoon* y *An. subalpinus*. Estos siete grupos están aislados reproductivamente parcial o totalmente entre sí, por lo que se les considera especies distintas. Más tarde se reportaron diferencias entre ellas en sus patrones de apareamiento y en cromosomas politenos de las glándulas salivales de las larvas. Después de aclarar la taxonomía del grupo, fue posible establecer su distribución. En general, las siete especies ocupan distintas regiones geográficas, aunque algunas presentan traslapes en su distribución. De las siete, solo *An. labranchiae* y *An. sacharovi* son vectores de malaria en su área. *Anopheles sacharovi* es la única que puede ser identificada en estado adulto; las demás deben ser identificadas basándose en la morfología de huevecillo o cromosomas politenos (Black, 1996).

El complejo de especies más importante entre los vectores de paludismo es el de *An. gambiae*, vector primario de malaria y filariasis en Africa. En el interior del continente sus larvas se encuentran en cuerpos de agua pequeños, limpios y soleados. Pero en la costa, estas mismas larvas se encuentran también en pantanos salobres. Las larvas de estos hábitats son morfológicamente indistinguibles de las colectadas tierra adentro, pero los adultos emergidos de las larvas colectadas en ambos lugares son distintos. Los individuos de la zona costera fueron separados de *An. gambiae sensu lato* (s.l.) en dos especies: *An. merus* en el este y *An. melas* en el oeste del continente. En la década de los 60's se realizaron estudios en el interior del continente, con los que la especie *An. gambiae* s.l. se subdividió en cuatro: *An. gambiae sensu stricto* (s.s.), *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus* y *An. bwambae*. De estas, *An. gambiae* y *An. arabiensis* son los dos vectores de malaria y filariasis más importantes. Ambas se encuentran ampliamente distribuidos a todo lo largo y ancho del continente, con frecuencia habitando en la misma región. *Anopheles gambiae* s.s. es más antropofílico y endofílico (se alimenta dentro de los domicilios) que *An. arabiensis*. *Anopheles quadriannulatus* es zoofílico, no vector de malaria o filariasis. *Anopheles bwambae* es conocido solamente en los manantiales de aguas minerales al pie de las montañas Ruwenzori, en Uganda.

En los ejemplos anteriores podemos ver la importancia de la adecuada identificación de organismos vectores con propósitos de implementar adecuadamente medidas de control según hábitats larvarios, preferencias alimenticias, comportamiento de reposo, entre otros parámetros variables entre especies crípticas (Black, 1996).

CICLO BIOLÓGICO DE *Plasmodium* spp.

Las especies parásitas pertenecientes a la familia Plasmodiidae comparten la característica de que, durante su ciclo biológico, presentan en el hospedero vertebrado dos estadios asexuales, uno en eritrocitos y otro en hígado, y una fase sexual que inicia en el vertebrado y finaliza en la especie vectora (mosquito). Aunque existen numerosas especies de *Plasmodium*, que infectan naturalmente a diversas especies de aves, mamíferos y reptiles, son cuatro las que son capaces de infectar naturalmente al humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*.

De modo general, el ciclo biológico de las especies de *Plasmodium* que infectan al hombre se desarrollan del siguiente modo (Fig. 1):

CICLO BIOLÓGICO EN *Anopheles*

Cuando un mosquito *Anopheles* pica a una persona infectada toma junto con la sangre las formas sexuales del parásito los microgametocitos y macrogametocitos. En el estómago del mosquito se completa la gametogénesis y se lleva a cabo la fertilización, formando los cigotos. Estos se desarrollan a la fase de ooquinetos, el cual atraviesa la pared del estómago del mosquito hacia el exterior, transformándose en un ooquiste, dentro del cual comienzan a formarse numerosos esporozoítos. El ooquiste revienta liberando a los esporozoítos, que migran hacia las glándulas salivales del insecto y ahí permanecen hasta la siguiente

alimentación sanguínea. Cuando los esporozoítos entran en contacto con otro hospedero se inicia la fase de desarrollo del parásito en el hospedero.

CICLO BIOLÓGICO EN EL HOSPEDERO.

Una vez en el torrente sanguíneo del hospedero, los esporozoítos se dirigen al hígado, rompiendo y penetrando en los hepatocitos, presumiblemente para evadir de este modo el ataque inmunológico que el organismo parasitado dirige contra ellos. Una vez dentro de los hepatocitos se realiza un ciclo de reproducción asexual, dando lugar a numerosos merozoítos. Los hepatocitos se rompen y se liberan al torrente sanguíneo miles de merozoítos. Este es el inicio de la fase sanguínea del parásito; en esta se da la invasión de los eritrocitos por parte de los merozoítos. Estos se desarrollan a trofozoítos y posteriormente a esquizontes. Cuando los esquizontes maduran se dividen y originan nuevos merozoítos. En esta fase los glóbulos rojos infectados se rompen y dejan salir a los merozoítos, los que a su vez invaden otros glóbulos rojos, y así se mantiene la infección.

Sin embargo, no todos los merozoítos se vuelven esquizontes. Algunos se desarrollan a las formas sexuales del parásito, los microgametocitos y macrogametocitos los cuales, al ser ingeridos por un mosquito *Anopheles* se desarrollarán dentro de éste. Así se inicia nuevamente el ciclo biológico y de transmisión del *Plasmodium*. El tiempo necesario para que ocurra cada fase del ciclo biológico del *Plasmodium*, tanto en el vector como en el hospedero varía según la especie de del parásito, la resistencia o susceptibilidad del mosquito, y el estado de salud del hospedero.

CICLO DE VIDA DE *PLASMODIUM SP.*

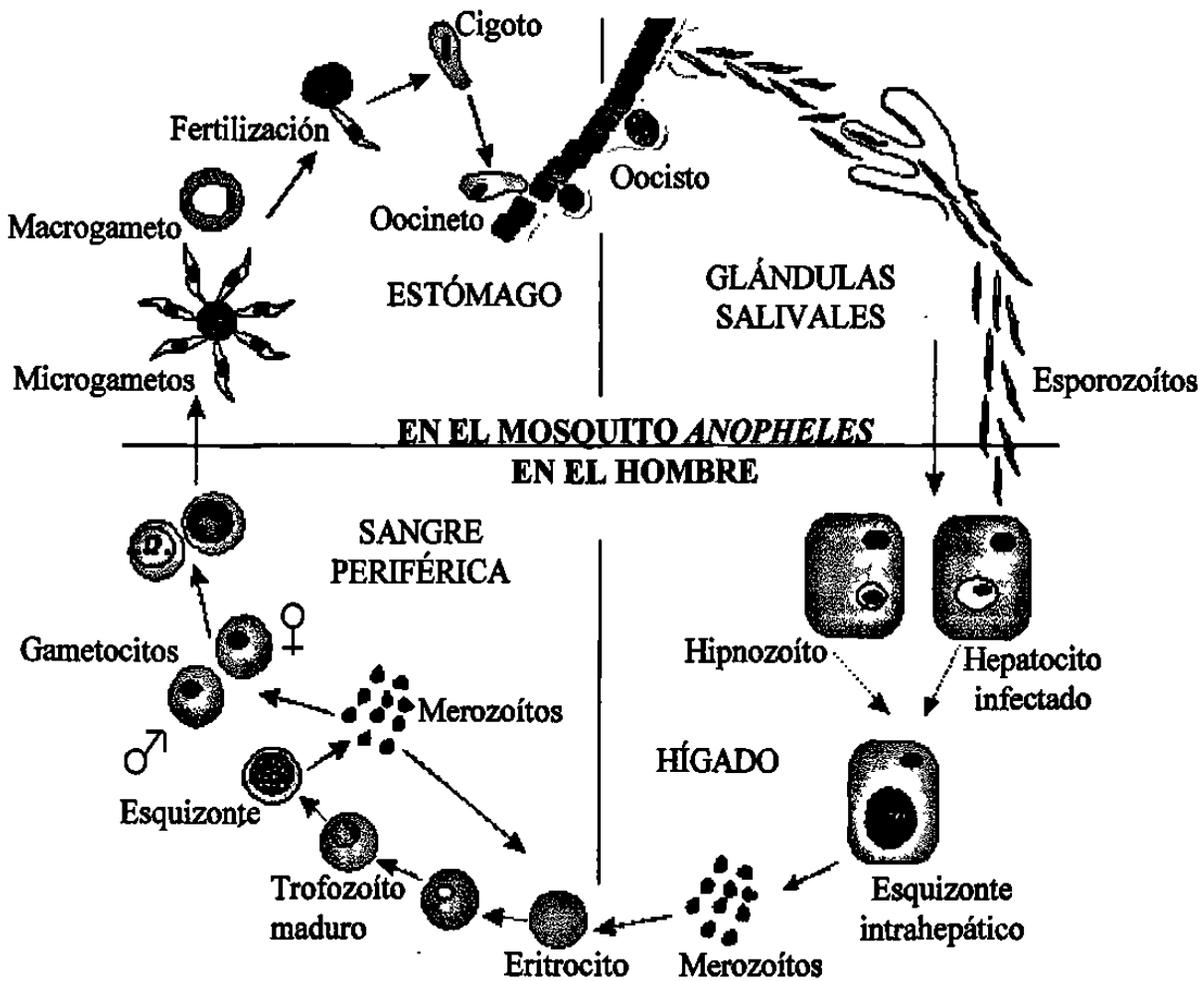


Figura 1. Ciclo de vida del paludismo en el cual se aprecia el paso de las diferentes fases del *Plasmodium* a través del mosquito *Anopheles* y el hombre (García Archila 2001).

HISTORIA DEL PALUDISMO.

ORIGENES DEL PARÁSITO Y DEL VECTOR

Los orígenes del paludismo se remontan también a los orígenes del hombre, pues esta enfermedad ha afligido al hombre desde sus orígenes, y es probable que afectara también a sus ancestros homínidos (Bruce-Chwatt y de Zulueta, 1980).

Cualquiera que haya sido el origen y la dispersión del paludismo por el mundo, lo cierto es que afectó grandemente a los primeros asentamientos humanos una vez que se desarrollaron asentamientos agrícolas, facilitando así las posibilidades de infección al humano (Bruce-Chwatt y de Zulueta, 1980). Todas las grandes civilizaciones del Viejo Mundo (Egipto, Mesopotamia, India, China, Grecia y Roma) refirieron tempranamente la presencia de la enfermedad (Bruce-Chwatt, 1988). En el siglo V a.C. Hipócrates pudo diagnosticar la enfermedad en Asia Menor, y distinguir las diferentes etapas de las fiebres. El médico griego creía que la malaria es producida por el agua de los pantanos, las cuales al ser tomadas u olidas producían desequilibrio en los humores corporales. La invención del microscopio por Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) y las aportaciones de Roberto Koch (1843-1910) respecto a las enfermedades infecciosas fueron antecedentes valiosos para el descubrimiento del parásito causante de la malaria.

DESCUBRIMIENTO DE LA QUININA, DEL PARÁSITO Y DEL CICLO DE TRANSMISIÓN.

Los indios sudamericanos usaron la corteza del árbol de la quina (*Cinchona ledgeriana*) como un tratamiento tradicional para combatir las fiebres palúdicas mucho antes

de que hubiera un tratamiento disponible en Europa. En 1639 los misioneros jesuitas llevaron la corteza al Viejo Mundo, pero fue hasta 1820 cuando los químicos franceses Pelletier y Caventou aislaron la quinina, el principio activo de la corteza (Russell, 1955).

DESCUBRIMIENTO DEL PARÁSITO.

En 1880 el médico francés Alfonse Lavern, en Argelia, examinando una gota de sangre de un paciente, encontró en los bordes de los eritrocitos que contenían gránulos pigmentados y cuerpos esféricos y en forma de media luna, unos filamentos moviéndose activamente y que perturbaban a otras células. Asumió que dichos filamentos, junto con las formas esféricas, eran los responsables de la enfermedad. Lo que observó fue la exflagelación de los gametocitos machos de *P. falciparum*. Lavern se entusiasmó con su descubrimiento, y mandó la información de sus hallazgos a la comunidad científica francesa, pero en ese entonces se creía que la malaria era producida por una bacteria al ser bebidas las aguas de los pantanos y los científicos no creyeron en las observaciones hechas por su colega en Argelia. Sin desanimarse, Lavern observó durante el siguiente año más de cien muestras de sangre de personas con malaria, y vio que la mayoría de los casos presentaban los mismos organismos en los glóbulos rojos. Al final del año escribió un reporte detallado de sus observaciones y lo mandó nuevamente a la comunidad científica francesa. Nuevamente rechazaron su descubrimiento. Tomó más de cuatro años para que otros investigadores vieran también los organismos descritos por Lavern, y eso solo cuando el alemán Karl Zeiss diseñó un microscopio con mejores lentes, con los que estos microorganismos podían ser mejor vistos. Diez años después del reporte inicial de Lavern, un grupo de investigadores italianos encabezados por Camillo Golgi descubrieron que los parásitos presentes en la sangre de personas con fiebre se dividen sincrónicamente a intervalos regulares, demostrando que los paroxismos febriles están relacionados con la multiplicación periódica de los parásitos en el torrente sanguíneo (Parra-Dussan, 1995).

DESCUBRIMIENTO DEL MODO DE TRANSMISIÓN

Anterior al establecimiento del ciclo de transmisión de paludismo, P. Manson, en 1877 demostró que las formas larvarias de *Wuchereria bancrofti* se desarrollan en el cuerpo de un mosquito vector (*Culex pipiens quinquefasciatus*). Este descubrimiento fue el fundamento de la entomología médico-veterinaria. En 1881, Carlos J. Finlay de La Habana, Cuba, demostró el papel de los mosquitos en la transmisión de la fiebre amarilla. A finales del siglo XIX el médico inglés Ronald Ross (1857-1932) y el zoólogo italiano Giovanni Batista Grassi descubrieron independientemente que mosquitos del género *Anopheles* son vectores de la malaria. Ronald Ross fue enviado a prestar servicio médico durante varios años en la India. En uno de esos viajes entre Inglaterra y la India tuvo ocasión de conocer a Patrick Manson, quien para entonces ya era un reconocido experto en Inglaterra de las formas parásitas de malaria en la sangre. Manson tenía la hipótesis de que la malaria podía ser transmitida de persona a persona por medio de la picadura de un mosquito, y así se lo dijo a Ross. Este fue la primera persona en el mundo que se dedicó a estudiar la malaria en mosquitos, y le tomó varios años descubrir el mecanismo de transmisión en estos insectos. Empezó disectando diferentes especies de mosquitos y estudiando sus componentes internos. En la India colectó mosquitos *Anopheles*, y permitió que picaran a personas con malaria. Disectó los mosquitos al cuarto y quinto día después de la alimentación con sangre, y observó que estos presentaban células pigmentadas en la parte delantera del estómago que no aparecían en mosquitos de la misma especie que habían picado a una persona sin malaria. Posteriormente prosiguió sus observaciones tomando como modelo biológico el parásito que produce malaria en las aves. Así pudo continuar sus observaciones del desarrollo casi completo del parásito en el mosquito. Finalmente pudo demostrar en aves que estas pueden ser infectadas por la picadura de un mosquito que contenga parásitos en sus glándulas salivales (Parra-Dussan, 1995). En 1898,

G.B. Grassi y sus colaboradores descubrieron los ciclos de desarrollo completos de *P. vivax* y *P. falciparum* en mosquitos *Anopheles*. Dos años después demostró que los mosquitos *Anopheles* son los únicos capaces de transmitir paludismo al humano. Ese mismo año, Patrick Manson diseñó dos experimentos para demostrar que los *Anopheles* son los vectores de paludismo:

1) Utilizó mallas protectoras durante la noche para prevenir picaduras por mosquitos en una zona con alta incidencia de paludismo en Italia; al no contraer la enfermedad, se concluyó que el experimento fue un éxito.

2) Infectó mosquitos *Anopheles* con paludismo terciano benigno de pacientes en Roma. Los mosquitos fueron trasladados a Londres donde picaron a 2 personas, manifestando paludismo dos semanas después (Manual del curso de Malariología, C.I.P., Tapachula, Chis., 1995).

SITUACIÓN ACTUAL DEL PALUDISMO.

La malaria ha sido eliminada o controlada de modo satisfactorio en muchos países, pero ahora muestra tendencia a resurgir. Actualmente es problema de salud pública en más de 90 países habitados por 2,400 millones de personas aproximadamente, el 40% de la población global. Se estima que la malaria causa arriba de 500 millones de casos clínicos y aproximadamente 2.7 millones de muertes por año (Institute of Medicine of the National Academy of Sciences of the United States, 1996), siendo los grupos poblacionales más afectados, en primer lugar, los niños de edades inferiores a los 5 años. Se estima que en Africa la enfermedad mata a uno de cada 20 niños menores de 5 años. El segundo lugar lo ocupan las mujeres embarazadas. El riesgo de contraer la enfermedad durante el embarazo es cuatro veces mayor debido al abatimiento natural del sistema inmune que ocurre durante este período; y solo la mitad tiene posibilidades de sobrevivir. Normalmente las fiebres típicas de la enfermedad (entre 41-42° C) provocan abortos espontáneos. La malaria está retornando a regiones donde había sido erradicada, y se ha

introducido a regiones donde no existía, por ejemplo en Asia Central y el este de Europa. En Africa, la malaria está retornando a regiones donde habia sido efectivamente controlada; tal es el caso de Zanzibar, Sudáfrica y Madagascar. Existen varios factores que han contribuido a esta situación: La resistencia de los parásitos a los medicamentos antipalúdicos va en aumento, así como la resistencia de los anofelinos transmisores a los insecticidas que se utilizan para su control. Migraciones y cambios demográficos han dado como resultado un mayor número de individuos expuestos a la infección y favorecido que los individuos infectados establezcan nuevos ciclos de transmisión.

La alteración de ecosistemas por el hombre como deforestación, construcción de caminos, proyectos agrícolas y de riego han favorecido la aparición de nuevos criaderos para anofelinos. Otro factor importante ha sido el abandono y descuido de programas de control antimalaria en varios países (Malaria Foundation International, 1998).

ANTECEDENTES. GENÉTICA POBLACIONAL.

GENÉTICA.

La genética en general es la rama de la Biología que estudia la constitución genética de los organismos y las leyes que gobiernan la transmisión de esta información hereditaria de una a otra generación.

GENÉTICA DE POBLACIONES.

Es una rama de la genética relacionada con la herencia *en grupos de individuos*, es decir, en poblaciones. Es el estudio de la constitución genética de las poblaciones, y cómo esta va cambiando de generación en generación. En el caso de especies vectoras, los factores que influyen en la variabilidad genética influyen también en la capacidad y competencia vectorial del individuo. Los cambios genéticos en las poblaciones marcan el proceso evolutivo, de

modo que la genética de poblaciones también puede considerarse genética evolutiva. En la evolución la unidad básica de estudio no es un individuo sino una población.

La genética de poblaciones tiene sus cimientos en los trabajos de J.B.S. Haldane, R.A. Fisher y S. Wright (1978). Cada uno de ellos desarrolló las bases teóricas para esta disciplina en los años 30's. En los años siguientes se integró junto con la biología sistemática y evolutiva, con los trabajos de T. Dobzhansky y más tarde E. Mayr, G.L. Simpson y L.E. Stebbins. A principios de los 50's se reconoció la importancia de la genética poblacional para la comprensión de las enfermedades transmitidas por vectores, con los trabajos de J.B. Kitzmiller y G.B. Craig Jr (1961). El trabajo de este último sobre genética poblacional de mosquitos vectores comenzó con el análisis de mutantes morfológicos de *Aedes aegypti*. Pese a la dificultad que entrañaba un estudio de esta naturaleza usando variantes morfológicas, significó un gran progreso. El principal avance se dió con la aparición de la electroforesis enzimática y su primer aplicación en poblaciones de *Drosophila pseudoobscura* en 1966 por R.C. Lewontin y J.L. Hubby (Beaty y Marquardt, 1996).

ESPECIE.

En los organismos de reproducción sexual, una especie es un grupo de poblaciones naturales que se cruzan entre sí, y al mismo tiempo están aisladas reproductivamente de otras especies. Son sistemas naturales definidos por la capacidad de sus miembros de aparearse entre sí. Esta capacidad es de gran importancia evolutiva, porque determina que las especies sean unidades evolutivas distintas e independientes. El aislamiento reproductor es el criterio de especiación en los organismos sexuales, pues este permite que los acervos de genes evolucionen independientemente unos de otros (Ayala, 1984).

POBLACIÓN.

Es una comunidad de individuos unidos por lazos de apareamiento y de parentesco, o una comunidad de individuos de la misma especie. La continuidad de una población se mantiene por el mecanismo de la herencia biológica.

ACERVO GENÉTICO. Es el conjunto de los genotipos de todos los individuos de una población.

VARIACIÓN GENÉTICA.

La existencia de la variabilidad genética es una condición necesaria para la evolución. Suponiendo que en un determinado *locus* todos los individuos de una población dada son homocigóticos exactamente para el mismo alelo. La evolución no puede darse en este *locus*, porque las frecuencias alélicas no pueden cambiar de generación en generación. Supongamos ahora que en otra población hay dos alelos en ese *locus* en particular. En esta población pueden tener lugar cambios evolutivos: un alelo puede variar sus frecuencias a expensas del otro. Así, cuanto mayor sea el número de *loci* variables y mayor cantidad de alelos en cada *locus* variable, mayor es la probabilidad de cambiar las frecuencias de algunos alelos a expensas de otros.

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS.

La variación en los acervos génicos se expresa en términos de frecuencias genotípicas y frecuencias génicas. Si se conoce la relación entre los genotipos y los correspondientes fenotipos, es posible transformar las frecuencias fenotípicas en frecuencias genotípicas. Las frecuencias genotípicas se obtienen simplemente dividiendo el número de veces que se observa el genotipo deseado entre el número total de genotipos

FRECUENCIAS ALÉLICAS.

Se pueden calcular a partir de las frecuencias genotípicas, teniendo en cuenta que los homocigotos llevan dos copias de un solo alelo; los heterocigotos llevan una de cada uno de

los dos alelos. En este caso, la frecuencia de un alelo es la frecuencia de los individuos homocigotos más la mitad de la frecuencia de los heterocigotos para este alelo. También pueden calcularse contando simplemente el número de veces que aparece un alelo y dividiéndolo entre el número de alelos presentes en la muestra. A menudo es más práctico calcular la variabilidad genética de un *locus* utilizando las frecuencias alélicas, porque generalmente hay menos alelos que genotipos: con dos alelos, el número posible de genotipos es tres; con tres alelos es seis; con cuatro alelos es diez.

Por supuesto, es imposible estudiar todos los *locus* de una población con el fin de averiguar la proporción de estos que es *polimórfica* (que presentan variabilidad); en lugar de esto, se toma una muestra de *loci* génicos. Si la muestra es al azar y por lo tanto verdaderamente representativa de la población, los resultados obtenidos pueden extrapolarse para toda la población. Para resolver este problema, la genética molecular provee de herramientas eficaces: La información codificada en las secuencias de DNA de un gen estructural se traduce en una secuencia de aminoácidos que forman un polipéptido. Es posible seleccionar una muestra de proteínas sin saber de antemano si son o no variables en la población. Si se encuentra una proteína que no varía entre la población, se deduce que el gen que la codifica no varía tampoco, y si otra proteína muestra variabilidad se deduce que el gen también lo es, y podemos medir su variabilidad, es decir, cuántas formas variables (isoenzimas) de la proteína existen y con qué frecuencia. La técnica comúnmente utilizada desde la década de los 60's es la electroforesis de proteínas en gel. Generalmente se utilizan dos medidas de variación genética: *polimorfismo* y *heterocigosis*.

POLIMORFISMO.

El polimorfismo de una población es simplemente la proporción de *loci* polimórficos (variables) dentro de esa población. Suponiendo que con electroforesis de proteínas se examinan 30 *loci* de una población de cualquier organismo, es posible encontrar alguna variación en 18 de los 30 *loci*. El polimorfismo de esta población es $18/30=0.60$ de los *loci*.

son polimórficos, o que el grado de polimorfismo de esta población es de 0.60. Sin embargo, esta medida de variabilidad tiene dos defectos: arbitrariedad e imprecisión.

Es algo arbitrario decidir el número de individuos que serán examinados para determinar el grado de polimorfismo. A mayor tamaño de la muestra, mayor probabilidad de obtener *loci* variables, y viceversa. Para obviar este problema, se debe tener un criterio de polimorfismo: el más usado es el de que un *locus* es polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia no superior a 0.95. pero esto también es arbitrario, porque si se utilizan otras frecuencias, un *loci* puede ser considerado polimórfico según un criterio y no polimórfico según otro criterio. Además, un *locus* ligeramente variable cuenta tanto como otro muy variable (Ayala, 1984).

HETEROCIGOSIS.

Otra medida de variabilidad genética es la frecuencia promedio de individuos heterocigóticos por *locus*, o *heterocigosis* de una población. Esta se obtiene calculando primero la frecuencia de individuos heterocigotos para cada *locus*, después se saca la media de estas frecuencias para todos los *loci*. La frecuencia observada de heterocigosis (H_{obs}) es el número total de heterocigotos observados divididos entre el número de individuos muestreados. Es una buena medida de la variación porque estima la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en una población sean diferentes. Otro indicador de variación genética en las poblaciones naturales es la heterocigosidad esperada (H_{esp}) bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, que se discute más adelante. Esta heterocigosidad puede ser calculada como $1 - \text{sumatoria de } p^2$, siendo p^2 la varianza estándar entre subpoblaciones. Se obtiene una descripción más exacta de una población cuando se analizan muchos *loci* distintos y la media de la H_{esp} se calcula como el promedio de la heterocigosidad esperada. La heterocigosis es la medida de variación genética utilizada por la mayoría de los genetistas de poblaciones.

PROCESOS DEL CAMBIO EVOLUTIVO. FUERZAS QUE VARIAN LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS: LEY DE HARDY-WEINBERG, MUTACIÓN, MIGRACIÓN, FLUJO GÉNICO, SELECCIÓN NATURAL.

La evolución biológica es el proceso de cambio y diversificación de los organismos a través del tiempo. A nivel genético, consiste en cambios en la constitución genética de las poblaciones, y puede verse como un proceso en dos etapas: primero, la mutación y recombinación son procesos por los que aparecen las variaciones hereditarias; después la deriva genética y la selección natural son procesos por los que estas variantes genéticas se transmiten diferencialmente de generación en generación.

La evolución solo puede darse si hay variabilidad genética. La fuente fundamental de estas variaciones es el proceso de mutación, pero la variabilidad se distribuye de formas nuevas por procesos sexuales (segregación cromosómica independiente y entrecruzamiento). La variabilidad genética que aparece por mutación y recombinación no pasa de igual modo de una generación a otra, sino que más bien algunas variantes aumentan su frecuencias a expensas de otras. Además de la mutación, los procesos que influyen en la variación de las frecuencias alélicas de una a otra generación son el flujo génico o migración, deriva genética y selección natural. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el proceso de la herencia, por si misma, no cambia las frecuencias alélicas.

LEY DE HARDY-WEINBERG.

Esta ley fue formulada en 1908 independientemente por el matemático inglés G. H. Hardy y por el médico alemán Wilhelm Weinberg, y ley postula que *“en ausencia de mutación, migración, deriva génica y selección natural, en poblaciones con apareamiento al azar, el proceso de la herencia no cambia las frecuencias alélicas ni las frecuencias genotípicas de un locus dado, por tanto las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación”*. Además, si las frecuencias alélicas son inicialmente las mismas en machos y hembras, las frecuencias genotípicas de equilibrio en cualquier locus se logran en

una sola generación de apareamiento al azar. El *apareamiento al azar o aleatorio* se define como la probabilidad de apareamiento entre individuos independientemente de su constitución genética.

Para comprender las bases de esta ley, ejemplificando un *locus* particular, donde hay dos alelos, A y a en una población, y sus frecuencias para machos y hembras son p para A y q para a . Machos y hembras se entrecruzan al azar, es decir, los gametos de machos y hembras se unen al azar en la formación de cigotos. Entonces, la frecuencia de un genotipo dado, será el producto de las frecuencias de los dos alelos que conforman este genotipo. La probabilidad de que un individuo tenga el genotipo AA es la probabilidad (p) de recibir el alelo A de la madre multiplicado por la probabilidad (p) de recibir el alelo A del padre o $p \times p = p^2$. Igualmente, la posibilidad de que un individuo tenga el genotipo aa es q^2 .

El genotipo Aa puede originarse de dos formas: A de la madre y a del padre, que aparece con una frecuencia de pq , o a de la madre y A del padre, esto también con frecuencia de pq , por lo que la frecuencia total de Aa es:

$$pq + pq = 2pq.$$

Se pueden demostrar los tres enunciados contenidos en la ley de Hardy-Weinberg:

1.- Las frecuencias alélicas no cambian de generación en generación. Esto se demuestra con la frecuencia del alelo A en la descendencia: es la frecuencia de AA más la mitad de la frecuencia de Aa o $p^2 + pq = p(p+q) = p$. Por lo tanto $p + q = 1$ y la frecuencia genotípica esperada por Hardy-Weinberg para alguna generación puede ser obtenida por la expansión binomial de la frecuencia génica $(p + q)^2$.

2.- Las frecuencias genotípicas de equilibrio vienen dadas por el desarrollo del cuadrado y no cambian. Ya que las frecuencias alélicas en la descendencia son p y q , al igual

que los padres, las frecuencias genotípicas de la siguiente generación serán nuevamente p^2 , $2pq$ y q^2 .

3.- Las frecuencias genotípicas de equilibrio se logran en una sola generación de apareamiento al azar. Si las frecuencias alélicas de machos y hembras son p y q , las frecuencias en la progenie serán p^2 , $2pq$ y q^2 .

Por lo tanto, manteniendo el entrecruzamiento aleatorio, y si ningún factor que afecte las frecuencias alélicas presente, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación.

FACTORES QUE AFECTAN LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS.

La ley de Hardy-Weinberg dice que, en ausencia de procesos modificadores, las frecuencias de los genes no cambian, pero siempre hay procesos que afectan las frecuencias de los genes, y sin ellos no hay evolución. La ley de Hardy-Weinberg es el punto de referencia a partir del cual podemos estudiar el efecto de los procesos evolutivos.

APAREAMIENTO AL AZAR.

La ley de Hardy-Weinberg se aplica únicamente cuando el entrecruzamiento es aleatorio, es decir, cuando la probabilidad de entrecruzamiento entre dos genotipos es el producto de sus frecuencias. El entrecruzamiento *selectivo* prevalece cuando no hay entrecruzamiento al azar; cuando es más probable que se entrecrucen los individuos con ciertos genotipos de lo que se podría esperar al azar. Este tipo de entrecruzamiento, por sí mismo, no cambia las frecuencias génicas, pero sí cambia las frecuencias genotípicas. El efecto general del entrecruzamiento selectivo es la reducción en el número de heterocigotos de una población.

MUTACIÓN.

Aunque las mutaciones génicas y cromosómicas son la fuente básica de la variabilidad genética, ocurren con una frecuencia muy baja. Si fuera el único proceso de cambio genético, la evolución sería un proceso infinitamente lento.

MIGRACIÓN.

La migración o flujo génico ocurre cuando los individuos se trasladan de una población a otra y se cruzan con la segunda. No cambia las frecuencias génicas de toda la especie, pero puede cambiarlas localmente cuando las frecuencias génicas de la población residente son distintas de las frecuencias de la población emigrante. Si el flujo génico continúa, puede causar que ambas poblaciones sean genéticamente similares.

La proporción de individuos emigrantes con respecto a la población residente se conoce como *tasa de migración (m)*, y es un parámetro importante para determinar cómo la migración acelerada puede causar que las poblaciones se vuelvan genéticamente similares; m es un parámetro importante en genética poblacional de vectores, porque estima el potencial de propagación de un patógeno de una población a otra (De Sousa *et al*, 1996).

ESTADÍSTICOS F.

Un modo de estimar m es dividir los niveles de variación genética entre poblaciones usando los estadísticos F de Wright o Índices de Fijación para caracterizar la distribución genotípica de dos alelos en un *locus*, basándose en la diferencia entre la heterocigosidad encontrada y la heterocigosidad esperada por el equilibrio Hardy-Weinberg.

A menudo observamos en una población de vectores, que los individuos que ocupan una determinada región geográfica se encuentran distribuidos en grupos. De modo que estos individuos (I) se encuentran distribuidos en subpoblaciones (S) dentro de la población total (T).

El entrecruzamiento aleatorio inter e intra subpoblaciones crea una estructura jerárquica en la población total, son los niveles de variación genética mencionados anteriormente. Wright introduce tres estadísticos F (F_{IS} , F_{ST} y F_{IT}) mediante los que la desviación total de las proporciones genotípicas respecto a lo esperado por el equilibrio Hardy-Weinberg se descompone en:

*Desviación causada por diferencias entre subpoblaciones

*Desviación ocurrida dentro del ámbito de las subpoblaciones.

como un modo de describir la estructura reproductora de las poblaciones naturales. Los estadísticos F pueden calcularse a partir de la heterocigosis observada en los diferentes niveles jerárquicos (individuo, subpoblación, población total).

El entrecruzamiento no aleatorio de las subpoblaciones es descrito por F_{IS} y se define como la reducción de la heterocigosis de un individuo causada por el entrecruzamiento no aleatorio dentro de su población. Es el promedio de la correlación de gametos unidos de todas las poblaciones con respecto a los gametos correlacionados de una subpoblación (Wright,1980). Dos gametos son correlacionados si ambos presentan dos alelos idénticos por descendencia; es decir, los dos alelos provienen del mismo alelo en un padre ancestral. Esto puede ocurrir comúnmente en sistemas con alta consanguinidad o en subpoblaciones pequeñas y aisladas. F_{IS} es calculada como $1 - (H_{obs}/H_{exp})$. Si los valores de heterocigosidad son idénticos, entonces F_{IS} es cero, la población está en equilibrio Hardy-Weinberg y no hay correlación entre los gametos unidos. La endogamia puede conducir a un exceso de homocigotos o deficiencia de heterocigotos. En este caso, F_{IS} es mayor que 0, la subpoblación no está en equilibrio Hardy-Weinberg y no hay correlación entre la unión de gametos. F_{IS} pueden ser menores que 0, en circunstancias que conduzcan a un exceso de heterocigotos. La correlación es negativa porque es más probable que los gametos que conformen a los cigotos lleven alelos que no son idénticos por descendencia.

El entrecruzamiento aleatorio entre poblaciones es descrito por F_{ST} y se define como la reducción de la heterocigosidad en una subpoblación debida a la deriva génica. Es el grado de correlación existente entre gametos unidos al azar dentro de una subpoblación con respecto a los gametos unidos en la población total. (Wright, 1951). Describe la situación particular de una subpoblación. F_{ST} es positiva cuando hay restricción en el flujo génico entre las subpoblaciones porque los gametos de una subpoblación llevan alelos que más a menudo derivan de un antecesor común en comparación con los gametos de la población total.

$$F_{ST} = 1 - H_{esp} \text{ en la subpoblación} / H_{esp} \text{ en población total.}$$

La deriva génica, el efecto fundador o la selección local podrían causar la unión de gametos correlacionados dentro de una subpoblación. F_{ST} es la varianza estándar de las frecuencias alélicas entre subpoblaciones. Wright la describe como el rango de varianza observada (S^2) en las frecuencia alélicas entre distintas poblaciones en relación a la máxima varianza posible bajo el aislamiento total de las poblaciones. La varianza máxima que fué discutida en deriva génica como $p(1-p)$ y F_{ST} pueden calcularse como $S^2/p(1-p)$. F_{ST} puede ser calculada como $1 - (H_{esp} \text{ en la subpoblación} / H_{esp} \text{ en población total})$, donde H_{esp} en la subpoblación es el promedio H_{esp} descrito anteriormente, y H_{esp} en la población total es calculada con el mismo procedimiento pero con el promedio no ponderado de la frecuencia alélica entre subpoblaciones. Esto podría disminuir la heterocigosidad entre subpoblaciones a partir del efecto Wahlund.

Para resumir el entrecruzamiento no aleatorio en la población completa, Wright introdujo F_{IT} como el coeficiente de consanguinidad total de un individuo. Este parámetro mide la proporción de gametos correlacionados con respecto a los gametos presentes en la población total. F_{IT} contiene un componente relativo al apareamiento no aleatorio dentro de las subpoblaciones (F_{IS}) y otro debido a la subdivisión entre ellas (F_{ST}); esto es, F_{IT} mide la

reducción de heterocigosidad de un individuo con respecto a la reducción en la población total, y se relaciona con otros estadísticos con la siguiente fórmula: $(1-F_{IS})(1-F_{ST}) = (1-F_{IT})$. F_{IT} es un coeficiente de consanguinidad en la población total que resulta de la consanguinidad dentro de las poblaciones y el efecto Wahlund entre las subpoblaciones.

EFEECTO WAHLUND.

Cuando prueba que una población está en equilibrio Hardy-Weinberg se asume que la muestra de individuos proviene de un solo cruzamiento aleatorio. Si una sola muestra es una mezcla de dos poblaciones genéticamente diferentes, puede no encontrarse en equilibrio. Por ejemplo, si se tienen dos poblaciones, una totalmente AA y la otra totalmente BB . No hay heterocigotos AB en ninguna de las dos poblaciones. Pero al hacer un muestreo se asume que la muestra pertenece a una sola población, entonces se encuentran frecuencias genotípicas como $AA=0.5$ y $BB=0.5$, por lo tanto $p=q=0.5$. De acuerdo al equilibrio Hardy-Weinberg, la proporción de heterocigotos sería $2pq = 0.5$; sin embargo no hay ninguno. La reducida heterocigosidad observada debido al muestreo de más de una población simultáneamente es el efecto Wahlund (Hartl y Clark, 1989). Dicho de otro modo, es la deficiencia de heterocigotos resultante de muestrear simultáneamente dos poblaciones aisladas entre sí y con diferentes frecuencias alélicas. Una implicación de esta situación es que la presencia del efecto Wahlund podría indicar la coexistencia de poblaciones aisladas reproductivamente (Gooding, 1996).

ESTIMACIÓN DE LA MIGRACIÓN.

El estadístico para estimar m es F_{ST} y se relaciona con m como $F_{ST} = 1 / (1 + 4Nm)$, o $Nm = (1 - F_{ST}) / 4 F_{ST}$. El valor de Nm es el producto de un número potencialmente grande de población N , y una frecuencia potencialmente pequeña de la tasa de migración m . Sin embargo, $m =$ al número de migrantes $/N$, por lo que Nm es el número absoluto de migrantes, sin importar el tamaño de la población. Esto significa que diferentes frecuencias génicas entre estas subpoblaciones son mantenidas por aproximadamente un individuo que migra cada dos

generaciones, sin tomar en cuenta los tamaños poblacionales. En principio, una tasa de migración baja puede ser necesaria para mantener cierta homogeneidad genética entre las subpoblaciones. Cuando Nm se acerca a 10, F_{ST} declina rápidamente a 0.

DERIVA GÉNICA.

La deriva génica se refiere a cambios en las frecuencias génicas por variación en el muestreo de generación en generación. Si se asume que en cierta población dos alelos, A y a están presentes con una frecuencia de 0.40 y 0.60, respectivamente, la frecuencia de A en la siguiente generación puede ser mayor o menor que 0.40, simplemente porque, por azar, el alelo A se encuentra con menos o más frecuencia de lo esperado en los gametos que forman los cigotos de la siguiente generación. El principio general es que la magnitud en los cambios de frecuencias está en proporción inversa al tamaño de la población. Cuanto menor sea la población de individuos reproductores de una población, mayores serán los cambios en frecuencias alélicas. Se toma como la población efectiva a los individuos que producen la siguiente generación en lugar de la población total, porque son estos individuos los que transmiten sus genes a la generación siguiente. La frecuencia con que aparece un alelo en una muestra dada (o una generación dada) pasa a ser la probabilidad de que aparezca este mismo alelo en la siguiente muestra (generación). Es decir, si la frecuencia de un alelo cambia, por ejemplo, de 0.5 a 0.6, la probabilidad de que se presente este alelo en la siguiente generación pasa a ser 0.6. Así, un alelo que haya aumentado de frecuencia, puede aumentar más o disminuir su frecuencia en la(s) siguiente(s) generacion(es). Si el alelo se “pierde” o se “fija”, es decir, si logra una frecuencia de 0 o de 1, el proceso se detiene; el alelo no puede cambiar nuevamente de frecuencia, a no ser que aparezca un nuevo alelo por mutación.

La deriva génica afecta la heterocigosidad observada de una población. En una población en equilibrio Hardy-Weinberg donde $p = q = 0.5$ la heterocigosidad es $2pq = 0.5$, siendo esta la máxima heterocigosidad esperada. Sin embargo, una generación tras otra, los valores de p y q fluctúan por arriba y por debajo de 0.5, a causa de las variaciones en el

tamaño efectivo de la población. Eventualmente, la frecuencia génica puede fluctuar a tal extremo que un gen en particular puede favorecer un único alelo en la población ($p=1$). Cuando esto sucede, se dice que el alelo está fijo en la población. Si no hay migración que cambie las frecuencias alélicas, no hay fluctuación en este alelo. En cada generación, aún en aquellas que estén en equilibrio Hardy-Weinberg hay alguna probabilidad de que algún alelo pueda perderse completamente, o fijarse. Al ocurrir esto, las frecuencias génicas no pueden variar mucho debido solamente a la deriva génica, porque la variación no es grande en el *locus*. Eventualmente, la población puede acercarse a la homocigosidad (Hartl y Clark, 1988).

A menos que una población sea muy pequeña, los cambios de frecuencias alélicas debidos a la deriva génica serán pequeños de una generación a otra, pero los efectos a través de muchas generaciones podrán ser grandes. Si no hay otros procesos (mutación, migración, selección) que afecten a las frecuencias alélicas en el *locus*, el resultado final será la fijación de un alelo y la eliminación de los demás.

EFEECTO FUNDADOR Y CUELLO DE BOTELLA.

Casos extremos de deriva génica ocurren cuando se establece una nueva población con muy pocos individuos. Este fenómeno ha sido llamado por Ernst Mayr el *efecto fundador*. Supongamos que una población de determinada especie queda aislada de las demás poblaciones de sus congéneres, con poca o nula posibilidad de tener contacto (y por lo tanto, posibilidades de entrecruzamiento) con éstas. El tamaño efectivo de esta población será reducido, y por lo mismo las frecuencias génicas de varios *loci* es más probable que sean diferentes en los individuos de esta población aislada en comparación con las poblaciones de donde proceden, lo cual puede tener un efecto perdurable en la evolución de estas poblaciones aisladas. Variaciones al azar en las frecuencias alélicas similares a las producidas por el efecto fundador ocurren cuando las poblaciones pasan por *cuellos de botella*. Cuando las poblaciones se encuentran con situaciones desfavorables para su supervivencia, pueden reducirse drásticamente en número y correr el riesgo de extinguirse. Tales poblaciones pueden

recuperar más tarde su tamaño normal, pero la deriva puede alterar considerablemente sus frecuencias alélicas durante el cuello de botella y por lo tanto en las siguientes generaciones.

SELECCIÓN NATURAL.

La selección natural es el factor más crítico entre los que afectan las frecuencias alélicas en las poblaciones. Los parámetros anteriores-mutación, migración, deriva, apareamiento aleatorio- presentan una característica común: ninguno está orientado hacia la adaptación. Estos procesos cambian las frecuencias alélicas independientemente de que estos cambios aumenten o disminuyan la adaptación de los organismos a su medio ambiente. Por lo mismo, podrían destruir la organización y adaptación característica de los seres vivos. La selección natural es el proceso que promueve la adaptación y mantiene a raya los efectos desorganizadores de los otros procesos. En este sentido la selección es el proceso más crítico, porque explica la naturaleza adaptativa y altamente organizada de los seres vivos así como su diversidad, porque promueve su adaptación a diferentes formas de vida.

La idea de la selección natural como un proceso fundamental de la evolución fue propuesta por Charles Darwin y Alfred Rusell Wallace en 1858. En *El origen de las especies*, en 1859, Charles Darwin propuso que los portadores de variaciones hereditarias útiles como adaptaciones al medio ambiente tienen más probabilidades de sobrevivir y producir más progenie que los organismos que poseen variaciones menos útiles. Como consecuencia, las variaciones adaptativas aumentan gradualmente su frecuencia al paso de las generaciones a expensas de las menos adaptativas. Este proceso de multiplicación diferencial de las variaciones hereditarias es la selección natural. El resultado del proceso son organismos bien adaptados a su ambiente. Se puede definir la selección natural como la reproducción diferencial de variantes genéticas alternativas, determinada por la mayor o menor posibilidad de supervivencia que aporten. (Ayala, 1984).

PROCESOS DE ESPECIACIÓN Y FORMACIÓN DE NUEVAS ESPECIES.

ANAGENESIS Y CLADOGENESIS.

El proceso evolutivo tiene dos dimensiones: *anagenesis*, o evolución dentro de un linaje, y *cladogenesis*, o diversificación. Esta última ocurre cuando un linaje se divide en dos o más linajes. El proceso cladogenético fundamental es la *especiación*, proceso por el cual una especie se divide en dos o más especies.

EL CONCEPTO DE ESPECIE.

En los organismos con reproducción sexual una especie es un grupo de poblaciones naturales que se cruzan entre sí y que están reproductivamente aisladas de otros grupos. La capacidad de entrecruzamiento es de gran importancia evolutiva, porque determina que las especies sean unidades evolutivas distintas e independientes. Desde otro ángulo, los individuos de una especie comparten un acervo de genes comunes que no es compartido, por los individuos de otras especies. Debido al aislamiento reproductivo, las diferentes especies han desarrollado independientemente sus acervos de genes.

El aislamiento reproductivo es el criterio de especiación en los organismos sexuales. Una especie ancestral se transforma en dos especies hijas cuando un conjunto de poblaciones capaces de entrecruzarse se separa en dos conjuntos reproductivamente aislados.

Las propiedades biológicas de los organismos que impiden el entrecruzamiento se llaman mecanismos de aislamiento reproductor (MARs). Estos pueden clasificarse como pre-cigóticos y post-cigóticos. Ambos tienen la misma finalidad: impiden el intercambio de genes entre especies distintas. La selección natural favorece el desarrollo de los MARs precigóticos en poblaciones ya aisladas por MARs postcigóticos siempre que las poblaciones coexistan en el mismo territorio y haya posibilidad de formación de cigotos híbridos.

EL PROCESO DE ESPECIACIÓN.

Las especies son grupos de poblaciones aisladas reproductivamente. La pregunta de cómo se forma una nueva especie equivale a preguntarse cómo surge el aislamiento reproductivo entre grupos de poblaciones. En general, el aislamiento reproductivo suele comenzar como un subproducto incidental de divergencia genética, pero se completa cuando es favorecido directamente por la selección natural. La especiación puede darse de diversas formas, pero se pueden reconocer dos etapas principales:

ETAPA 1. Primero, se necesita que el flujo génico entre dos poblaciones de la misma especie sea detenido de algún modo casi o completamente. La ausencia de flujo génico capacita a las dos poblaciones para diferenciarse genéticamente como consecuencia de adaptarse a diferentes circunstancias locales o a diferentes formas de vida, y también como consecuencia de la deriva génica, que puede desempeñar un papel de mayor o menor importancia, según las circunstancias). A medida que las dos poblaciones se vuelven cada vez más distintas genéticamente, aparecen los mecanismos de aislamiento reproductivo, ya que ambos acervos genéticos están mutuamente coadaptados; los individuos híbridos tendrán una constitución genética disarmónica y su eficacia biológica se verá reducida por disminución de viabilidad (capacidad de engendrar descendencia que sobreviva) o fertilidad.

Así, las características de la 1^{er} etapa son: Aparición de aislamiento reproductivo primariamente en forma de MARs postcigóticos, y que estos mecanismos son el subproducto de la diferenciación genética: el aislamiento reproductivo no es aún favorecido directamente por la selección natural.

La diferenciación genética y la consiguiente aparición de MARs postcigóticos, es por lo general un proceso gradual. Por esto, decidir si un proceso de especiación ha comenzado o

no entre dos poblaciones es algo arbitrario. Puede considerarse que dos poblaciones están en la primer etapa de especiación si han aparecido MARs entre ellas.

ETAPA II. Esta etapa comprende la terminación del proceso de aislamiento reproductivo. Supongamos que las condiciones externas que originalmente impedían el flujo génico entre dos poblaciones desaparecen, por ejemplo porque esas dos poblaciones originalmente aisladas en territorios distintos se expanden y llegan a ocupar al menos parte de un territorio común. Pueden suceder dos cosas: 1) se origina un acervo común de genes, ya que la pérdida de eficacia biológica de los híbridos no es muy grande y las dos poblaciones se fusionan. 2) aparecen finalmente dos especies, porque entonces es la selección natural la que favorece directamente la aparición de aislamiento reproductivo.

La primer etapa de especiación es reversible; si no ha ido muy lejos, es posible que dos poblaciones con diferenciación incipiente se fusionen en un solo acervo de genes. Pero si los cruzamientos entre individuos de distintas poblaciones producen progenie con viabilidad o fertilidad reducida, la selección natural favorecerá directamente las variantes genéticas que faciliten los cruzamientos entre individuos de la misma población.

Las dos características de la segunda etapa son, pues, 1) el aislamiento reproductivo se manifiesta sobre todo en MARs precigóticos, y 2) estos MARs precigóticos son favorecidos por la selección natural.

DISTANCIA Y SIMILITUD GENÉTICA.

El uso de la electroforesis en gel permite estimar la cantidad de cambios genéticos durante los procesos de especiación. Un método útil, propuesto por Masatochi Nei de estimar la diferenciación genética entre dos poblaciones utilizando datos electroforéticos es el uso de dos parámetros: *Identidad genética (I)* que estima la proporción de genes que tienen una estructura en las dos poblaciones, y la *distancia genética (D)*, que estima el número de sustituciones

alélicas por *locus* que han ocurrido en la evolución independiente de las dos poblaciones. Hay una sustitución alélica cuando un alelo es reemplazado por un alelo distinto, o un conjunto de alelos es reemplazado por otro conjunto de alelos distintos. La distancia genética (D) puede variar desde 0 (ningún cambio alélico) hasta infinito; D puede ser mayor a 1 porque cada *locus* puede experimentar más de una sustitución alélica completa si la evolución transcurre durante largos períodos de tiempo (Ayala, 1984).

MATERIALES Y MÉTODOS.

ÁREAS DE ESTUDIO.

En base a estudios previos (Loyola y cols, 1991; Vaca-Marín y cols, 1991; Arredondo-Jiménez, 1995), se seleccionaron localidades de los estados de Chiapas y Tabasco en donde se ha reportado paludismo en años recientes y donde se había confirmado la presencia de *An. vestitipennis*. Las colectas de mosquitos antropofílicos y zoofílicos de *An. vestitipennis* fueron realizadas en 6 localidades de la región costa (Cosalapa y Herradero, Mpio. de Suchiate [14°, 37'30"N, 92°16'54"W], Lázaro Cárdenas, Mpio. de Huixtla [15°02'35"N, 92°32'17"W]; Río Arriba y Altamira Mpio. de Acacoyagua [] y El Fortín, Mpio. de Pijijiapan []), y 2 de la selva Lacandona (Benemérito de las Américas [16° 31'08" N, 90° 39' 02" W] y López Mateos [16° 12' 26" N 90°, 52' 04" W], Mpio. de Ocosingo), en el estado de Chiapas, además de 1 sitio en Tabasco (San Pedro, Mpio. de Balancán []) (Fig. 2).

COLECCIONES ENTOMOLÓGICAS.

En cada localidad se realizaron colectas nocturnas de 12 horas de mosquitos *An. vestitipennis* en cebo humano y con trampa animal (Service, 1993; Arredondo-Jiménez, 1995), durante 10 noches consecutivas de enero a septiembre de 1996. Cuatro voluntarios en turnos de 2, se situaron dentro y fuera de las viviendas colectando mosquitos al posarse sobre sus piernas con turnos de 6 horas (de 1800-2400 y de 2400 a 0600). Las colectas se realizaron durante los primeros 40 minutos de cada hora y al término de éstos los técnicos se desplazaron a coleccionar los mosquitos que estaban reposando sobre la pared interior de una trampa tipo Magoon modificadada (Service 1993) cebada con un caballo o novillo. La trampa consistió en una malla de mosquitero de 4 x 4 x 4 m que rodeaba al animal y se preparaba situando al cebo animal en el centro del interior de ésta amarrado a una estaca y rodeándolo luego con la trampa. Durante el ciclo de 12 horas, la base de las paredes de la trampa permaneció levantada

30 cm para permitir la entrada de mosquitos. Esta colecta tuvo una duración de 15 min de cada hora. No se colectó durante más tiempo ya que de ser así los colectores se convertirían en cebos. Los resultados de las colectas de mosquitos en cebo humano o animal durante varias noches, se expresaron como número promedio de mosquitos colectados por hombre o animal por hora. Para el análisis genético cada localidad, se colectó un mínimo de 50 mosquitos en cebo humano intradomiciliar, 50 en trampa animal (caballo) y 50 en corrales de ganado vacuno. Los mosquitos fueron transportados vivos o preservados en hielo seco al Centro de Investigación de Paludismo en donde se almacenaron a - 70° C hasta su procesamiento.

PURIFICACIÓN DE DNA DE *An. vestitipennis*

El protocolo seguido para la extracción de DNA de mosquito es una modificación del protocolo reportado por Coen *et al* (1982): Se colocó el mosquito en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, y con 25 ml de buffer de extracción (Ver apéndice) y maceró muy bien con un pistilo con punta adecuada al fondo del tubo, hasta quedar sin partes reconocibles, enjuagando el pistilo con 25 ml más de buffer de extracción. Luego, se centrifugó por 30 seg para concentrar los restos al fondo del tubo. Después, se incubó el tubo con el homogenado a 65°C por 30 min. Mientras los tubos todavía estaban calientes, se agregó a cada uno 7 ml de Acetato de Potasio 8M. Se incubó en hielo como mínimo 30 min. para precipitar el SDS del buffer de extracción. A continuación, se centrifugó a 14,000-17,000 xg por 15 min. transfiriendo el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y estéril, procurando no llevarse nada del precipitado de SDS. Se centrifugó a 4°C. El sobrenadante fue adicionado con 100 ml de ETOH absoluto, incubando inmediatamente después en hielo por 5 min. OPCIONAL: el proceso pudo suspenderse en este punto, conservando los tubos a -20°C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 14,000-17,000 xg por 15 min. Se retiró cuidadosamente el etanol. Se agregó de nuevo 100 ml de ETOH al 70%, lavando y centrifugando por 5 min. y luego retirando cuidadosamente el etanol. En este punto, el DNA se encuentra precipitado en los lados y el fondo del tubo, y puede o no verse como una mancha borrosa. Sin desesperar, se hizo luego un lavado y

centrifugado con 100 ml de etanol absoluto por 5 min. Se retiró el etanol absoluto. Por última vez se agregó 100 ml de etanol al 70% y se lavó descartando el etanol con cuidado. Se secó totalmente la humedad del tubo en Speed Vac o por 10 min. en un termoblock a 42°C. Luego, se resuspendió el pellet de DNA en 200 µl de TE pH 8.0 durante un mínimo de 12 horas a 4°C. Con este protocolo el DNA permaneció estable hasta por más de 6 meses.

PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES DE RAPD-PCR.

La técnica se estandarizó del siguiente modo: Por cada individuo se hizo una reacción de 50 µl de volúmen total, conteniendo:

- 35.3 µl de H₂O bidestilada estéril
- 5.0 µl buffer 10X para PCR (Perkin-Elmer-Cetus)
- 6.0 µl MgCl₂ 100 mM.
- 0.5 µl dNTP 20 mM
- 1.0 µl del primer elegido (50 pmol/ul).
- 0.2 µl *Taq* polimerasa
- 1-2 µl DNA (20-50 ng)
- 25.0 µl aceite mineral estéril

Para evitar errores de pipeteo al hacer reacciones individuales, se preparó una mezcla principal (master mix) con las cantidades necesarias de cada reactivo (excepto DNA, polimerasa y aceite mineral). Posteriormente, se colocó la mezcla en un transiluminador de UV onda corta (260-320 nm) por 10-15 min. Este paso de esterilización del material se hizo para destruir cualquier DNA contaminante que pudiera existir en los reactivos, que posteriormente actuaría como DNA "molde" durante la reacción de PCR.

Se tomaron aliquotas de 48 μ l de la mezcla principal y colocaron en tubos Eppendorf de 0.5 ml. Fue necesario calcular las cantidades teniendo en cuenta una reacción con todos los reactivos, excepto DNA y fue tomada como el control negativo. El propósito fue verificar la pureza de los reactivos.

Se adicionaron 25 μ l de aceite mineral estéril a cada tubo para evitar que en el curso de la reacción de PCR se evaporase el contenido del tubo a causa de las temperaturas que se requieren para la desnaturalización del DNA (92-95° C).

Se tomaron 2 μ l de DNA resuspendido en TE (20-50 ng) y se colocaron cuidadosamente en cada tubo, traspasando el aceite mineral y asegurándose de depositarlos en la solución de reactivo. Se colocó cada tubo Eppendorf en el termociclador. Los tubos fueron mantenidos a 95°C por 5 min., reduciendo luego la temperatura a 80°C y adicionando en ese momento la *Taq* Polimerasa a través del aceite. Esto se hizo porque algunos procesos de extracción de DNA producen fragmentos simples que pudieran favorecer una hibridación no específica del primer. La enzima trabajó a temperatura ambiente, sintetizando estos fragmentos, y dando lugar a los "artefactos" que fueron replicados posteriormente durante la PCR.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Las condiciones estandarizadas de temperatura y tiempo fueron las siguientes:

PASO 1. DESNATURALIZACION DEL DNA. 92°C por 1 min. En este paso la alta temperatura provocó la separación de la doble cadena de DNA en dos cadenas sencillas.

PASO 2. HIBRIDACIÓN. 35°C por 1 min. Las secuencias iniciadoras de la reacción se unieron o hibridaron a sus secuencias complementarias a lo largo de distintos puntos de las cadenas de DNA.

PASO 3. EXTENSIÓN GRADUAL. Incremento gradual de la temperatura del termociclador, de 35°C a 72°C, a razón de 1°C cada 8 seg.

PASO 4. EXTENSIÓN. 72°C por 2 min. Temperatura óptima para la actividad de la polimerasa. Comienza la síntesis de nuevas cadenas de DNA, tomando como molde o "guia" de replicación aquellas cadenas de DNA que hallan quedado delimitadas por las secuencias iniciadoras. En los ciclos siguientes, estos mismos fueron replicados (amplificados) una y otra vez por la *Taq* polimerasa. Los cuatro pasos anteriores conformaron un ciclo. Este mismo proceso se llevó a cabo 45 veces.

PASO 5. EXTENSIÓN FINAL. 72°C por 7 min. En este paso, la polimerasa terminó de sintetizar aquellos fragmentos que hubiesen quedado "inconclusos" en los ciclos anteriores.

PASO 6. Conservación de las reacciones a 4°C.

ELECTROFORESIS DE LAS REACCIONES DE PCR EN GELES DE AGAROSA.

Los geles de agarosa se prepararon a una concentración de 1.5%. Con 700 ml de buffer de Tri-boratos-EDTA o TBE al 1X (Ver Apéndice), se tomaron 85 ml para hacer el gel; a este volumen se le agregaron 1.2 g de agarosa. El resto de la solución se empleó para llenar la cámara de electroforesis. Una vez que la agarosa estuvo perfectamente disuelta se agregaron 7-8 µl de bromuro de etidio, se vacía la agarosa a la cámara de electroforesis y se espera a que

gelifique totalmente. El volumen de reacción por carril es de 25 μ l. Cada muestra se carga con 3.5 μ l de amortiguador de carga (ver Apéndice).

El marcador utilizado como referencia para calcular la longitud de los fragmentos amplificados fue 1 Kb DNA Ladder, el cual presenta fragmentos desde menos de 500 pb hasta 3,000 pb, con un incremento gradual de aproximadamente 500 pb. Este marcador da un rango muy amplio de longitudes de fragmentos.

Para obtener mejor separación de los fragmentos de amplificación se corrieron los geles a 40 V durante 8 horas. Posteriormente se fotografiaron los geles para llevar un registro de los experimentos realizados, anotando en la parte posterior de la fotografía la fecha y los individuos analizados por localidad y método de captura.

SELECCIÓN DE PRIMERS.

Se realizaron experimentos de amplificación aleatoria con los kits A, B, C y D de primers comerciales (Operon Technologies Inc., Alameda, California) en total 62, los cuales fueron previamente disueltos en TE pH 7.4 o en agua bidestilada estéril, según las instrucciones del fabricante (Operon Technologies, 1994). La concentración final en una reacción de 50 μ l es de 50 pmol.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

PROGRAMA RAPDPLOT 2.4.

Escrito en FORTRAN, expresa diferencias genéticas entre individuos partiendo de marcadores genéticos obtenidos por RAPDs-PCR.

Cada línea de la BASE DE DATOS contiene el nombre de un individuo, seguido de la información genética de cada individuo en forma de 0's y 1's, donde '1' significa la presencia de determinado marcador en ese individuo, y '0' la ausencia del mismo.

Los fragmentos producidos por RAPD-PCR muestran segregación independiente; esto sugiere que representan *loci* individuales (Williams *et al*, 1991) y son además alelos dominantes, por lo que la presencia de un fragmento indica un individuo homocigoto dominante (*AA*) o heterocigoto (*Aa*), mientras que la ausencia de tal fragmento nos indica a un homocigoto recesivo (*aa*).

Esta base de datos puede formar dos tipos de matrices, según la fórmula de distancia genética utilizada (1-%MATCH) o (1-SIMILARITY). La fórmula utilizada para comparar bandas producidas por RAPDs es la siguiente:

$$M=NAB/NT$$

M = "match", significa el "parecido" entre dos individuos respecto a si ambos presentan o no determinado marcador.

NAB = Total de bandas presentes y ausentes entre A y B

NT = Total de bandas presentes en el estudio.

Un valor de M = 1 indica que dos individuos presentan un patrón genético idéntico, mientras que un valor de M = 0 indica que ambos son totalmente distintos.

PROGRAMA NEIGHBOR-Joining/UPGMA 3.5.

El programa NEIGHBOR-Joining/UPGMA method version 3.5 implementa el método Neighbor-Joining de Nei y Satou (1987) y el método UPGMA de agrupamiento promedio no

ponderado (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) para identificar las asociaciones genéticas presentes entre las localidades. Usando el método UPGMA, un árbol es construido por la primer unión de dos poblaciones o especies con la distancia genética más pequeña. Construye un “árbol” de parentescos mediante el agrupamiento sucesivo de individuos cercanamente emparentados entre sí (linajes), establece la longitud de las ramificaciones y la relación entre cada “linaje”: Es una representación del parentesco existente entre todos y cada uno de los individuos estudiado.

PROGRAMA RAPDDIST.

RAPDDIST es un programa escrito en lenguaje FORTRAN para dilucidar distancias genéticas entre subpoblaciones partiendo de una base de datos de fragmentos RAPD. Presenta la opción de señalar si los datos provienen de organismos haploides o diploides, así como de considerar los fragmentos como FENOTIPICOS en vez de GENOTIPICOS.

Para organismos diploides el programa da la opción de aplicar la corrección de Lynch y Milligan (1994) al momento de estimar frecuencias alélicas.

COMO FUNCIONA.

RAPDIST realiza un muestreo aleatorio entre los datos disponibles, creando pseudorélicas de nuevas bases de datos. El proceso se conoce como “*bootstrapping*” y es una selección aleatoria de los datos originales (*loci*), de modo que algunos *loci* serán tomados más de una vez, y otros no serán muestreados en ningún momento. El propósito de esto es probar la solidez de los parentescos estimados en nuestra base de datos. Si los parentescos estimados en el dendrograma o árbol resultante del “*bootstrapping*” son confirmadas por las frecuencias alélicas en sólo uno o pocos *loci*, entonces este método nos indica que hay poco respaldo para las relaciones interpopulacionales establecidas. De modo contrario, si las frecuencias alélicas son diferentes consistentemente en un gran número de *loci*, entonces este

método nos da un buen respaldo o confirmación de los parentescos establecidos. Un nivel alto de confirmación dada por la técnica de “*bootstrap*” (mayor al 90%), indica un fuerte respaldo para agrupamientos específicos de individuos, mientras que un bajo grado de confirmación indica la necesidad de aportar más datos a los que tenemos para confirmar la presencia de una rama determinada, o eliminarla. West y Black (1996), discutieron la interpretación de estas bases de datos formadas con el método “*bootstrap*” como un modo de inferir el grado de aislamiento reproductivo entre poblaciones.

Las matrices resultantes del muestreo aleatorio hecho por RAPDDIST pueden colapsarse y producir dendrogramas por el programa NEIGHBOR. Este produce un dendrograma por cada pseudoréplica.

PROGRAMA RAPDFST 4.0.1.

Este programa escrito en FORTRAN estima flujo génico (F_{ST}) y los rangos efectivos de migración entre subpoblaciones partiendo de bases de datos obtenidas con RAPD-PCR. Para esto, utiliza tres métodos para estimar F_{ST} :

a) Por la fórmula original de Wright (1931):

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

El programa computa F_{ST} como:

$$F_{ST} = \text{Varianza } (p) / (\text{Promedio } p (1 - \text{promedio de } p))$$

Donde p es la frecuencia de un alelo en un *locus* producido por RAPD y promedio de p es la frecuencia promedio ponderada entre todas las subpoblaciones. Este parámetro F_{ST} es el rango de varianza observada en la frecuencia de un alelo determinado dentro de una

subpoblación, respecto a la varianza máxima de este alelo en la población total. Al multiplicar este estimado de F_{ST} por $2N$ obtenemos un equivalente al test de contingencia de χ^2 con la siguiente fórmula:

$$\text{Chi cuadrada} = 2N F_{ST}$$

Con grados de libertad = número de subpoblaciones -1.

RAPDFST obtiene los valores de F_{ST} para cada *locus* RAPD asumiendo que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy -Weinberg y que la dominancia es la condición común de todos los *locus*. Entonces calcula el rango efectivo de migración (Nm) y valores de contingencia de Chi cuadrada, obteniendo marcadores o puntos de probabilidad para examinar la significancia de ambos valores.

2) Por medio del valor Theta de Weir y Cockerman (1984), que proporciona valores corregidos para tamaños de muestra pequeños e irregulares, según la fórmula de Weir y Cockerman.

3) Por último, RAPDFST también obtiene valores de F_{ST} utilizando el método descrito por Lynch y Milligan (1994). Esta ecuación sólo permite calcular F_{ST} obtenida con todos los *loci*. Black (1996), derivó algunas ecuaciones para obtener la F_{ST} para *loci* individuales con éste método.

Para todas estas estimaciones, la fórmula de rango efectivo de migración (Nm) se estima con la siguiente fórmula:

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

RESULTADOS

ABUNDANCIA Y CICLOS DE PICADURA DE *Anopheles vestitipennis*.

En las 9 localidades estudiadas (Benemérito de las Américas y López Mateos en la Selva Lacandona, San Pedro Balancán en Tabasco y Cosalapa, Herradero, Lázaro Cárdenas, Río Arriba), se colectaron un total de 9233 mosquitos en un total de 2555 horas de muestreo, promediando 3.61 mosquitos por hora (Tabla 11). La razón de colectas en función del número promedio de mosquitos colectados por hora fue muy similar en cebo humano intra, peridomiciliar y trampa animal (1:1.10:1.03), mientras que se colectaron más mosquitos en corrales (4.91 mosquitos/hora, o razón de 1:1.63 comparado a los mosquitos colectados en cebo humano).

Las mayores densidades de mosquitos en contacto con humanos correspondieron a las localidades de San Pedro, López Mateos y Altamira (9.0 ± 0.4 y 17 ± 0.8 ; 6.9 ± 0.4 y 5.3 ± 0.2 ; 6.2 ± 0.1 y 6.0 ± 0.1 mosquitos por hora, respectivamente, dentro y fuera de las casas), mientras que más mosquitos se alimentaron de animales en Altamira y Lázaro Cárdenas (13 ± 0.2 , 6.9 ± 0.9 y 4.2 ± 0.1 mosquitos por hora, respectivamente). Las localidades con menores densidades de mosquitos en contacto con humanos y animales fueron, respectivamente, El Fortín y Cosalapa (0.7 ± 0 y 0.7 ± 0), y Río Arriba y Cosalapa (0.9 ± 0.3 y 1.3 ± 0) (Fig. 15).

El ciclo de picadura (patrón de picaduras por hora de las 1800 a las 0600 hrs), varió notablemente de acuerdo a la localidad y al sitio en donde se colectaron los mosquitos (Figs. 16-24). En los mosquitos en contacto con humanos dentro de las casas, se observó un patrón de picaduras donde por lo general la frecuencia acumulada de picaduras de los mosquitos hacia la medianoche fue menor que en colecciones de mosquitos contactando humanos fuera de la casa, trampa animal o corrales, en donde, en general, más de la mitad de los mosquitos se alimentó antes de la medianoche (Tabla 12).

ANÁLISIS GENÉTICO.

El análisis genético fue realizado en tres fases experimentales: (1) la primera fase consistió en el tamizaje preliminar de 62 primers, resultando en la selección de 60 marcadores identificados en 10 primers (Tablas 2-5; Figura 9). Un análisis visual posterior permitió seleccionar 20 marcadores identificados en 7 primers, descartando los marcadores que se presentaban o no en mosquitos antropofílicos o zoofílicos. (2) la segunda fase consistió en el estudio de los 20 marcadores (Tablas 6-8; Figuras 10 y 11), usando como muestras problema el DNA aislado de 40 mosquitos de 4 localidades (Cosalapa, Río Arriba, Benemérito y San Pedro Balancán), con el fin de estudiar las variaciones interpoblacionales; (3) la tercera fase, consistió en el análisis de 37 marcadores de 7 primers, usando 10 mosquitos antropofílicos y 10 zoofílicos, para establecer la similitud existente entre mosquitos contactando a personas o animales en Benemérito de las Américas, localidad donde previamente se habían reportados diferencias genéticas (Arredondo-Jiménez *et al*, 1996) (Tablas 9 y 10; Figuras 12-14).

El dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA de los 40 individuos y 60 marcadores muestra grupos de individuos agrupados más por localidad que por preferencia alimenticia, con distancias entre grupos de 0.01034 a 0.07905 (Tabla 5).

ESTIMACIÓN DE VALORES DE F_{ST}

La F_{ST} global, es decir, en el análisis interpoblacional fue 0.294, con una desviación estándar de 0.167 mientras que la tasa efectiva de migración promedio fue $Nm = 0.6$. Los valores de F_{ST} obtenidos por Lynch y Milligan (1994) y por el valor θ fueron similares entre sí (0.298 y 0.281 respectivamente), con un valor Nm idéntico al obtenido por el método de Wright ($Nm = 0.6$) (Tabla 3).

El análisis por “*bootstrap*” resultó en un dendrograma que indicó poca consistencia para la separación por mosquitos con diferentes preferencias alimenticias (Fig. 9).

ANÁLISIS INTRAPOBLACIONAL DE LA SELVA.

El análisis intrapoblacional de la localidad de BENE CH y TA se llevó a cabo con 37 marcadores polimórficos en 20 individuos, 10 de CH y 10 de TA. El análisis estadístico de Neighbor-Joining proporcionó una separación de casi el 100%, con sólo dos individuos de TA agrupados con los de CH, y el análisis estadístico con UPGMA dio una separación del 100% (Figura 13).

No fue posible realizar el análisis de otras poblaciones debido a que el DNA aislado de los mosquitos se degradó por varios procesos de descongelación, imposibilitando proseguir con el estudio.

La distancia genética de Nei & Li (1978) fue $D= 0.2465$ para los mosquitos de CH y TA de Benemérito de las Américas, (Figura 12), bastante alta comparada con la distancia obtenida por Arredondo-Jiménez *et al*, (1996) con isoenzimas ($D=0.07$).

El valor promedio de F_{ST} (Wright, 1931) para este análisis intrapoblacional fue de 0.299, el rango efectivo de migración (Nm) fue de 0.6. Los valores de F_{ST} obtenidos por θ y por el método de Lynch y Milligan dan valores similares (0.449 y 0.457, respectivamente), con un rango efectivo de migración de 0.3 individuos por generación; casi un individuo cada tres generaciones (Tabla 10).

DISCUSIÓN.

Anopheles vestitipennis ha demostrado que aparentemente es una especie que al menos tiene dos tipos genéticamente distintos, uno antropofílico y otro zoofílico, indicando que los mosquitos pican indistintamente dentro y fuera de los domicilios. La abundancia de ambas poblaciones de mosquitos fue aproximadamente la misma en las diferentes localidades estudiadas, pero el ciclo de picadura fue muy distinto. Arredondo-Jiménez (1995) encontró que las poblaciones de *An. vestitipennis* y otros anofelinos tienen un ciclo de picadura muy variable, el cual puede ser influenciado tanto por conducta innata como por las condiciones ambientales, el grado de urbanización de las localidades (luz eléctrica o no) y las actividades agrícolas y pecuarias, que definen la presencia de hospederos disponibles para los mosquitos (Arredondo-Jiménez *et al.*, 1995).

La técnica de RAPD-PCR proporciona gran cantidad de marcadores polimórficos, y por lo tanto es un método más sensible para obtener muestras al azar del genoma que las isoenzimas, que presentan la desventaja de estar limitadas a genes que codifican para proteínas específicas, o regiones codificantes (Szmídt *et al.*, 1996). La cantidad de fragmentos potencialmente útiles es extensa; si bien es necesario actuar con cautela en la selección de los fragmentos que serán considerados para análisis posteriores (Black, 1996).

El análisis interpoblacional con 4 localidades y dos tipos de captura dio un nivel moderado de discriminación más por región (Costa o Selva) que por tipo de captura. Sin embargo, es interesante observar que, al analizar mayor cantidad de individuos de la localidad de Benemérito de las Américas, localidad en la que anteriormente se encontró mayor distancia genética entre los individuos obtenidos con CH y TA; (Arredondo-Jiménez *et al.*, 1996), el análisis UPGMA discrimina en su totalidad ambas poblaciones por preferencia alimenticia, y la distancia genética de Nei & Li (1978) es aún mayor ($D=0.2465$) que la obtenida con isoenzimas (Arredondo-Jiménez *et al.*, 1996). Los 37 marcadores seleccionados para esta

localidad mostraron tendencia de “exclusividad”, es decir, cada marcador se presentó en una mayor proporción de mosquitos con una u otra preferencia alimenticia, aunque no se identificó algún marcador “exclusivo” de cada grupo de mosquitos. Esto indica que no existe una diferenciación genética completa, por lo que es posible que, si existe en realidad un complejo de especies dentro de *An. vestitipennis*, dicho fenómeno es aún incipiente.

Dicha hipótesis ha sido apoyada por otras líneas de evidencia recientes, incluyendo el análisis morfométrico de la ultraestructura de los huevos de *An. vestitipennis* (Rodríguez *et al*, 1999) en poblaciones antropofílicas y zoofílicas de sitios diferentes. Estudios aún más recientes, demostraron diferencias morfológicas de hembras de mosquitos, como tamaño basado en longitud alar y manchas de las alas (Orozco *et al*, 2001). Además, en un experimento de campo en donde se colectaron mosquitos en contacto con humanos o animales, éstos fueron liberados en el compartimiento central de una casa experimental revestida con malla de mosquitero tres compartimientos, mientras que los dos compartimientos laterales contenían un cebo animal y el otro un cebo humano, habiéndose encontrado una “fidelidad”, es decir, regreso de los mosquitos al mismo hospedero en donde fueron colectados de un 30-50%. Estos mosquitos fueron regresados al insectario del Centro de Investigación de Paludismo y criados hasta producir la generación F1, la cual fue regresada al campo y liberada en el interior de la casa experimental, encontrándose una mayor fidelidad (56-80%) en los mosquitos, lo que se interpretó como evidencia adicional de la existencia de poblaciones con preferencias innatas por hospederos humano o animal (Ulloa *et al*, 2001).

Distintos autores han reportado la capacidad de la técnica de RAPD-PCR para discriminar entre especies cercanas e incluso entre distintos biotipos de la misma especie. Puterka y cols, (1993) utilizaron análisis isoenzimático y marcadores RAPD para examinar parentescos genéticos entre poblaciones de *Diuraphis noxia*. De 20 loci enzimáticos, sólo 5 fueron polimórficos, y el análisis de agrupamiento sólo pudo separar las 35 poblaciones en 5 grupos. Por el contrario, el análisis de agrupamiento con los marcadores de DNA colocó a las

mismas poblaciones en los mismos 5 grupos, pero además separó subpoblaciones dentro de cada grupo. Otros autores han reportado igualmente la capacidad de la técnica RAPD para discriminar entre grupos (Ballinger-Crabtree y cols., 1992, Chapco y cols., 1992; Kambhampati y cols., 1993)Roehrdanz y cols., 1993; Roehrdanz y Flanders, 1993; Perring y cols., 1993) de distintas especies de artrópodos, a nivel interpoblacional e intrapoblacional. Por lo mismo, los resultados obtenidos en este estudio, aunque no concluyentes, proveen evidencia de la existencia de subpoblaciones de *An. vestitipennis* caracterizadas por diferentes preferencias alimenticias.

El rango efectivo de migración (Nm) entre poblaciones obtenido varió de acuerdo al método de medición entre 0.3-0.6, indicando un individuo migrante cada 2-3 generaciones. Wright (1931), sugirió que se necesita al menos un inmigrante cada generación para prevenir diferenciación genética debida a la deriva, por fijación y pérdida total de alelos. Por tanto, la baja tasa de migración efectiva sugiere que las poblaciones estudiadas presentan restricción de flujo génico; el suficiente como para favorecer cierto grado de diferenciación genética.

El rango de migración (Nm) y el grado de aislamiento F_{ST} de las 4 poblaciones son muy parecidos a los valores de migración y aislamiento de la sola población de Benemérito de las Américas. Esto podría indicarnos que las poblaciones de *An. vestitipennis* se encuentran bastante aisladas de modo general, pero ese aislamiento se acentúa notablemente en el caso específico de Benemérito de las Américas. Las diferencias en las frecuencias alélicas que se encuentren (si las hay) podrían deberse a la deriva génica y no a individuos migrantes. Es decir, también puede estar actuando la deriva génica en la diferenciación de subpoblaciones, pues los resultados muestran que prácticamente no hay migración; pero la deriva puede actuar entonces mayormente, pues no hay flujo génico que llegue a contribuir con genes nuevos a las frecuencias alélicas. Al tener en cuenta que la falta de migración contribuye enormemente a la eventual diferenciación genética de subpoblaciones, (Ayala, 1984) podemos suponer que, de continuar este bajo rango de migración las poblaciones de BENEMÉRITO con diferentes

frecuencias alélicas. Al tener en cuenta que la falta de migración contribuye enormemente a la eventual diferenciación genética de subpoblaciones, (Ayala, 1984) podemos suponer que, de continuar este bajo rango de migración las poblaciones de BENEMÉRITO con diferentes preferencias alimenticias llegarán a presentar divergencia genética total. Sin embargo, no existe por lo pronto una base sólida para hacer este tipo de afirmación.

El proceso de especiación es en todo caso incipiente y debido a las características que presenta se podría considerar un caso especial de *especiación simpátrica* por medios no cromosómicos por cambio de hospedero, conocida como especiación parapátrica (Bush 1975).

La llegada del hombre al continente americano hace unos 12,000 años y el descubrimiento de la agricultura y posterior vida sedentaria de los humanos prehistóricos, constituyeron un nuevo hospedero sanguíneo ideal para complementar el estilo de vida hematófago. El significado evolutivo de la selección de un hospedero nuevo y disponible se reflejaría en una mayor aptitud reproductiva (mayor producción de descendientes y subsecuente cambio en la frecuencia de alelos) en aquellos mosquitos que se alimentaran preferentemente de dicho hospedero, y probablemente un aislamiento reproductivo simpátrico respecto a otros miembros de la especie que no estuvieran en contacto con el nuevo hospedero.

CONCLUSIONES.

- 1.-*Anopheles vestitipennis* es un mosquito implicado en la transmisión de paludismo en la región de la Selva Lacandona.**
- 2.-Presenta diferencias en hábitos de picadura según la hora, aparentemente relacionados con la preferencia alimenticia.**
- 3.- El análisis interpoblacional realizado con marcadores polimórficos de DNA no muestra diferencias concluyentes entre individuos antropofílicos y zoofílicos.**
- 4.- El análisis intrapoblacional en la localidad que anteriormente reportó diferencias entre preferencias alimenticias mostró nuevamente separación entre estas dos subpoblaciones.**
- 5.- Las diferencias observadas en el análisis morfométrico de huevecillos de *An. vestitipennis* presentan diferencias significativas entre poblaciones antropofílicas y zoofílicas.**
- 6.- Análisis de características morfológicas entre individuos de *An. vestitipennis* antropofílicos y zoofílicos mostraron a su vez diferencias entre estas dos subpoblaciones.**
- 7.- Es necesario esclarecer los resultados obtenidos con marcadores de DNA utilizando mayor número de individuos por localidad estudiada y por tipo de captura.**



Figura 2. Ubicación de las localidades de los estados de Chiapas y Tabasco, en donde fueron colectados los mosquitos *Anopheles vestitipennis*.

RATIONALE

CONFIRMED MALARIA VECTORS

- *Anopheles pseudopunctipennis*
Primary vector in mountain ranges between 200–1500 m. Mainly *P. vivax* VK247.
- *Anopheles albimanus*
Primary vector in lowlands specially along the coasts. In agriculturally developed areas. Mainly *P. vivax* VK210.
- *Anopheles vestitipennis*
Secondary vector in lowlands. At forest edges. Only found with *P. vivax* VK247.

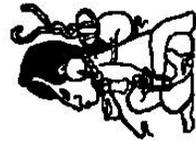
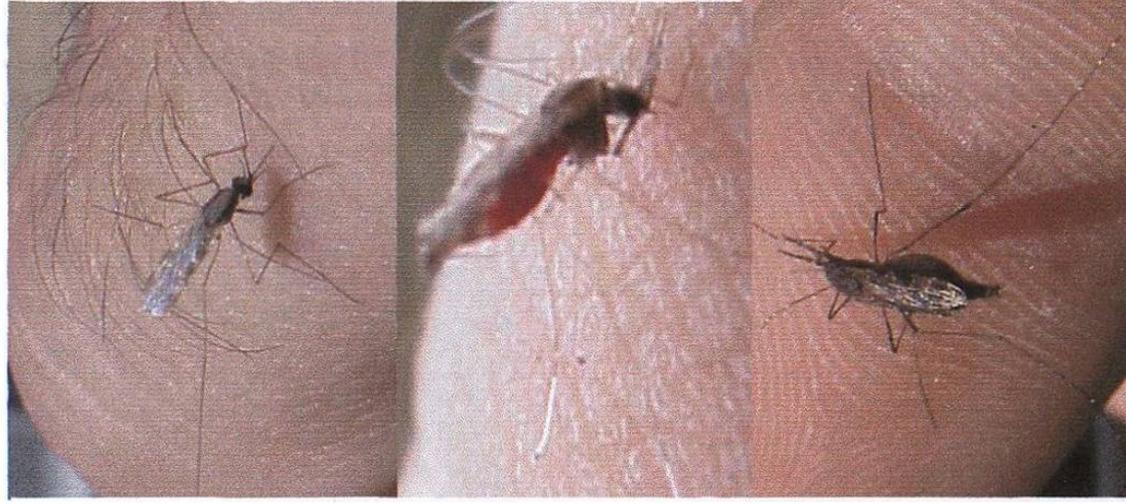


Tabla 1. Esfuerzo muestral (número de horas hombre consumidas) , número de mosquitos *Anopheles vestitipennis* colectados en diferentes sitios e índice de densidad de mosquitos (número promedio de mosquitos por hombre hora).

LOCALIDAD	SITIO DE COLECTA											
	CHI			CHP			TA			CO		
	H	N	M/H	H	N	M/H	H	N	M/H	H	N	M/H
Benemérito de las Américas	31	172	5.5±0.1	17	110	6.5±0.3	40	139	3.5±0.1			
San Pedro Balancán	22	197	9.0±0.4	21	366	17±0.8	34	114	3.4±0.1	6	17	2.8±0.5
López Mateos	20	137	6.9±0.4	18	96	5.3±0.2	12	83	6.9±0.9			
Cosalapa	64	42	0.7±0	54	65	1.2±0	167	157	0.9±0	148	293	2.0±0
Herradero	125	282	2.3±0	113	239	2.1±0	186	356	1.9±0	170	515	3.0±0
Lázaro Cárdenas	78	130	1.7±0	54	98	1.8±0	109	1190	11±0.2	48	490	10±0.2
Río Arriba	90	244	2.7±0.1	71	153	2.2±0	108	145	1.3±0	72	279	3.9±0.1
Altamira	76	474	6.2±0.1	64	386	6.0±0.1	61	257	4.2±0.1	135	1689	13±0.1
El Fortín	66	44	0.7±0	54	39	0.7±0	120	178	1.5±0	101	57	0.6±0
Totales	572	1722	3.01±0.1	466	1552	3.33±0.1	837	2619	3.12±0.2	680	3340	4.91±0.1

Clave: CHI = cebo humano intradomiciliar, CHP = cebo humano peridomiciliar, TA = trampa animal, CO = corrales; H = hombres hora (esfuerzo muestral), N = número de mosquitos colectados, M/H = mosquitos colectados por hombre hora.

Tabla 2. Proporción (%) de mosquitos *Anopheles vestitipennis* que se alimentaron antes de la medianoche, de acuerdo a la localidad y sitio de colecta.

LOCALIDAD	SITIO DE COLECTA			
	CHI	CHP	TA	CO
Benemérito de las Américas	44.8	77.4	82.2	-
López Mateos	20.0	48.3	94.4	-
San Pedro Balancán	66.0	82.7	53.2	-
Cosalapa	38.6	53.2	42.9	67.8
Herradero	61.8	74.3	62.4	57.8
Lázaro Cárdenas	42.7	45.8	57.0	55.7
Río Arriba	52.4	53.7	66.4	67.4
Altamira	37.7	34.6	65.6	48.3
El Fortín	76.2	53.5	74.2	56.4

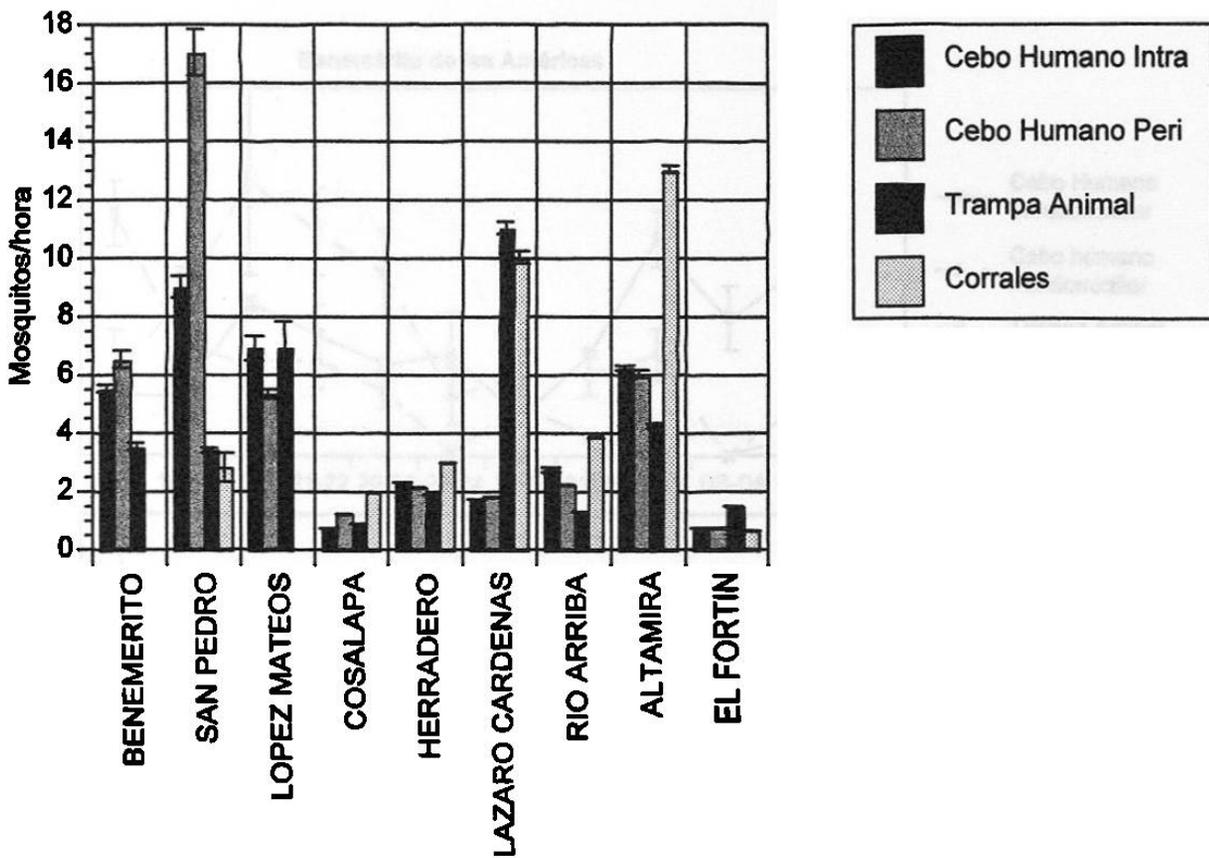


Figura 4. Número promedio de *Anopheles vestitipennis* colectados por localidad, de acuerdo a los sitios de captura.

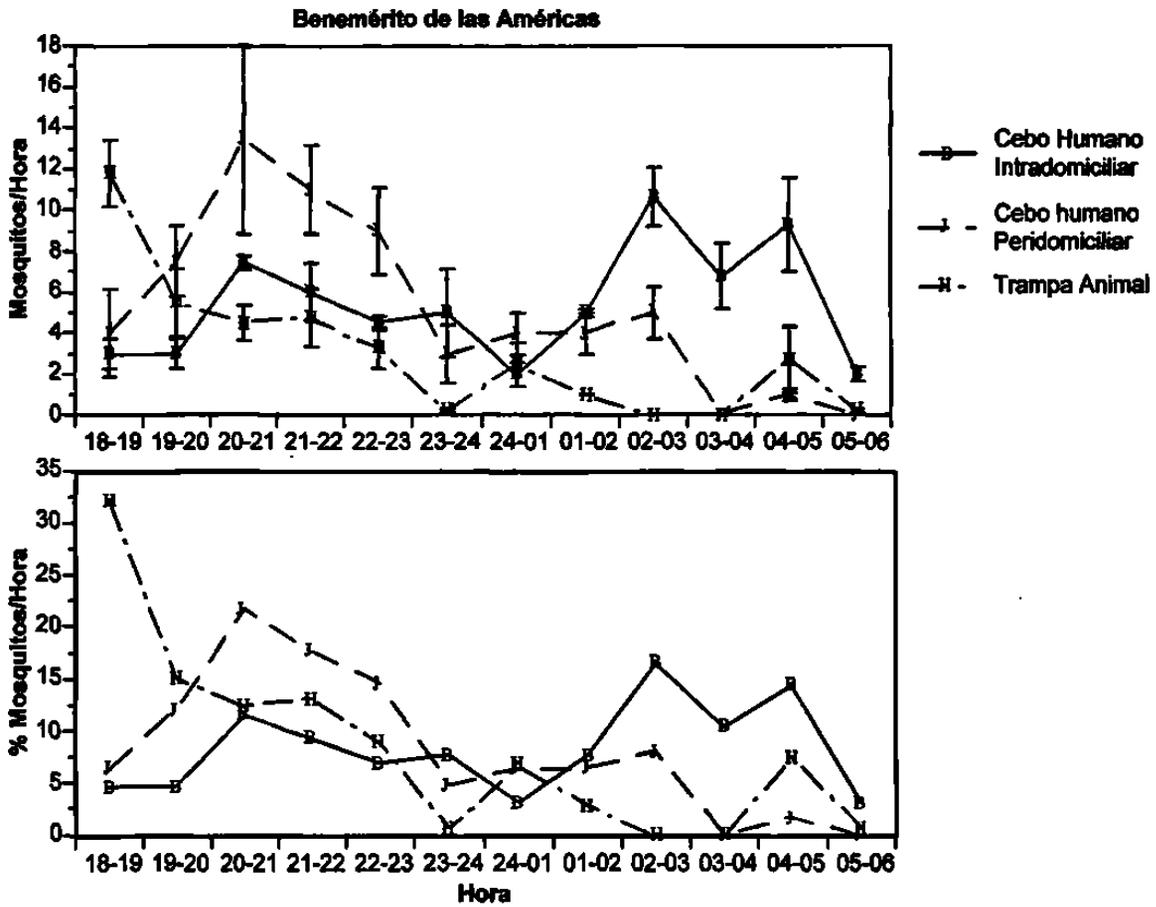


Figura 5. Ciclo de picadura ($\pm EE$) de *Anopheles vestitipennis* en Benemérito de las Américas, Mpio. de Ocosingo, Chiapas, por lugar de colecta, en función del número promedio de mosquitos por hora y de la proporción (%) de mosquitos por hora.

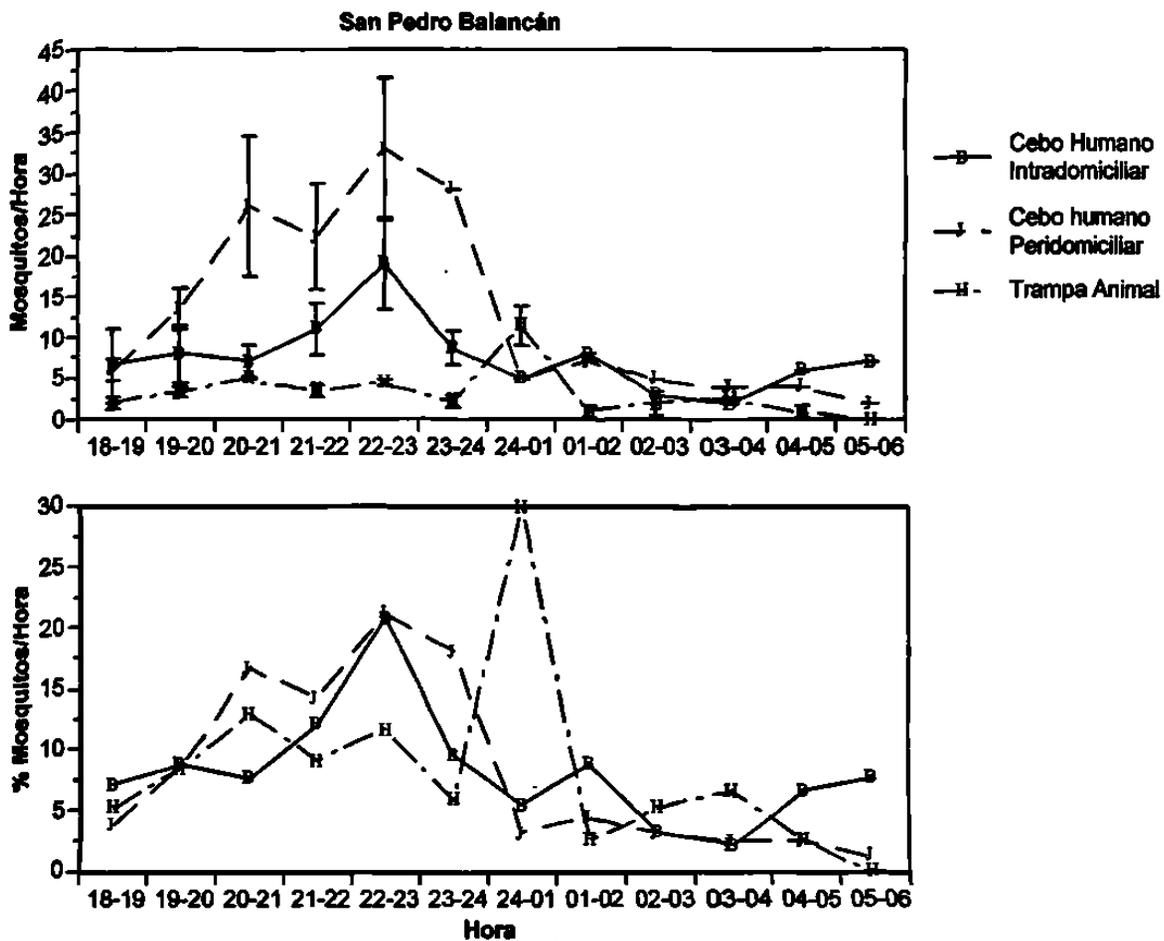


Figura 6. Ciclo de picadura ($\pm EE$) de *Anopheles vestitipennis* en San Pedro, Mpio. de Balancán, Tabasco, por lugar de colecta, en función del número promedio de mosquitos por hora y de la proporción (%) de mosquitos por hora.

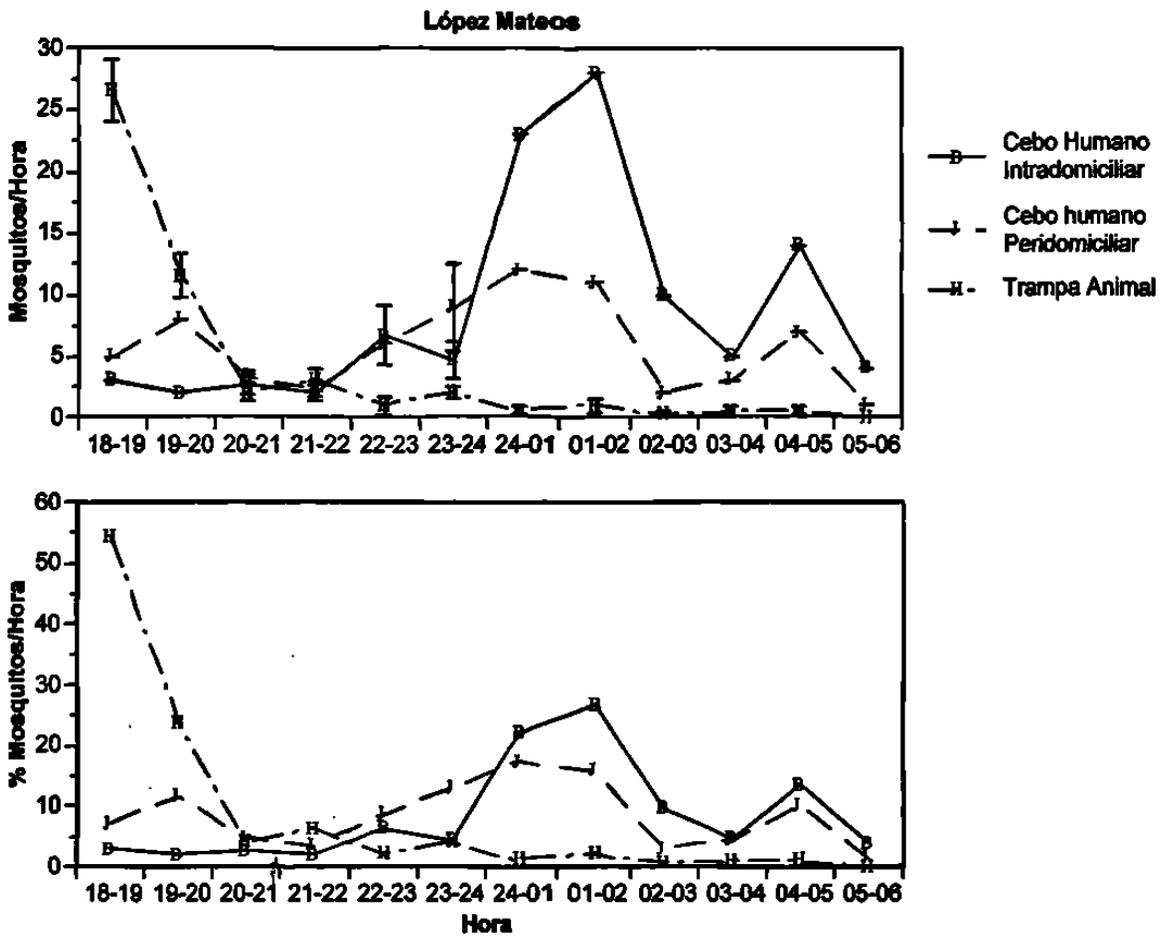


Figura 7. Ciclo de picadura (\pm EE) de *Anopheles vestitipennis* en López Mateos, Mpio. de Ocosingo, Chiapas, por lugar de colecta, en función del número promedio de mosquitos por hora y de la proporción (%) de mosquitos por hora.

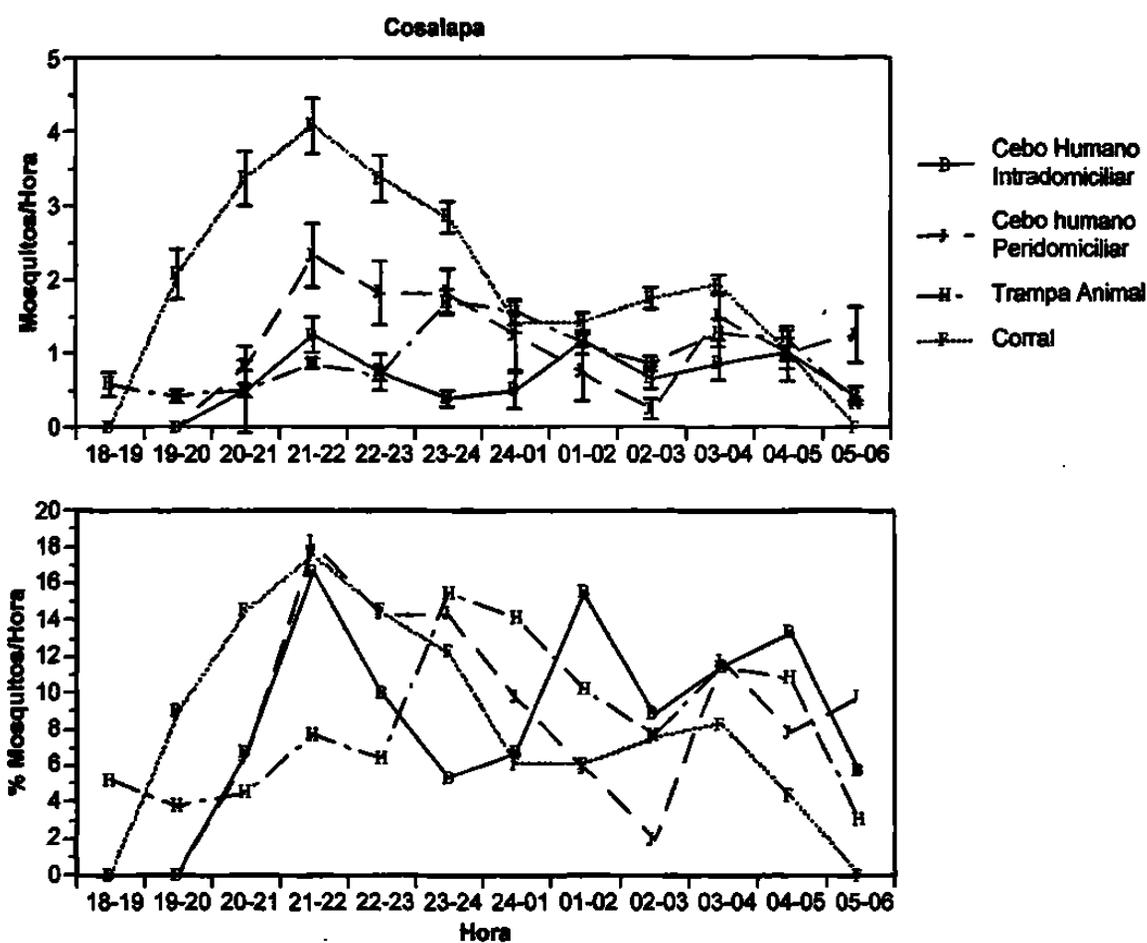


Figura 8. Ciclo de picadura (\pm EE) de *Anopheles vestitipennis* en Cosalapa, Mpio. de Suchiate, Chiapas, por lugar de colecta, en función del número promedio de mosquitos por hora y de la proporción (%) de mosquitos por hora.

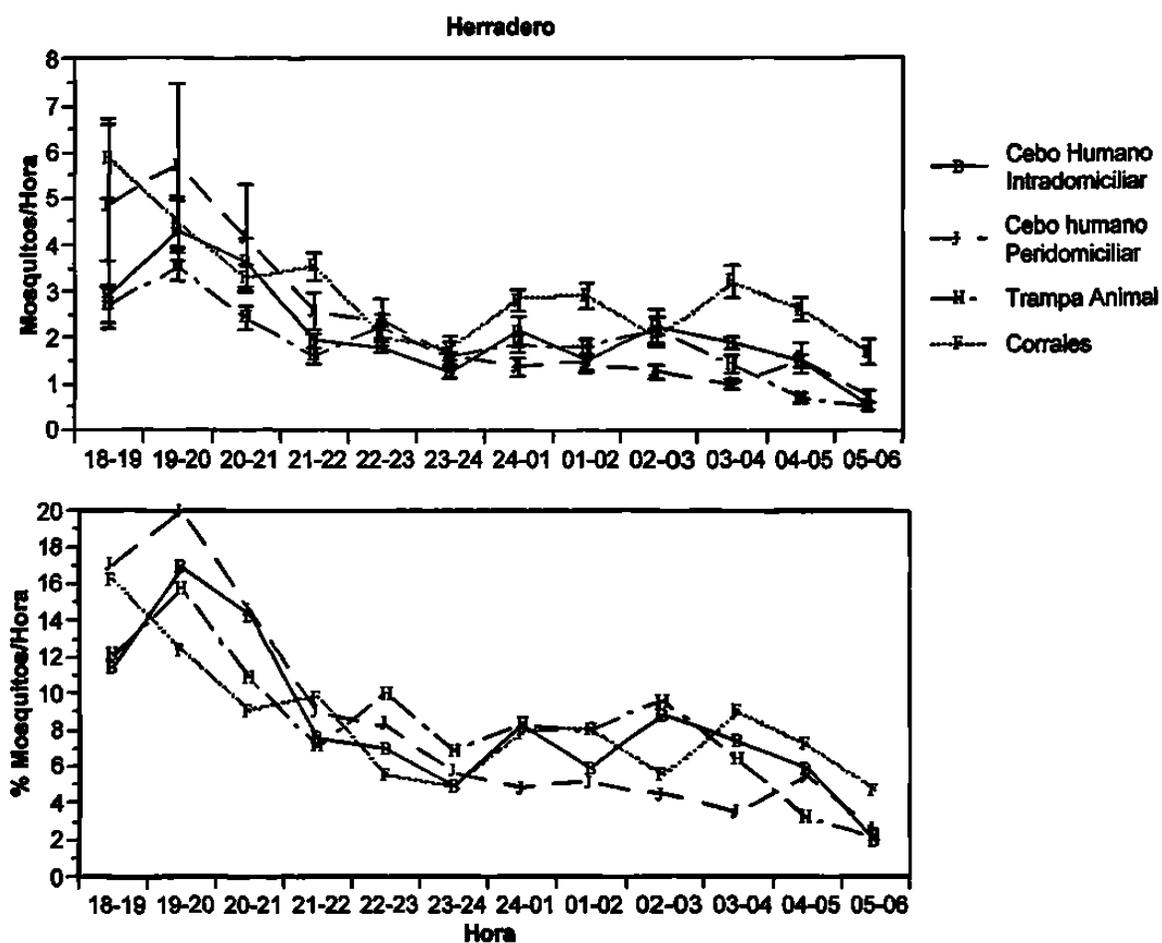


Figura 9. Ciclo de picadura (\pm EE) de *Anopheles vestitipennis* en Herradero, Mpio. de Suchiate, Chiapas, por lugar de colecta, en función del número promedio de mosquitos por hora y de la proporción (%) de mosquitos por hora.

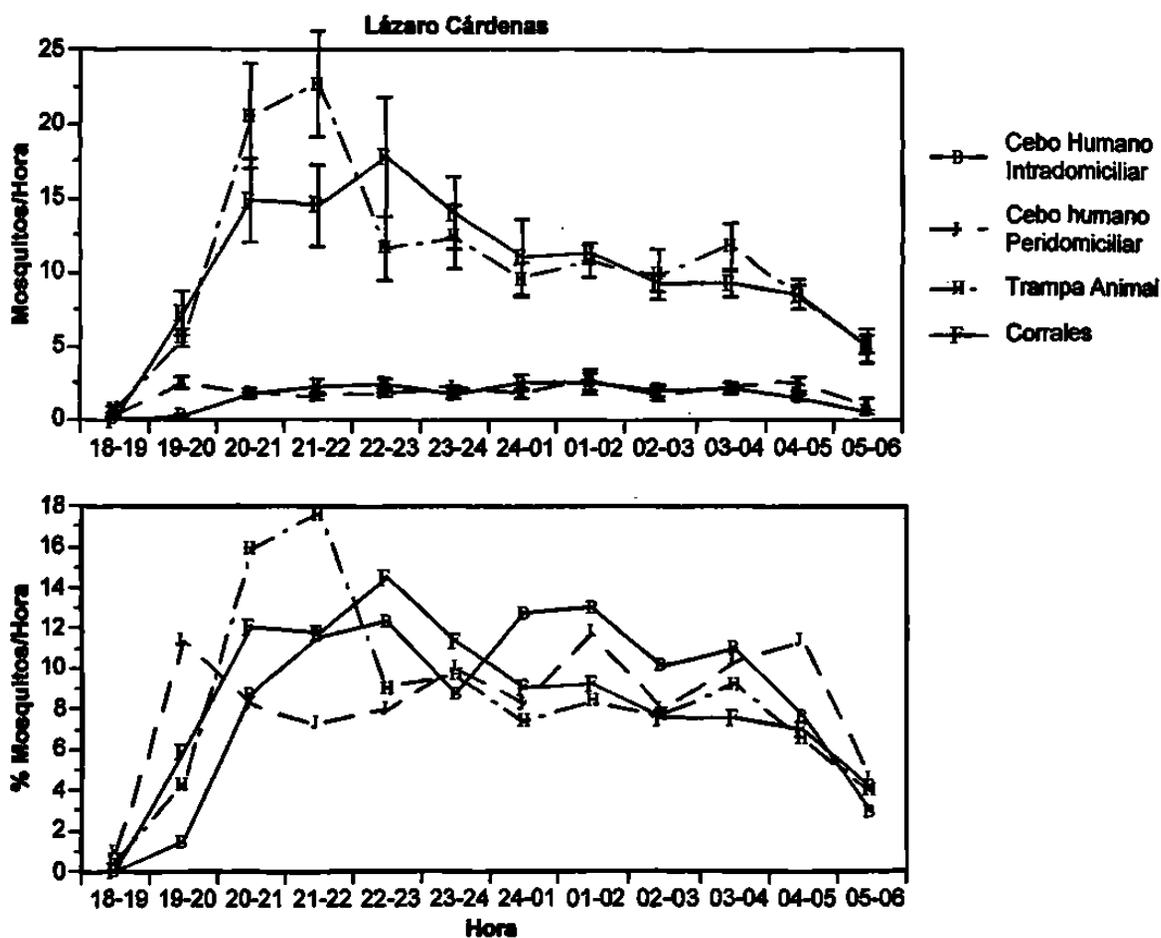


Figura 10. Ciclo de picadura ($\pm EE$) de *Anopheles vestitipennis* en Lázaro Cárdenas, Mpio. de Huixtla, Chiapas, por lugar de colecta, en función del número promedio de mosquitos por hora y de la proporción (%) de mosquitos por hora.

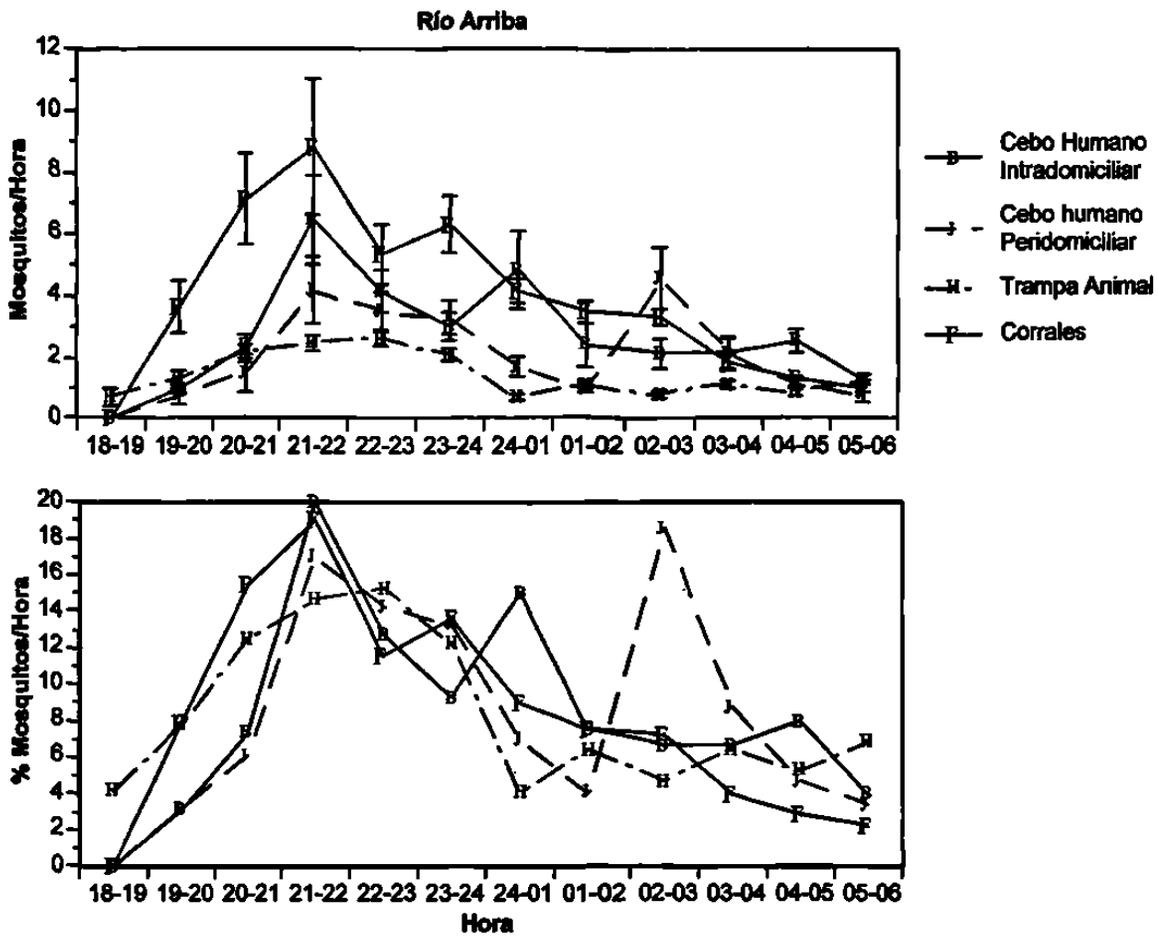


Figura 11. Ciclo de picadura (\pm EE) de *Anopheles vestitipennis* en Río Arriba, Mpio. De Acacoyagua, Chiapas, por lugar de colecta, en función del número promedio de mosquitos por hora y de la proporción (%) de mosquitos por hora.

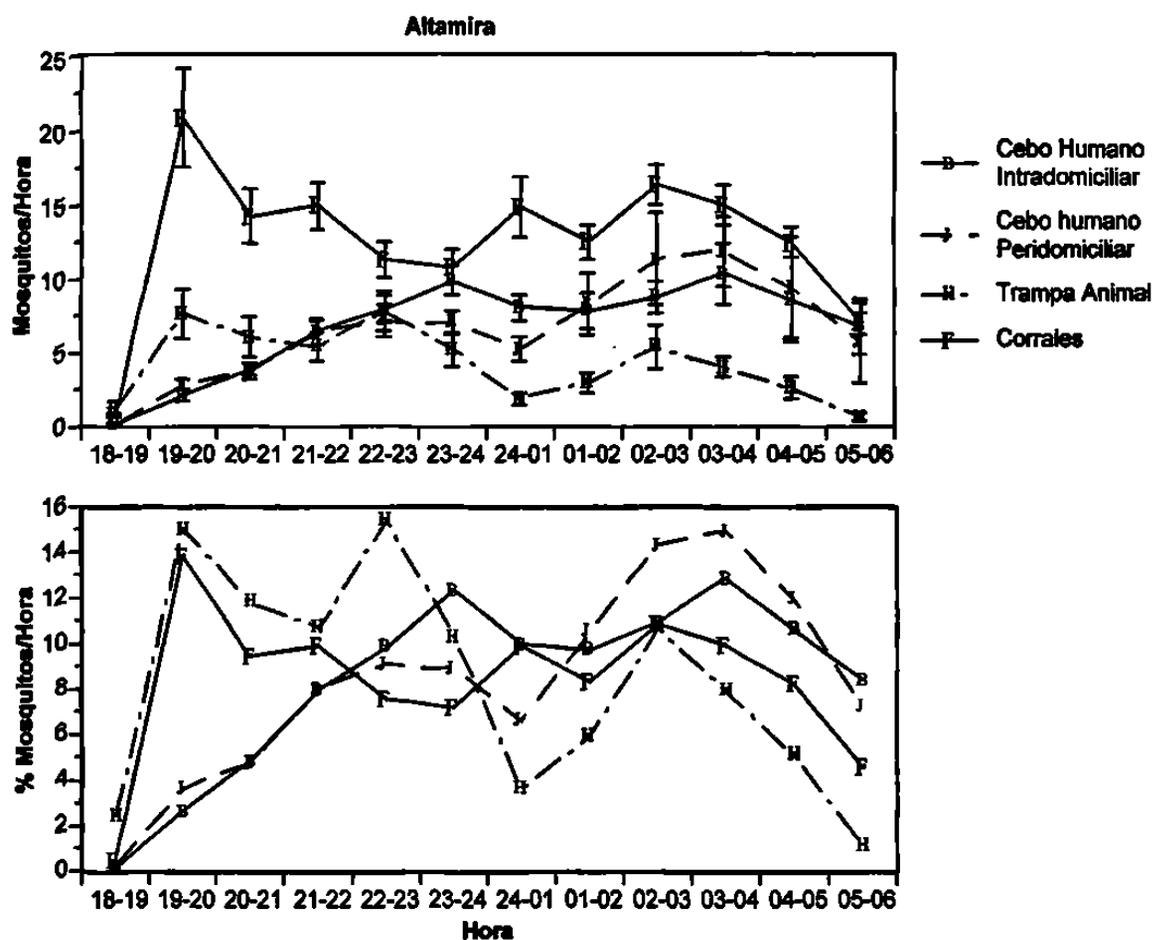


Figura 12. Ciclo de picadura ($\pm EE$) de *Anopheles vestitipennis* en Altamira, Mpio. De Acacoyagua, Chiapas, por lugar de colecta, en función del número promedio de mosquitos por hora y de la proporción (%) de mosquitos por hora.

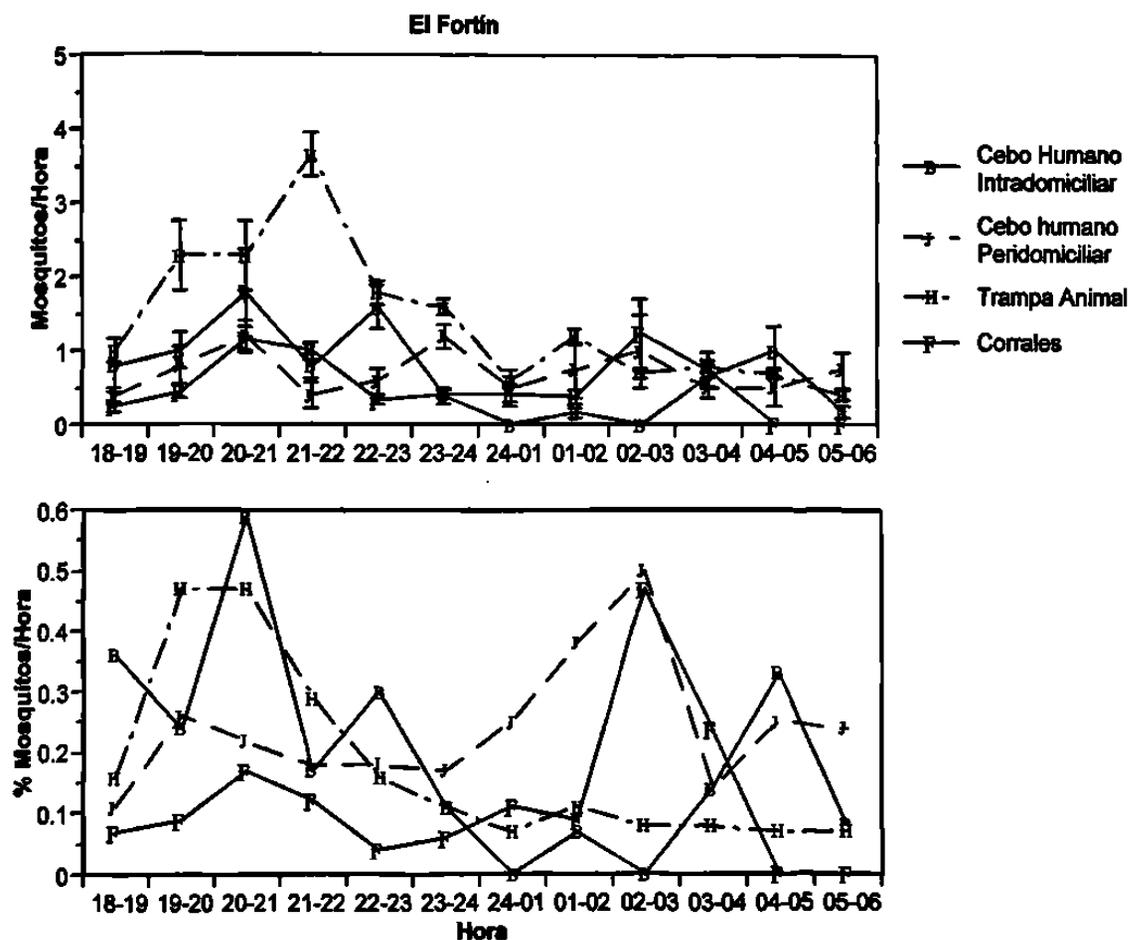


Figura 13. Ciclo de picadura ($\pm EE$) de *Anopheles vestitipennis* en El Fortín, Mpio. De Pijijiapan, Chiapas, por lugar de colecta, en función del número promedio de mosquitos por hora y de la proporción (%) de mosquitos por hora.

TABLA 3. BASE DE DATOS OBTENIDA CON 60 MARCADORES EN 40 INDIVIDUOS DE COSTA Y SELVA, CEBO HUMANO Y CEBO ANIMAL.

NUMBER OF INDIVIDUALS:40

TITLE:Tenchis DATASET

NUMBER OF FRAGMENTS:60

(5 (11 (1X,A5) /), 5 (1X,A5))

OB5-1 OB5-2 OB5-3 OB5-4 OB5-5 OB5-6 OB5-7 OA9-1 OA9-2 OA9-3 OA9-4
 OA9-5 OA9-6 OA9-7 A17-1 A17-2 A17-3 A17-4 A17-5 A17-6 A17-7 OA8-1
 OA8-2 OA8-3 OA8-4 OA8-5 A14-1 A14-2 A14-3 A14-4 A14-5 OB4-1 OB4-2
 OB4-3 OB4-4 OB4-5 OB4-6 OB4-7 OB4-8 C13-1 C13-2 C13-3 C13-4 C13-5
 C13-6 C13-7 C13-8 OD1-1 OD1-2 OD1-3 C10-1 C10-2 C10-3 C10-4 C10-5
 C10-6 OC1-1 OC1-2 OC1-3 OC1-4

(A5, 3X, 60A1)

BENCH/1 10001000010000000001110000010000100000010100000000001011010
 BENCH/2 100111001111001010011000011110111100111101001101100001110011
 BENCH/3 011000101010001110110010001111110000000101001001101101010111
 BENCH/4 101011011011001101000000011110011100100100101001101110110111
 BENCH/5 101100100011000101011011101011011011110001010101110000010110
 BENTA/1 10101000111100001101100000111111000101101011101001111110011
 BENTA/2 011000011011000010011000000110111100000101011100001110001001
 BENTA/3 000101101010001011111000000111000000000101001001001100110000
 BENTA/4 111110000101001110011000000001101101111001110100110000000000
 BENTA/5 011110010101001111011110000111000101100110000101101100010011
 SNPCH/1 010010000101000101110010111100011101101101000000010000010000
 SNPCH/2 10001101110100000101010010000101111101101000000000000000110
 SNPCH/3 000011001101000101110101100101001001101101000010000000000100
 SNPCH/4 000001001111110101011100100101001001101100100010010000000000
 SNPCH/5 100011011100110010000100000100001001100100110000000000000000
 SNPTA/1 00001100010111011110110110100011101101101000100110000011100
 SNPTA/2 000011011010110001110000110101010111001101010000110000011110
 SNPTA/3 000010000110110000110100110000011101101101010100100000010010
 SNPTA/4 000000000100110001111000100000010101100100100100000000010100
 SNPTA/5 100000000100110001110000000000010101101001000000110000010110
 COSCH/1 011101000001100001001101100100000000100000001100010000100010
 COSCH/2 001011000000000000101110000000000000000000000000000000000000
 COSCH/3 010101011100010011001011100100000001000000001100100000110010
 COSCH/4 111111000010010001101001101011101001010000011000110000111010
 COSCH/5 00110001101000001111101101011100100011000011000100000110010
 COSTA/1 100100000001000001111101001010000011010000011100010000110000
 COSTA/2 010111010011100001101101000000000100000000001100010000110000
 COSTA/3 0101000000000000010001101100000000000001000001100000000100000
 COSTA/4 0111110000011000011010000000000000010001000001000010000110100
 COSTA/5 00111100000100001100100000100100000000000000001100000000110100
 RIOCH/1 10011011001100000111100000010000000010000000000010000000000
 RIOCH/2 110100111010010011111100000000010000100000000000110000100000
 RIOCH/3 0111110011111010100100000110000000010000000000000000000000100010
 RIOCH/4 000000000000000000110100000110010000001000000000110000000000
 RIOCH/5 100111110011100011111101101100100000100100111110110011000000
 RIOTA/1 100001010000110001111101000101010100000000011110000010000010
 RIOTA/2 011111001111100111111100110101010000000000011100010011000010
 RIOTA/3 1000000100000000011000000001000000000000000011110100000010000
 RIOTA/4 100001010000110111001101000100000000000000011110000000000000
 RIOTA/5 100000010000000001001100000100001001000000011010000000000000

NOTA: BENCH Y BENTA=BENEMERITO, CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL. SNPCH Y SNPTA=SAN PEDRO CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL; COSCH Y COSTA=COSALAPA, CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL; RIOCH Y RIOTA=RIO ARRIBA, CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL.

TABLA 4. VALORES DE F_{ST} Y RANGO EFECTIVO DE MIGRACION (N_m) POR EL METODO DE WRIGHT, COCKERMAN (θ) Y LYNCH & MILLIGAN.

:Tenchis DATASET

LOCUS	FST	Nm	Prob.	Theta	Nm(Theta)	FST (Lynch)	Nm (Lynch)
OB5-1	.157	1.3	.0829	.084	2.7	.034	7.2
OB5-2	.116	1.9	.2340	.034	7.2	-.020	-12.6
OB5-3	.250	.7	.0056	.195	1.0	.239	.8
OB5-4	.453	.3	.0000	.429	.3	.539	.2
OB5-5	.065	3.6	.6332	-.029	-8.9	-.501	-.7
OB5-6	.105	2.1	.2981	.020	12.0	-.102	-2.7
OB5-7	.213	.9	.0169	.152	1.4	.186	1.1
OA9-1	.116	1.9	.2328	.034	7.1	-.115	-2.4
OA9-2	.152	1.4	.0949	.078	3.0	.057	4.1
OA9-3	.450	.3	.0000	.426	.3	.559	.2
OA9-4	.157	1.3	.0829	.084	2.7	.040	6.0
OA9-5	.169	1.2	.0610	.098	2.3	.037	6.6
OA9-6	.459	.3	.0000	.436	.3	.594	.2
OA9-7	.518	.2	.0000	.502	.2	.648	.1
A17-1	.304	.6	.0010	.258	.7	.295	.6
A17-2	.130	1.7	.1662	.051	4.6	.054	4.4
A17-3	.358	.4	.0002	.322	.5	.517	.2
A17-4	.363	.4	.0001	.328	.5	.441	.3
A17-5	.329	.5	.0004	.287	.6	.452	.3
A17-6	.415	.4	.0000	.386	.4	.515	.2
A17-7	.637	.1	.0000	.630	.1	.726	.1
OA8-1	.129	1.7	.1699	.050	4.7	-.046	-5.7
OA8-2	.072	3.2	.5666	-.020	-12.5	-.155	-1.9
OA8-3	.216	.9	.0159	.154	1.4	.213	.9
OA8-4	.273	.7	.0027	.222	.9	.264	.7
OA8-5	.176	1.2	.0496	.107	2.1	.151	1.4
A14-1	.198	1.0	.0264	.134	1.6	.140	1.5
A14-2	.326	.5	.0005	.285	.6	.323	.5
A14-3	.352	.5	.0002	.315	.5	.358	.4
A14-4	.148	1.4	.1063	.073	3.2	.074	3.1
A14-5	.167	1.2	.0643	.096	2.4	.101	2.2
OB4-1	.477	.3	.0000	.455	.3	.591	.2
OB4-2	.493	.3	.0000	.474	.3	.596	.2
OB4-3	.447	.3	.0000	.423	.3	.582	.2
OB4-4	.094	2.4	.3768	.007	37.2	-.057	-4.6
OB4-5	.651	.1	.0000	.645	.1	.748	.1
OB4-6	.434	.3	.0000	.408	.4	.503	.2
OB4-7	.089	2.6	.4206	.000	*****	-.100	-2.8
OB4-8	.250	.7	.0055	.196	1.0	.220	.9
C13-1	.538	.2	.0000	.523	.2	.594	.2
C13-2	.094	2.4	.3798	.006	40.1	-.018	-14.2
C13-3	.356	.5	.0002	.319	.5	.348	.5
C13-4	.072	3.2	.5666	-.020	-12.5	-.155	-1.9
C13-5	.405	.4	.0000	.375	.4	.511	.2
C13-6	.720	.1	.0000	.718	.1	.775	.1

C13-7		.179	1.1	.0462		.110	2.0		.097	2.3
C13-8		.343	.5	.0003		.304	.6		.264	.7
OD1-1		.411	.4	.0000		.382	.4		.413	.4
OD1-2		.252	.7	.0052		.198	1.0		.226	.9
OD1-3		.120	1.8	.2142		.038	6.3		-.055	-4.8
C10-1		.400	.4	.0000		.369	.4		.400	.4
C10-2		.400	.4	.0000		.369	.4		.400	.4
C10-3		.114	1.9	.2450		.031	7.8		.012	21.2
C10-4		.176	1.2	.0501		.107	2.1		.155	1.4
C10-5		.521	.2	.0000		.504	.2		.614	.2
C10-6		.542	.2	.0000		.528	.2		.631	.1
OC1-1		.094	2.4	.3768		.007	37.2		-.057	-4.6
OC1-2		.270	.7	.0029		.220	.9		.258	.7
OC1-3		.418	.3	.0000		.390	.4		.537	.2
OC1-4		.304	.6	.0010		.258	.7		.295	.6

-										
Avg.		.294	.6	.0000		.281 (.281)	.6		.298	.6
St.Dv.		.167				.194 (.028)			.280	
						(Jackknife)				

-										

TABLA 5. MATRIZ DE DISTANCIAS GENÉTICAS DE NEI & LI (1978) OBTENIDAS CON 60 MARCADORES RAPD EN 8 POBLACIONES ANTROPOFÍLICAS Y ZOOFÍLICAS DE *An. vestitipennis* DE LOS ESTADOS DE CHIAPAS Y TABASCO.

	1	2	3	4	5	6	7	8
BENCH	0000							
BENTA	.1029	0000						
SNPCH	.1907	.1943	0000					
SNPTA	.2119	.2663	.1581	0000				
COSCH	.1557	.1491	.2270	.2611	0000			
COSTA	.1944	.1648	.2608	.2921	.0506	0000		
RIOCH	.1559	.1356	.1738	.2303	.0756	.0921	0000	
RIOTA	.1987	.1758	.2104	.2575	.0904	.1279	.0953	0000

NOTA: BENECH=Benemérito de las Américas, cebo humano; BENETA= Benemérito de las Américas, Trampa Animal; SNPCH= San Pedro Balancán, cebo humano; SNPTA= San Pedro Balancán, trampa animal; COSCH= Cosalapa, cebo humano; COSTA= Cosalapa, trampa animal; RIOCH= RioArriba, cebo humano; RIOTA=Rio Arriba trampa Animal.

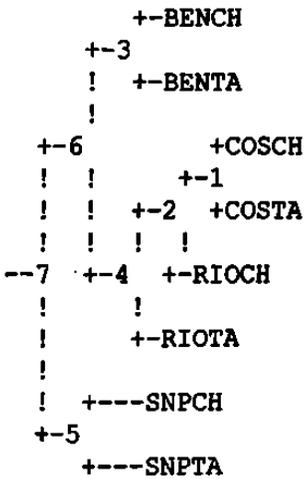
FIGURA 5. DENDOGRAMA DE 8 SUBPOBLACIONES ANTROPOFILICAS Y ZOOFILICAS DE *An. vestitipennis* DE LOS ESTADOS DE CHIAPAS Y TABASCO. METODO: UPGMA.

8 Populations

Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.572c

UPGMA method

Negative branch lengths allowed



Between	And	Length
7	6	0.03255
6	3	0.03168
3	BENCH	0.05145
3	BENTA	0.05145
6	4	0.03086
4	2	0.01034
2	1	0.01663
1	COSCH	0.02530
1	COSTA	0.02530
2	RIOCH	0.04192
4	RIOTA	0.05227
7	5	0.03663
5	SNPCH	0.07905
5	SNPTA	0.07905

NOTA: BENCH Y BENTA = Benemérito de las Américas, Cebo humano y Trampa Animal. SNPCH y SNPTA = San Pedro, Cebo humano y Trampa Animal. COSCH Y COSTA = Cosalapa, Cebo humano y Trampa Animal. RIOCH y RIOTA = Río Arriba, Cebo humano y Trampa Animal.

FIGURA 6. ANÁLISIS POR "BOOTSTRAP" DE LA CONSISTENCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LAS 8 SUBPOBLACIONES DE *Anopheles vestitipennis* DE CHIAPAS Y TABASCO. 60 MARCADORES RAPD.

CONSENSUS TREE:

the numbers at the forks indicate the number of times the group consisting of the species which are to the right of that fork occurred among the trees, out of 100.00 trees

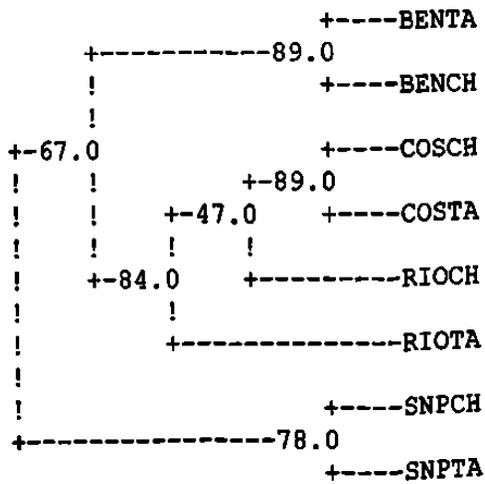


TABLA 6. BASE DE DATOS OBTENIDA CON 20 MARCADORES POLIMÓRFICOS EN 8 SUBPOBLACIONES DE *Anopheles vestitipennis* DE CHIAPAS Y TABASCO.

NUMBER OF INDIVIDUALS: 40
 TITLE: vestitipennis dataset
 NUMBER OF FRAGMENTS: 20
 (3(6(1X,A5)/),2(1X,A5))
 OB5-6 OB5-7 OA9-2 OA9-4 OA9-6 A17-3
 A17-5 OA8-4 A14-1 A14-2 A14-5 OB4-3
 OB4-6 OB4-7 C13-5 C13-6 C13-7 OD1-2
 C10-6 OC1-1
 (A5,3X,20A1)
 BENCH/1 00000000010000000011
 BENCH/2 10110100111111011110
 BENCH/3 01110110111000010110
 BENCH/4 10110000110110010110
 BENCH/5 01010001100011101110
 BENTA/1 00110100111010111010
 BENTA/2 00110100011100111001
 BENTA/3 11110110010000010010
 BENTA/4 00000100001111101100
 BENTA/5 00000100010110001110
 SNPCH/1 00000011110110000010
 SNPCH/2 10100001000110000000
 SNPCH/3 10100011010010000000
 SNPCH/4 10111001010010000000
 SNPCH/5 10101100010010100000
 SNPTA/1 10001111010110001111
 SNPTA/2 10111011010100100111
 SNPTA/3 00011011000110101110
 SNPTA/4 00001011000110001010
 SNPTA/5 00001010000110000110
 COSCH/1 10001001010010011000
 COSCH/2 10000000000000011100
 COSCH/3 10100101010000011110
 COSCH/4 10010011101001110111
 COSCH/5 00110111101101110110
 COSTA/1 00000010100001111010
 COSTA/2 10011010000100011010
 COSTA/3 00000101000000011000
 COSTA/4 10001010000000010010
 COSTA/5 10000100100000011010
 RIOCH/1 01010010010010000000
 RIOCH/2 01110110000010000100
 RIOCH/3 10111000110010000000
 RIOCH/4 00000010111001000100
 RIOCH/5 11011111111010111100
 RIOTA/1 10001010010100111000
 RIOTA/2 10111111010000111000
 RIOTA/3 00000010010000111110
 RIOTA/4 10001100010000111000
 RIOTA/5 00000000010000110000

NOTA: BENCH Y BENTA = BENEMERITO DE LAS AMERICAS, CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL.
 SNPCH Y SNPTA=SAN PEDRO, CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL; COSCH Y COSTA= COSALAPA,
 CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL; RIOCH Y RIOTA = RIO ARRIBA, CEBO HUMANO Y TRAMPA
 ANIMAL.

TABLA 7. VALORES F_{ST} Y N_m DE 20 MARCADORES RAPD EN 8 SUBPOBLACIONES DE *Anopheles vestitipennis* DE CHIAPAS Y TABASCO.

LOCUS	FST	Nm	Prob.	Theta	Nm(Theta)	FST(Lynch)	Nm(Lynch)
OB5-6	.105	2.1	.2981	.020	12.0	-.102	-2.7
OB5-7	.213	.9	.0169	.152	1.4	.186	1.1
OA9-2	.152	1.4	.0949	.078	3.0	.057	4.1
OA9-4	.157	1.3	.0829	.084	2.7	.040	6.0
OA9-6	.459	.3	.0000	.436	.3	.594	.2
A17-3	.358	.4	.0002	.322	.5	.517	.2
A17-5	.329	.5	.0004	.287	.6	.452	.3
OA8-4	.273	.7	.0027	.222	.9	.264	.7
A14-1	.198	1.0	.0264	.134	1.6	.140	1.5
A14-2	.326	.5	.0005	.285	.6	.323	.5
A14-5	.167	1.2	.0643	.096	2.4	.101	2.2
OB4-3	.447	.3	.0000	.423	.3	.582	.2
OB4-6	.434	.3	.0000	.408	.4	.503	.2
OB4-7	.089	2.6	.4206	.000	*****	-.100	-2.8
C13-5	.405	.4	.0000	.375	.4	.511	.2
C13-6	.720	.1	.0000	.718	.1	.775	.1
C13-7	.179	1.1	.0462	.110	2.0	.097	2.3
OD1-2	.252	.7	.0052	.198	1.0	.226	.9
C10-6	.542	.2	.0000	.528	.2	.631	.1
OC1-1	.094	2.4	.3768	.007	37.2	-.057	-4.6
Avg.	.295	.6	.0000	.283 (.282)	.6	.305	.6
St.Dv.	.168			.193 (.048) (Jackknife)		.267	

**TABLA 8. MATRIZ DE DISTANCIAS GENÉTICAS NO SESGADAS DE NEI & LI (1978)
OBTENIDAS CON 20 MARCADORES RAPD EN 8 SUBPOBLACIONES ANTROPOFILICAS
Y ZOOFILICAS DE *Anopheles vestitipennis* DE LOS ESTADOS DE CHIAPAS Y
TABASCO.**

BENCH	.0000	.1259	.1966	.2754	.1291	.1555	.1203	.2697
BENTA	.1259	.0000	.1961	.3512	.1604	.1592	.1358	.1741
SNPCH	.1966	.1961	.0000	.2671	.1993	.2399	.0972	.2672
SNPTA	.2754	.3512	.2671	.0000	.3215	.2945	.2874	.4065
COSCH	.1291	.1604	.1993	.3215	.0000	.0563	.1638	.1390
COSTA	.1555	.1592	.2399	.2945	.0563	.0000	.1855	.1376
RIOCH	.1203	.1358	.0972	.2874	.1638	.1855	.0000	.2161
RIOTA	.2697	.1741	.2672	.4065	.1390	.1376	.2161	.0000

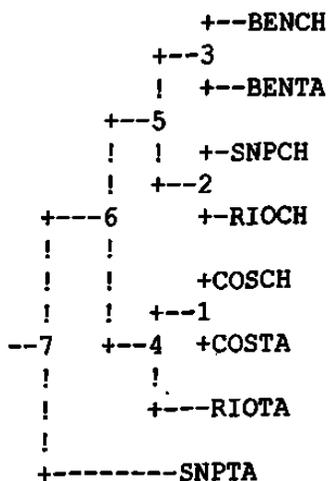
FIGURA 7. DENDOGRAMA DE 8 SUBPOBLACIONES ANTROPOFILICAS Y ZOOFILICAS DE *Anopheles vestitiipennis* DE CHIAPAS Y TABASCO. 20 MARCADORES.

8 Populations

Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.572c

UPGMA method

Negative branch lengths allowed



Between	And	Length
7	6	0.06074
6	5	0.01556
5	3	0.01815
3	BENCH	0.06295
3	BENTA	0.06295
5	2	0.03250
2	SNPCH	0.04860
2	RIOCH	0.04860
6	4	0.02751
4	1	0.04100
1	COSCH	0.02815
1	COSTA	0.02815
4	RIOTA	0.06915
7	SNPTA	0.15740

FIGURA 8. ANALISIS POR "BOOTSTRAP" DE LA CONSISTENCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA BASE DE DATOS DE 8 SUBPOBLACIONES DE *Anopheles vestitipennis* DE LOS ESTADOS DE CHIAPAS Y TABASCO. 20 MARCADORES.

CONSENSUS TREE:

the numbers at the forks indicate the number of times the group consisting of the species which are to the right of that fork occurred among the trees, out of 100.00 trees

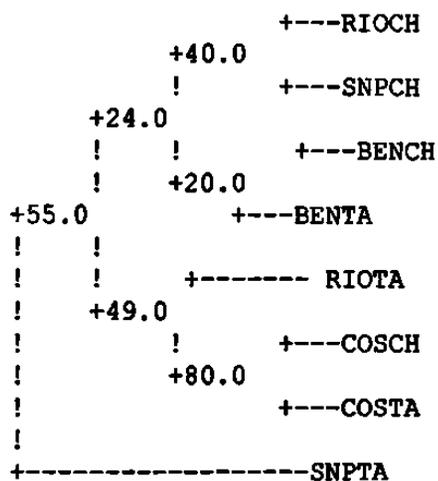


TABLA 9. BASE DE DATOS OBTENIDA PARA EL ANALISIS INTRAPOBLACIONAL DE *Anopheles vestitipennis* DE BENEMERITO DE LAS AMERICAS, CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL.

NUMBER OF INDIVIDUALS:20

TITLE: BENECHTA

NUMBER OF FRAGMENTS:37

(4 (8 (1X, A5) /), 5 (1X, A5))

OA8-1 OA8-2 OA8-3 OA8-4 OA8-5 OA9-1 OA9-2 OA9-3
 OA9-4 OA9-5 OA9-6 A14-1 A14-2 A14-3 A14-4 A14-5
 OB4-1 OB4-2 OB4-3 OB4-4 OB4-5 OB4-6 OB4-7 OB4-8
 OB5-1 OB5-2 OB5-3 OB5-4 OB5-5 OB5-6 C13-1 C13-2
 C13-3 C13-4 C13-5 OD1-1 OD1-2

(A6, 4X, 37A1)

BENECH/01 111111111100110001111110011110111111
 BENECH/02 100111111110011000111110011110111111
 BENECH/03 000011111110010000111101001011011111
 BENECH/04 0100111111100000101110110110111111
 BENECH/05 001001111110001011111110010010111111
 BENECH/06 111011111110011000010001001101011111
 BENECH/07 000101101100000000000000001110000111
 BENECH/08 000001101110010000000000000010001111
 BENECH/09 000001111110000000000001000000001111
 BENECH/10 0000011111000000000001010000100001101
 BENETA/01 111010000000001000000011110111010111
 BENETA/02 0100010000001000000000111001000000101
 BENETA/03 0101110000100000000100011000110101101
 BENETA/04 0101010000101000000000101000000000100
 BENETA/05 0101100000001000000000111001110001101
 BENETA/06 0000000100000000000000111001110001101
 BENETA/07 1000000000000000001000111000000000100
 BENETA/08 0000000001000000000000010000000000100
 BENETA/09 1110110101100000000000011001100101101
 BENETA/10 1110100001100000000101111000100101110

NOTA: BENECH= BENEMERITO DE LAS AMERICAS, CEBO HUMANO.
 BENETA= BENEMERITO DE LAS AMERICAS, TRAMPA ANIMAL.

TABLA 10. Valores de F_{ST} y Rango Efectivo de Migración (Nm) por el método de Wright, Cockermann y Lynch & Milligan, para el análisis intrapoblacional de *Anopheles vestitipennis* de Benemérito de las Américas, Cebo Humano y Trampa Animal.

LOCUS	F_{ST}	Nm	Prob.	Theta	Nm (Theta)	FST (Lynch)	Nm (Lynch)
OA8-1	.052	4.6	.2732	.018	14.0	-.008	-29.8
OA8-2	.172	1.2	.0137	.195	1.0	.205	1.0
OA8-3	.038	6.4	.3908	-.005	-48.5	-.042	-6.3
OA8-4	.038	6.4	.3908	-.005	-48.5	-.042	-6.3
OA8-5	.077	3.0	.1477	.056	4.2	.042	5.7
OA9-1	.721	.1	.0000	.788	.1	.823	.1
OA9-2	1.000	.0	.0000	1.000	.0	1.000	.0
OA9-3	.296	.6	.0006	.356	.5	.366	.4
OA9-4	1.000	.0	.0000	1.000	.0	1.000	.0
OA9-5	.780	.1	.0000	.837	.0	.870	.0
OA9-6	.213	.9	.0049	.251	.7	.256	.7
A14-2	.105	2.1	.0727	.099	2.3	.071	3.3
A14-3	.199	1.0	.0069	.232	.8	.203	1.0
A14-4	.093	2.4	.0985	.081	2.9	.067	3.5
OB4-1	.066	3.5	.1914	.040	6.0	.019	13.0
OB4-2	.031	7.7	.4557	-.015	-16.9	-.027	-9.4
OB4-3	.138	1.6	.0316	.148	1.4	.140	1.5
OB4-4	.148	1.4	.0248	.161	1.3	.161	1.3
OB4-5	.199	1.0	.0069	.232	.8	.203	1.0
OB4-6	.138	1.6	.0316	.148	1.4	.140	1.5
OB4-7	.145	1.5	.0266	.157	1.3	.169	1.2
OB4-8	.258	.7	.0016	.310	.6	.348	.5
OB5-1	.565	.2	.0000	.648	.1	.607	.2
OB5-2	.011	23.1	.7652	-.049	-5.4	-.102	-2.7
OB5-3	.331	.5	.0003	.399	.4	.377	.4
OB5-4	.071	3.3	.1698	.047	5.0	.033	7.3
OB5-5	.104	2.2	.0740	.098	2.3	.097	2.3
OB5-6	.145	1.5	.0266	.157	1.3	.156	1.4
C13-2	.100	2.2	.0820	.092	2.5	.080	2.9
C13-3	.259	.7	.0016	.310	.6	.283	.6
C13-4	.625	.2	.0000	.704	.1	.735	.1
C13-5	1.000	.0	.0000	1.000	.0	1.000	.0
OD1-1	.425	.3	.0000	.506	.2	.504	.2
OD1-2	.625	.2	.0000	.704	.1	.735	.1
Avg.	.299	.6	.0000	.449 (.408)	.3	.457	.3
St. Dv.	.302			.324 (.079)		.337	
				(Jackknife)			

Frequency distribution of FST Values (0.005 classes)

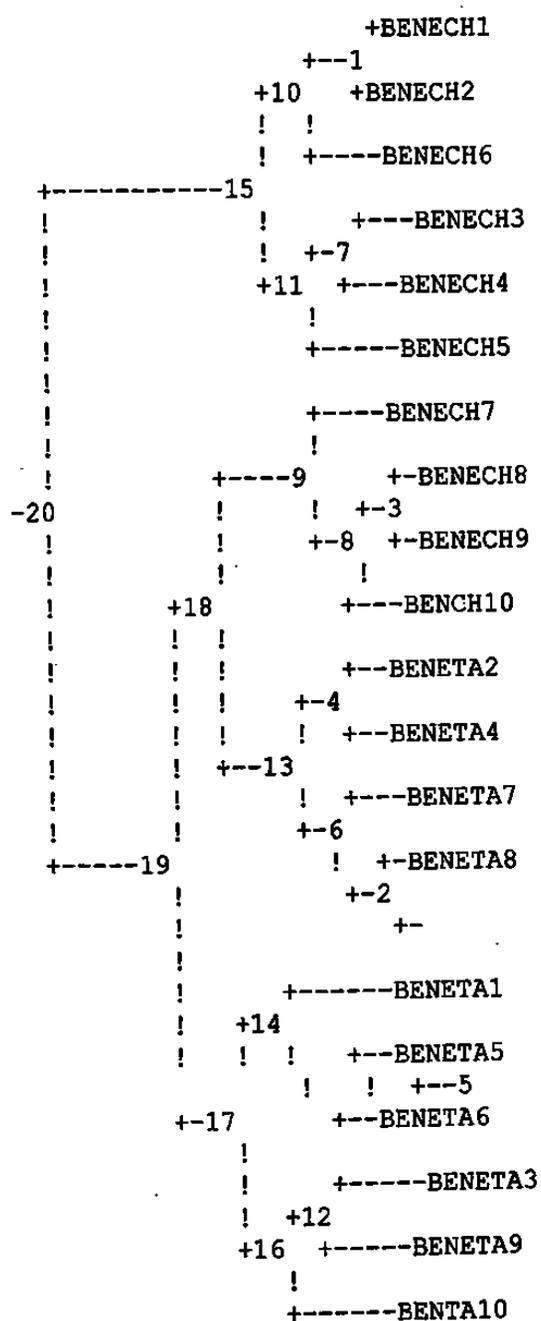
FIGURA 9. DENDOGRAMA DEL ANALISIS INTRAPOBLACIONAL CON DOS SUBPOBLACIONES DE *Anopheles vestitipennis* DE BENEMÉRITO, CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL.

20 Populations

Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.572c

UPGMA method

Negative branch lengths allowed



<u>Between</u>	<u>And</u>	<u>Length</u>
20	15	0.23058
15	10	0.03121
10	1	0.07733
1	BENECH1	0.02780
1	BENECH2	0.02780
10	BENECH6	0.10512
15	11	0.01453
11	7	0.03335
7	BENECH3	0.08845
7	BENECH4	0.08845
11	BENECH5	0.12180
20	19	0.14151
19	18	0.02263
18	9	0.09793
9	BENECH7	0.10485
9	8	0.01535
8	3	0.03230
3	BENECH8	0.05720
3	BENECH9	0.05720
8	BENCH10	0.08950
18	13	0.07795
13	4	0.05223
4	BENETA2	0.07260
4	BENETA4	0.07260
13	6	0.04430
6	BENETA7	0.08052
6	2	0.03822
2	BENETA8	0.04230
2		0.04230
19	17	0.05812
17	14	0.03671
14	BENETA1	0.13058
14	5	0.05798
5	BENETA5	0.07260
5	BENETA6	0.07260
17	16	0.02761
16	12	0.01787
12	BENETA3	0.12180
12	BENETA9	0.12180
16	BENTA10	0.13968

FIGURA 10. Matriz de distancia genética de Nei & Li (1978) entre las poblaciones simpátricas de Benemérito. UPGMA.

BENECH	.0000	.2465
BENETA	.2465	.0000

FIGURA 11. ANÁLISIS POR "BOOTSTRAP" DE LA CONSISTENCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA BASE DE DATOS DE DOS POBLACIONES DE *Anopheles vestitipennis* DE BENEMÉRITO, CEBO HUMANO Y TRAMPA ANIMAL.

CONSENSUS TREE:

the numbers at the forks indicate the number of times the group consisting of the species which are to the right of that fork occurred among the trees, out of 100.00 trees

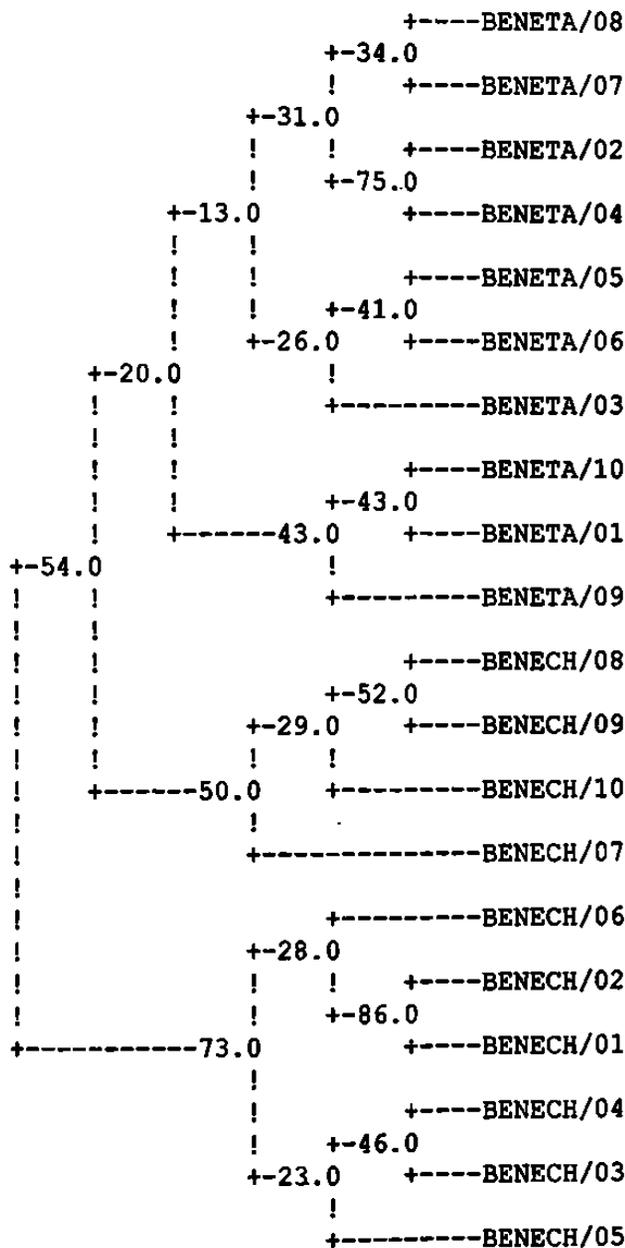
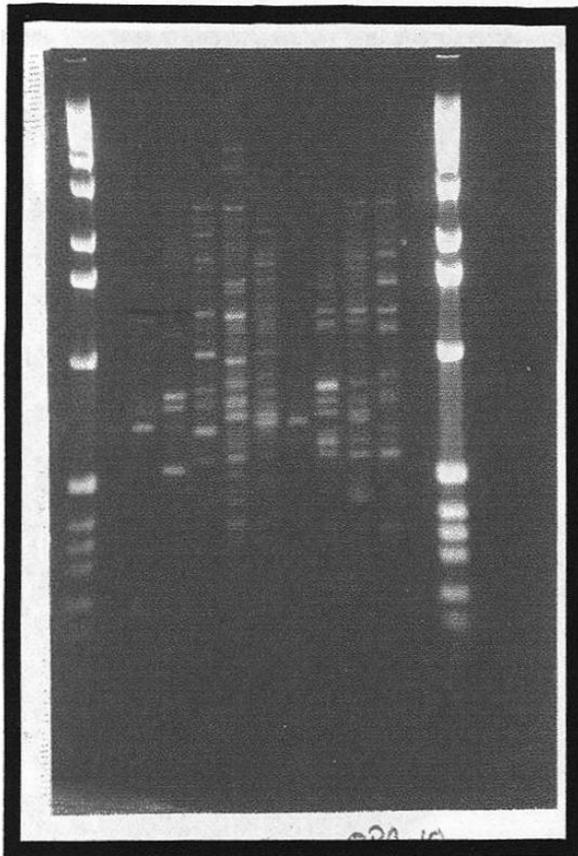
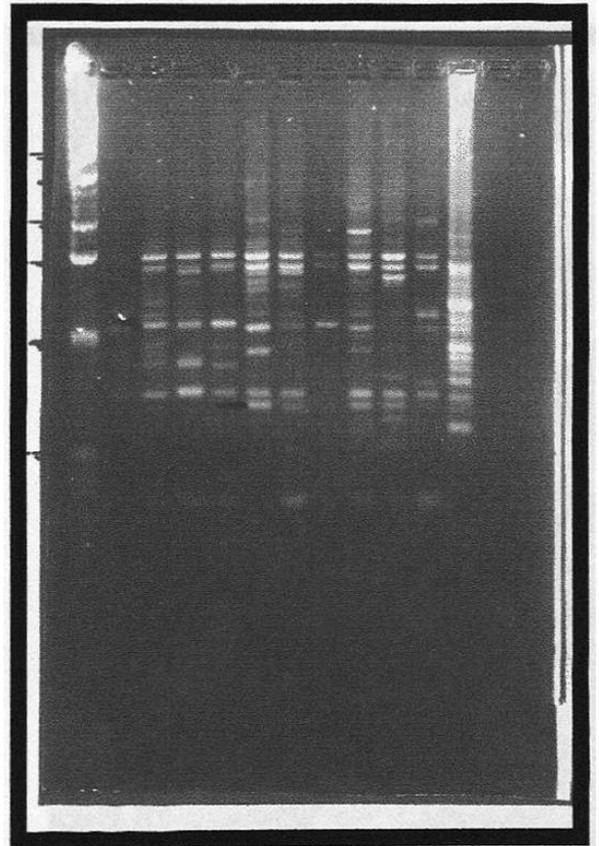


Tabla 11.- SECUENCIAS ALEATORIAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.

PRIMER	SECUENCIA 3' - 5'	% G-C
OPA-08	GTGACGTAGG	60
OPA-09	GGGTAACGCC	70
OPA-14	TCTGTGCTGG	60
OPA-17	GACCGCTTGT	60
OPB-04	GGACTGGAGT	60
OPB-05	TGCGCCCTTC	70
OPC-01	TTCGAGCCAG	60
OPC-10	TGTCTGGGTG	60
OPC-13	AAGCCTCGTC	60
OPD-01	ACCGCGCCGG	90

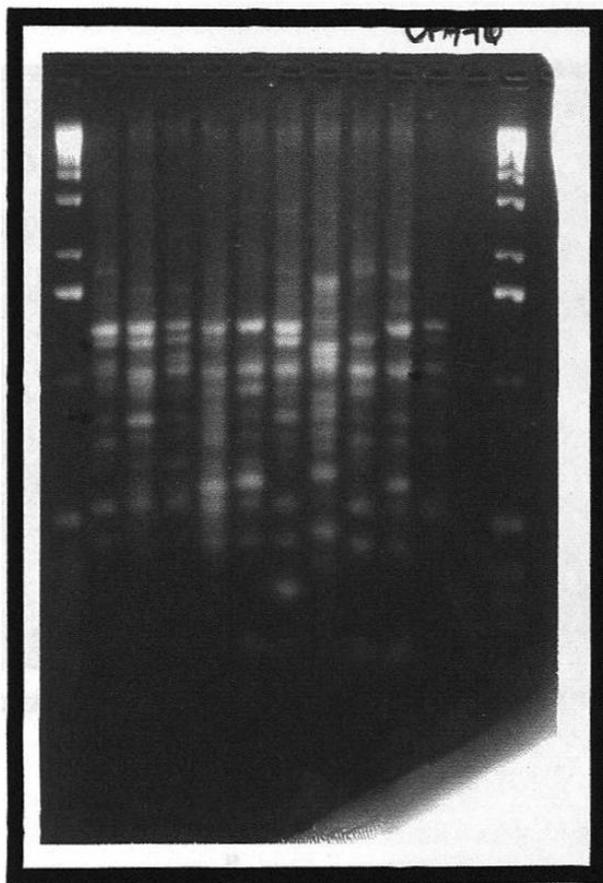


a

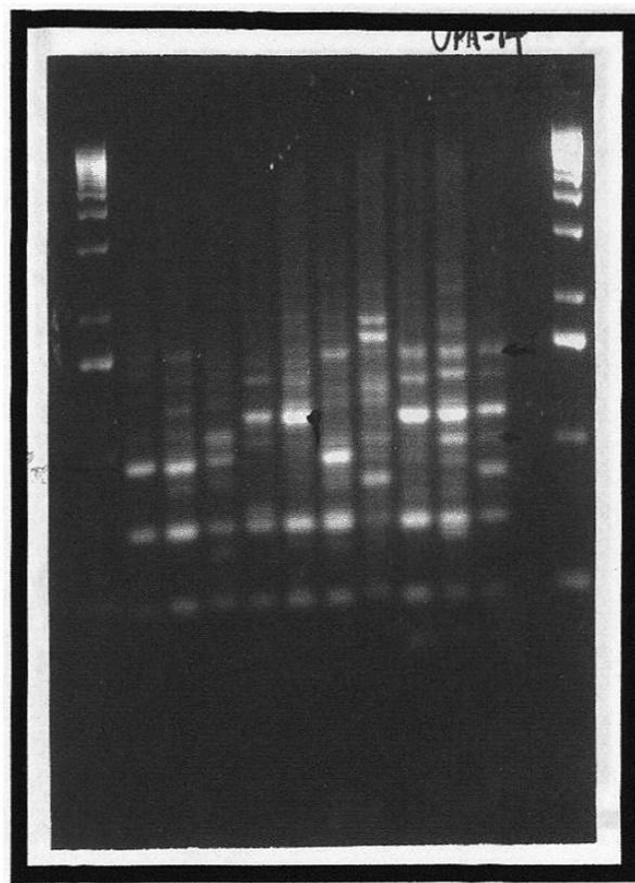


b

Figura 12. Productos de amplificación de 10 individuos *An. vestitipennis* de distintas localidades de la Selva y Costa. a) OPC-10. b) OPB-5.

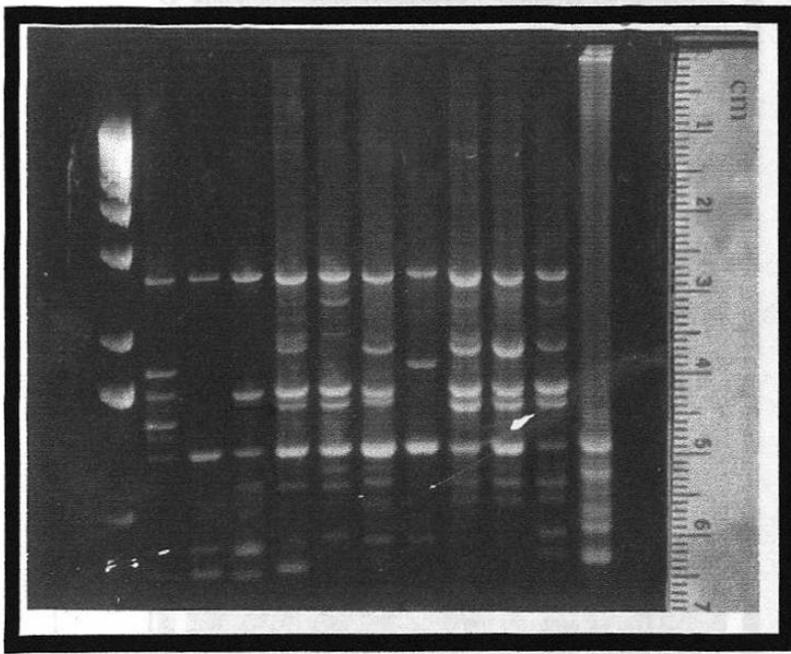


a

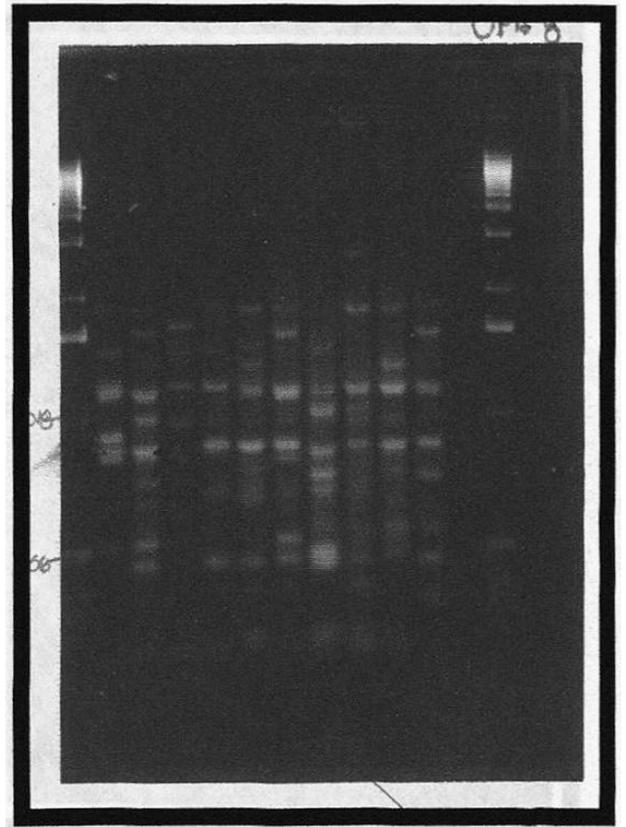


b

Figura 13. Productos de amplificación de 10 individuos *Anopheles vestitipennis* de diferentes localidades de la Costa y Selva. a) OPA-16. b) OPA-17.



a



b

Figura 14. Productos de amplificación de 10 individuos *Anopheles vestitipennis* de distintas localidades de la Costa y Selva Lacandona. a) OPC-1 b) OPA-8.

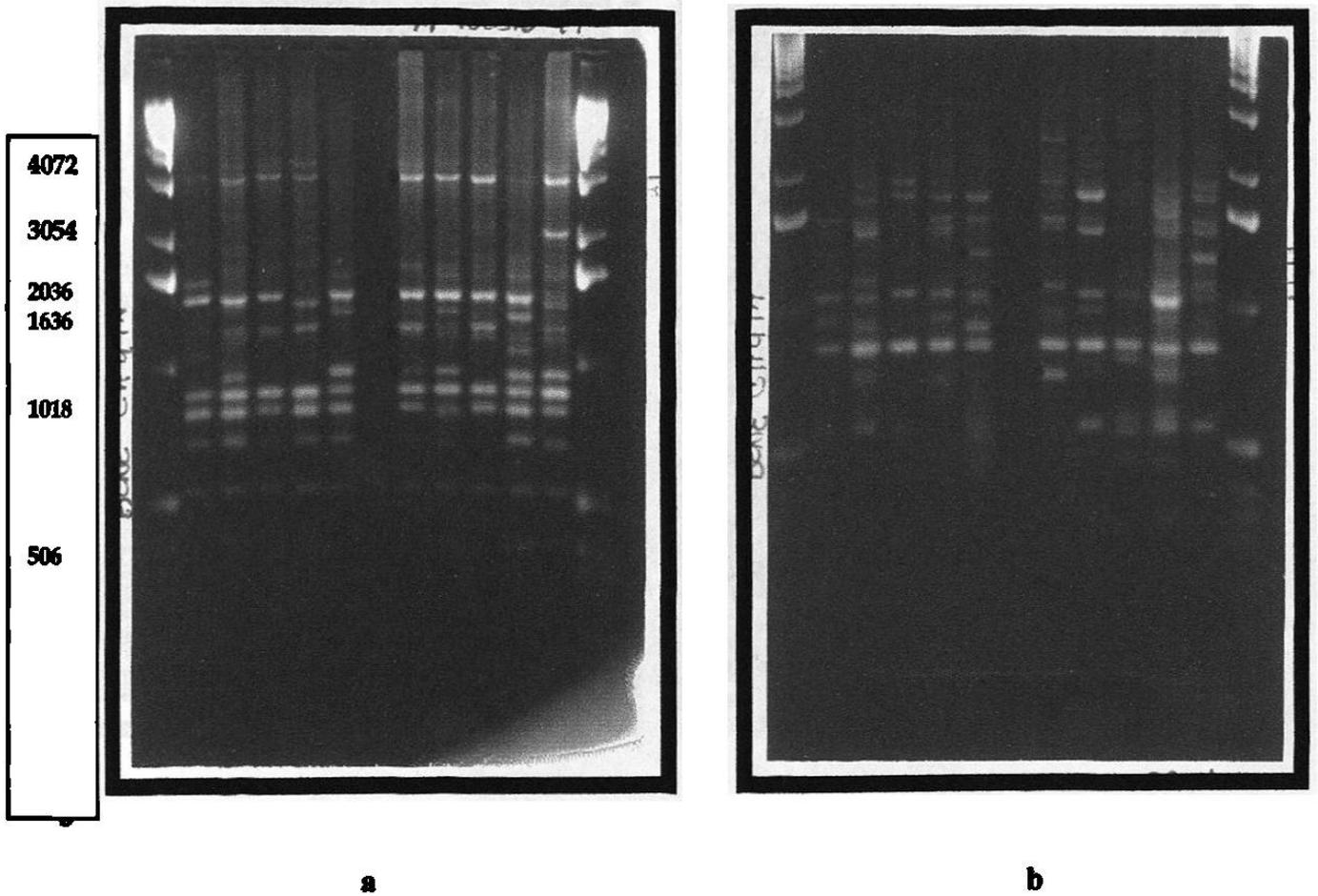
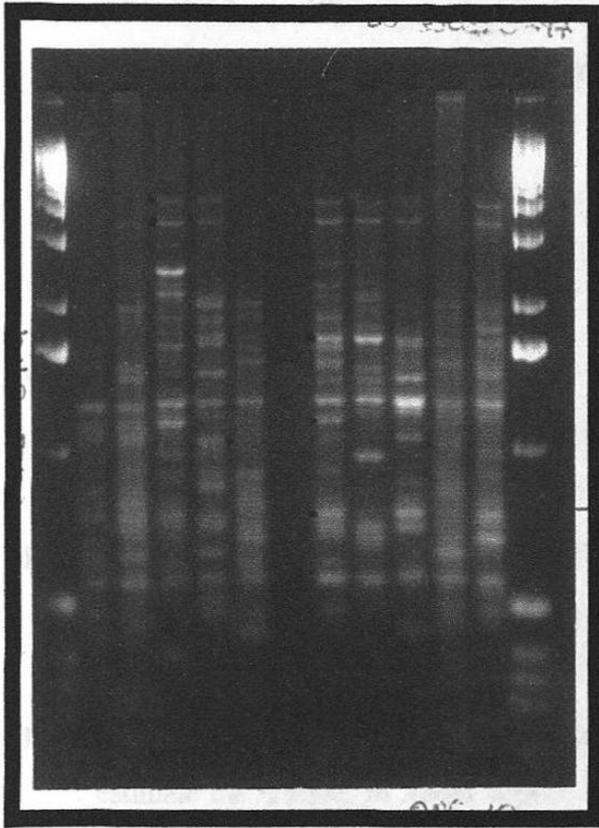
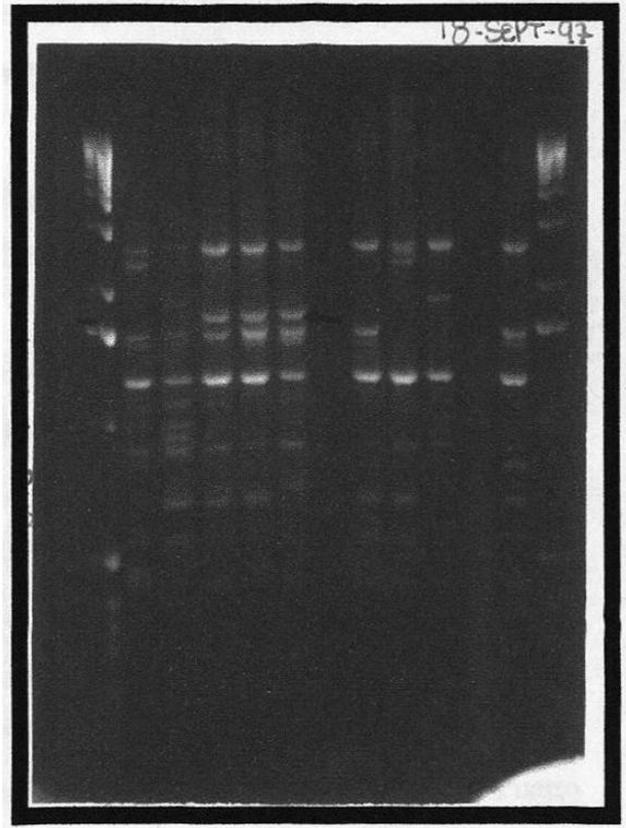


Figura 15. Productos de amplificación de 10 individuos *Anopheles vestitipennis* Benemérito de las Américas, cebo humano y trampa animal. a) OPC-13. b) OPB-4.



a



b

Figura 16. Productos de amplificación de 10 individuos *Anopheles vestitipennis*, Benemérito de las Américas, cebo humano y trampa animal. a) OPC-10. b) OPC-1.

LITERATURA.

- Arredondo-Jiménez, J.I., D.N. Bown, M.H. Rodríguez, C. Villarreal, E.G. Loyola, y C.E. Frederickson. 1992. Tests for the existence of genetic determination or conditioning in host selection by *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) *J Med Entomol* **29**: 894-897.
- Arredondo-Jiménez J.I. 1995. Comparative ecology of allopatric populations of *Anopheles (Anopheles) vestitipennis* (Diptera:Culicidae) Ph. Dissertation. Davis, Univesity of California.
- Arredondo-Jiménez, J. I., J. Gimnig, M. H. Rodríguez, y R. K. Washino. 1996. Genetics differences among *Anopheles vestitipennis* subpopulations collected using diferent methods in Chiapas State, Southern Mexico. *J Am Mosc Contl Assoc* **12**: 396-401.
- Apóstol, B. L., W. C. Black, B. R. Miller, P. Reiter y B. J. Beaty. 1993. Estimation of family numbers at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theor Appl Gen* **86**: 991-1000.
- Apóstol, B. L., W. C. Black, P. Reiter y B. R. Miller. 1994. Use of RAPD-PCR markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg* **51**: 89-97.
- Apóstol, B. L., W. C. Black y B. R. Miller. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* **76**: 325-334.
- Ayala, F.J., JA Kiger, Jr. 1984. Modern Genetics. Benjamin-Cummings Publishing Company. Barnes & Noble Editorial.
- Ballinger-Crabtree, M. E., W. C. Black y B. R. Miller. 1992. Use of genetics polymorphisms detected by RAPD-PCR by differentiation and identification of *Aedes aegypti* populations. *Am J Trop Med Hyg* **47**: 893-901.
- Beaty, B. J. y W. C. Marquardt. 1996. The biology of disease vectors. The University Press of Colorado, 417-470.

- Black, W. C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Ins Mol Biol* 2: 1-6.
- Black, W.C. 1995. Statistical analysis of arbitrarily primed PCR patterns in molecular taxonomic studies. En: "Methods in molecular biology, species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods". pp. 39-55. Clapp C.L.(ed) Humana Press, .
- Black, W. C. y N. M. DuTeau. 1997. The molecular biology of insect disease vectors. En: "A Methods Manual", Chapman and Hall Publishers. J.Crampton, C.B. Beard and C. Louis (eds.) New York.
- Bush, G. L. 1975. Modes of animal speciation. *Ann Rev Ecol Syst* 6:339-364.
- Bidochka, MJ., MA Mc Donald, RJ St. Ledger y D.W. Roberts. 1994. Differentiation of species and stains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) *Curr Gen* 25: 107-113.
- Bruce-Chwatt, LJ. 1988. History of malaria from prehistory to eradication. Principles and Practices of Malariology. 1: 1-59. Churchill-Livingstone, Edimburg, London, Melbourne and New York.
- Coen, ES; T. Strachan y G. Dover. 1982. Dynamic of concerted evolution of ribosomal DNA and histone genes families in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila* *J Mol Evol* 158: 17-35.
- Coluzzi M. 1988. Anopheline mosquitoes: genetic methods for species differentiation. En: "Malariology". 411-430. Wernsdorfer W.H. e I. McGregor (eds.) Edinburgh, London, Melbourne and New York:Churchill-Livingstone.
- Chapco, W. N., W. Ashton, R. K. Martel, N. Antonishishyn y W. L. Crosby. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetic and systematics of grasshoppers. *Genome* 35: 569-574.
- Crampton, J. M., I. Comley; P. Eggleston, S. Hill, M. Hughes, T. Knapp, G. Lycett, R. Urwin y A. Warren. 1992. Molecular biological approaches to the study of vectors in relation to malaria control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 43-49.

- De Sousa G. B., A. Jiménez, A. Blanco, y C. N. Gardenal. 1996. Gene flow in *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) from Central Argentina. *J Med Entomol* 33: 894-900.
- Dyar, H. G. y F. Knab. 1906. Diagnoses of new species of mosquitoes. *Proc Biol Soc Wash.* 19:133-142.
- García Archila, J. R. 2001. Comparación de dos poblaciones simpátricas de *Anopheles vestitipennis* (Diptera:Culicidae) de Nueva Independencia, Chiapas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas.
- Gawel, N. J. y A. C. Bartlett. 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Ins Mol Biol* 2: 33-38.
- Gooding, R. H. 1996. Genetic variation in arthropod vectors of disease-causing organisms: obstacles and opportunities. *Clin Microbiol Rev* 9: 301-320.
- Haig S. M., J. M. Rhimer y D. J. Heckel. 1994. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Mol Ecol* 3: 581-595.
- Hartl, D. L. y A.G. Clark. 1989. Principles of population genetics, 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Kambhampati, S., W. C. Black y K. S. Rai. 1992. Random amplified polymorphic DNA-PCR of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, statistical analysis, and applications *J Med Entomol* 29: 939-945.
- Kaesuk, Yoon, C. 1993. Botanical Witness for the Prosecution. *Science*, 260: 894-895.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge, U. K.: Cambridge University Press.
- Komp, W.H.W. 1942. The Anopheline mosquitoes of the Caribbean region. United States Public Health Services, National Institute of Health, Bulletin 179.
- Kunz, B. L., S. E. Cope y R. J. Stoddard. 1989. Chaetotactic analysis of two species in the *Anopheles maculipennis* complex in California. *Proc Pap California Mosq Vec Cont Assoc* 57:90-93.

- Loyola, E. G., J. I. Arredondo, M. H. Rodríguez, D. N. Bown, y M. A. Vaca. 1991. *Anopheles vestitipennis*, the probable vector of *Plasmodium vivax* in the Lacandon Forest of Chiapas, Mexico. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 85:171-174.
- Loxdale, H. D. 1990. Estimating levels of gene flow between natural populations of cereal aphids (Homoptera: Aphididae). *Bull Entomol Res* 80: 331-338.
- Lynch, M. y B.C. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3: 91-99.
- Michelmore, R. W., I. Paran y R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proc Nat Acad Sci U. S. A.* 88: 9828-9832.
- Mullis, K. S. y F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 55:335-350.
- Nájera, J. A., R. L. Kouznetzov y C. Dellacollette. 1998. Malaria epidemics. Detection and control, forecasting and prevention. WHO/MAL/98.1084. Geneva:World Health Organization.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am Nat* 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei, M. y W. H. Li. 1985. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci U. S. A.* 76: 5269-5273.
- Operon Technologies. 1994. Operon 10-mer Kits Products Information. Alameda, California:Operon.
- Padilla, N., P. Molina, J. Juárez, D. N. Bown y C. Cordon-Rosales. 1992. Potential malaria vectors in northern Guatemala. *J Am Mosq Cont Assoc* 8: 305-306.
- Parra-Dussan, Marcela. 1995. Malaria: De la quina a la vacuna sintética. Editorial Piedemonte Ltda. AA 75029. Santafé de Bogotá, Colombia. 11-28.

- Pérez, T., J. Albornoz y A. Domínguez. 1998. An evaluation of RAPD fragments reproducibility and nature. *Mol Ecol* 7: 1347- 1357.
- Perós, J.P., G. Berger y F. Lahogue. 1997. Variation in pathogenicity and genetic structure in the *Eutypa lata* population of a single vineyard *Phytopathol* 87: 799-806.
- Rodríguez, M. H., B. Chávez, J. E. Hernández-Avila, A. Orozco, and J. I. Arredondo-Jiménez. 1999. Description and morphometric analysis of the eggs of *Anopheles* (*Anopheles*) *vestitipennis* (Diptera: Culicidae) from Southern Mexico. *J Med Entomol* 36: 78-87.
- Rogers, J. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distances. *Studies in genetics* IV 145-153. University of Texas Publication 7213.
- Saiki, R. K., S. J. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, M. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis sickle-cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sicard, D., Y. Michalakis, M. Droon y C. Neema. 1997. Genetic Diversity and Pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the Three Centers of Diversity of its Hosts, *Phaseolus vulgaris*. *Ecol Popl Biol* 87: 807-813.
- Szmidt, A.E., XR Wang y MZ Lu. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus silvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Hered* 76: 412-420.
- Tabachnik, W.J., y WC Black. 1994. Making a case for molecular population genetics studies of arthropod vectors *Paras Today* 11: 27-30.
- Townsend, C. R., J. L. Harper y M. Begon. 2000. *Essentials of Ecology*. Malden, Massachusetts:Blackwell Science.
- Ulloa, A., J. I. Arredondo-Jiménez, M. H. Rodríguez y I. Fernández-Salas. 2001. Innate host preferences in *Anopheles vestitipennis*. *J Am Mosq Cntrl Assoc* 17:in press.
- Vargas L. y A. Martínez-Palacios. 1956. *Anofelinos mexicanos, taxonomía y distribución*. México, D. F.:Secretaría de Salubridad y Asistencia, Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo.

- Weir, B.S. y C.C. Cockerman. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evol* 38: 1358-1370.
- Villarreal-Treviño, C., J. I. Arredondo-Jiménez y M. H. Rodríguez. 1998. Bionomía de los principales vectores de paludismo en México. En: "A cien años del descubrimiento de Ross". El Paludismo en México. pp. 149-161. Kumate J. Y A.Martínez-Palomo (eds.).El Colegio Nacional, México, D.F. .
- Wilkerson, R. C. y D. Strickman D. 1990. Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. *J Am Mosq Cont Assoc* 6:7-34.
- Wilkerson, R. C., T. J. Parsons, D. G. Albright, T. A. Klein y M. J. Braum. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). *Ins Mol Biol* 1: 205-211.
- Wilkerson, R. C., T. J. Parsons, T. A. Klein, T. V. Gaffigan, E. Bergo y J. Consolim. 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles* (Nyssorhynchus) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. *J Med Entomol* 32: 697-704.
- Wilkerson, R. C., T. V. Gaffigan, y J. B. Lima. 1995. Identification of species related to *Anopheles* (Nyssorhynchus) *albitarsis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). *Mem Ins Oswaldo Cruz* 90: 721-732.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubeklik, K. J. Livak, J. A. Rafalski y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucl Ac Res* 18: 6531-6535.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eug* 15: 323-354.
- Wright, S. 1980. Genic and organismic selection. *Evolution* 34: 825-843

APÉNDICE.

COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES AMORTIGUADORAS UTILIZADAS.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PARA EXTRACCIÓN DE DNA. (Cohen, 1982).

0.1M NaCl

0.2M sacarosa

0.1M Tris HCl pH 9.1

0.05M EDTA pH 8.0

0.05% SDS

Se guarda en alíquotas de 1 ml a -20°C .

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TE pH 8.0 PARA RESUSPENDER DNA GENÓMICO (Black, 1996).

0.05M Tris HCl

EDTA pH 8.0

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE TE pH 7.4 PARA RESUSPENDER OLOGNUCLEOTIDOS (Operon Technologies; Maniatis).

10mM Tris HCl pH 7.4

1 mM EDTA pH 8.0

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CARGA 6X PARA LA ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA (Maniatis)

0.25% Azul de bromofenol

0.25% xilene/cianol FF

30% glicerol en agua

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TRIS-BORATO-EDTA DE ELECTROFORESIS PARA LOS GELES DE AGAROSA (Maniatis). SOLUCIÓN STOCK 2.5X.

(Cantidades por litro)

27 gr Tris base

13.27 gr Acido bórico

10 ml EDTA 0.5M pH 8.0

Se preparan 700 ml de solución amortiguadora 1X (280 ml TBE 2.5X y 420 ml agua bidestilada). De estos, 85 ml se utilizan para hacer un gel de agarosa al 1.5% (1.2 agarosa). El resto de la solución es para llenar la cámara de electroforesis

SOLUCIÓN DE MgCl₂ para las reacciones de PCR.

Se hizo una solución stock de 1M de MgCl₂, a partir de la cual se hicieron aliquotas de 1 ml de 100 mM de concentración: 100 ul de MgCl₂ 1M y 900 ul agua inyectable.

REACTIVOS Y EQUIPO UTILIZADO EN LA FASE EXPERIMENTAL.

Reactivos

Acido Clorhídrico Merck

Agarosa MP Boehringer-Mannheim

Agarosa Ultra Pure GIBCO BRL

Acido bórico GIBCO BRL

Azul de Bromofenol Merck

Aceite mineral estéril SIGMA

Agua inyectable Lakeside y Pisa

Amortiguador 10X para PCR sin MgCl₂ Perkin-Elmer-Cetus

Cloruro de magnesio Merck

Cloruro de Sodio Merck

EDTA SIGMA

ETOH SIGMA

Glicerol Merck

Nucleótidos GIBCO BRL

Oligonucleótidos de Operon Technologies, Inc.

Sacarosa Merck

SDS Biorad

Trizma-base de Sigma

***Taq* Polimerasa Perkin-Elmer-Cetus**

Xilene-cianol FF SIGMA

1 Kb DNA Ladder Marcador de tamaño para fragmentos de DNA de 500 pb hasta 12 kb GIBCO BRL.

Equipos

El termociclador utilizado para todas las reacciones fue un Termal Cyclor de Perkin-Elmer-Cetus modelo 480.

Transiluminador marca UVP Inc. Luz ultravioleta y caja de luz blanca Modelo TM-15.

Cámaras de electroforesis marca Owl Scientific Inc. "The Easy Cast™ Horizontal Electrophoresis System" modelo B1 tamaño mediano, 600 nml de capacidad.

Cámara fotográfica Polaroid DS-34 (Direct Screen Instant Camera) con respaldo Polaroid 405.



DONATIVO

