

Variabilidad genética en *Bemisia tabaci* (Gennadius) en mecanismos de resistencia inducida en plantas de tomate

C. CALLEJAS, M. D. OCHANDO

Hoy en día, los posibles cambios genéticos subyacentes en mecanismos de resistencia inducida, son prácticamente desconocidos. Sin embargo, resulta evidente la necesidad de esa información genética en la planificación de los programas de control integrado si queremos una lucha contra las plagas más eficaz y ecológicamente aceptable. El cultivo del tomate en España constituye un importante elemento de nuestra agricultura, y una de las plagas más dañinas sobre ese cultivo es *Bemisia tabaci*, que a su capacidad de infestación une la de ser transmisora de un elevado número de virus a los cultivos que ataca. Así, en el presente trabajo hemos analizado los cambios genéticos provocados en *B. tabaci* por la presencia de un elicitador, el benzotiadicol (BTH), en sus plantas hospedadoras, tomate. Los resultados, aún cuando preliminares, evidencian algunas pequeñas diferencias genéticas entre diferentes muestras (tratadas y testigo), que resultan interesantes para avanzar en el conocimiento de las relaciones huésped-parásito y, en concreto, en el caso de la resistencia inducida.

C. CALLEJAS, M. D. OCHANDO. Dpto. de Genética. Facultad de Ciencias Biológicas. U. Complutense. 28040- Madrid. dochando@bio.ucm.es

Palabras clave: *Bemisia tabaci*, resistencia inducida, RAPD-PCR, variabilidad genética

INTRODUCCIÓN

En las relaciones huésped-parásito, subyace una interacción genética que de manera obligada conlleva la coevolución de ambos, fundamentalmente por presiones selectivas recíprocas, aunque también provocadas por otros factores ambientales bióticos y abióticos. Es evidente la necesidad del conocimiento de esas interacciones en la planificación de programas de control integrado. Pero, desafortunadamente, los aspectos genéticos han sido poco analizados y como consecuencia la información en este campo es muy escasa.

En general, los pocos estudios existentes han incidido o bien en la identificación taxonómico-molecular de biotipos ya estableci-

dos (FEDER *et al.*, 1988; FEDER y BUSH, 1991; BROWN *et al.*, 1995, 1996; HILLIS *et al.*, 1996), o bien en la búsqueda de genes concretos y/o cambios drásticos en su frecuencia, que guardasen alguna relación con aspectos, fundamentalmente, de resistencia (TUJET *et al.*, 2001; DABORN *et al.*, 2002; HEMINGWAY *et al.*, 2002; RANSON *et al.*, 2002). Este enfoque es importante, pero nos olvidamos de que el enfrentamiento de una plaga a una nueva circunstancia ambiental, como puede ser la presencia de un elicitador, puede inducir cambios genéticos necesarios para su respuesta adaptativa al nuevo reto ambiental. Estos posibles cambios genéticos implicarían, no sólo algún gen concreto relacionado con la resistencia, sino un amplio número de loci responsables del metabolis-

mo de ese elicitor, así como otros cambios del fondo genético como consecuencia de interacciones diversas. Por tanto, este tipo de estudios resultan fundamentales cuando lo que se pretende es una lucha eficaz contra la plaga mediante métodos de control selectivos y ecológicamente aceptables. Y como consecuencia, a la larga, económicamente más rentables y menos dañinos para nuestra salud.

La detección general de cambios genéticos necesitaría una técnica molecular capaz de identificar marcadores a todo lo largo del genoma. De las posibles metodologías disponibles, la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa, en conjunto con cortos cebadores de secuencia conocida y arbitraria (RAPD-PCR), ha resultado extraordinariamente atractiva debido a una serie de ventajas que ofrece. No resulta sorprendente que en los últimos años los marcadores RAPD-PCR se hayan usado en todo tipo de organismos para el estudio de muy diversos tipos de problemas (HAYMER y MCINNIS 1994; BARUFFI *et al.*, 1995; REYES *et al.*, 1996; REYES y OCHANDO, 1998). En nuestro caso concreto, estos marcadores poseen, entre otras, la ventaja de explorar todo el genoma, de poder utilizarse individualmente en organismos de tamaño muy pequeño, y la aparente desventaja de representar ADN tanto codificante como no codificante, tanto secuencias únicas como repetitivas, etc. No obstante, esta aparente desventaja puede constituir una aproximación mucho más realista a ciertos problemas. Si lo que pretendemos es conocer si se dan diferencias genéticas entre grupos muestrales, sea por la causa que sea (determinística o aleatoria), un completo examen del genoma nos acercará más a la realidad, aún cuando los resultados puedan resultar menos llamativos cuantitativamente hablando.

En España, el tomate constituye hoy en día un importante elemento en nuestra agricultura, con amplias zonas dedicadas a su cultivo, fundamentalmente en Canarias y sudeste de la Península (Almería, Málaga,

Murcia). Una de las plagas más graves en estos cultivos la constituye *B. tabaci* (Genadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), descrita en España por primera vez en 1943 (GOMEZ-MENOR, 1943), y que a partir de los años 80 se convierte en un importante problema agrícola (CARNERO *et al.*, 1990; CELIX *et al.*, 1996). Es una especie muy polífaga, capaz de atacar más de 500 especies y variedades de nuestros cultivos, con la gravedad añadida provocada por su capacidad de transmitir un elevado número de virosis, de las cuales gran parte afecta a la planta de tomate.

De hecho, la técnica RAPD-PCR ya se ha aplicado a *B. tabaci*, tanto en España como en otros países, para la identificación de biotipos, estudios taxonómicos y de poblaciones (GAWEL y BARTLETT, 1993; DE BARRO y DRIVER, 1997; GUIRAO *et al.*, 1994, 1997; ABDULLAHI *et al.*, 2003). Pero un paso más allá se encuentra el análisis del proceso de formación de dichos biotipos, como respuesta a resistencia inducida a diferentes elicitores. Y en concreto, la utilización de marcadores del tipo RAPD-PCR para la detección de posibles efectos selectivos, en la relación huésped-plaga, sólo ha sido utilizada en una ocasión, por nuestro propio equipo (CALLEJAS *et al.*, 2001).

Considerando todo lo anterior, hemos aplicado a *B. tabaci*, la técnica de RAPD-PCR para generar ADN polimórfico amplificado al azar, con la finalidad de estudiar, desde un punto de vista genético, posibles efectos de respuesta a resistencia inducida provocada por la aplicación de benzotiacidol (BTH), sobre la planta de tomate. Esta información podría ayudarnos en la comprensión de las relaciones huésped-parásito y ser de utilidad en la gestión de los programas de control integrado de plagas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de *Bemisia tabaci*.

Se estudiaron cuatro muestras poblacionales, biotipo B, procedentes de un cultivo mantenido en el INIA de Madrid. Dos de ellas provenientes de hospedadores someti-

dos a un mecanismo de resistencia inducida con benzotiazidol (BTH), y las otras dos poblaciones testigo. En ambos casos, se analizaron las generaciones 0 y 1. La denominación establecida fue B_0 y B_1 , para las dos muestras "tratadas", y T_0 y T_1 para las dos muestras testigo, siendo analizados 20 individuos en cada caso.

Método experimental.

La obtención de las muestras de *B. tabaci* fue realizada en el INIA (Dra. S. Pascual). Plántulas de tomate, variedad Marmande se pulverizaron hasta goteo con BTH (Bion®) 3gl^{-1} . Igualmente, otras tantas plántulas fueron tratadas con agua destilada. Transcurridos tres días, dichas plántulas se colocaron en jaulas de cría en las que también fueron introducidas moscas del biotipo B. Dos días más tarde se recogieron de las plántulas las moscas que constituyeron las muestras poblacionales B_0 y T_0 . Los huevos puestos por dichas moscas se dejaron desarrollar hasta el estadio adulto y se obtuvieron las poblaciones B_1 y T_1 . Las moscas adultas se conservaron en etanol al 70% hasta su posterior análisis.

Extracción y amplificación del ADN

El ADN genómico se extrajo de cada individuo de acuerdo con el protocolo de HIGUCHI

(1989), con ligeras modificaciones. Cada mosca se disgregó con una punta de pipeta en un tubo Eppendorf de 0,5 ml que contenía 50 μl de tampón de lisis [Tampón PCR Stoffel 10x (PE Applied Biosystems), 1,5 mM MgCl_2 , 3 μg de Proteinasa K y 0,5 μl del detergente Tween 20]. El homogenizado se incubó a 60°C durante una hora y diez minutos a 95°C para inactivar la Proteinasa K. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su amplificación mediante la técnica RAPD-PCR.

Para las reacciones de amplificación se siguió el protocolo de WILLIAMS *et al.* (1990), con algunas adaptaciones, en un volumen final de 12,5 μl , conteniendo 1,25 μl de tampón, MgCl_2 4 mM, 0,2 mM de cada uno de los desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 picomoles del oligodecámero correspondiente, 12 ng de ADN genómico y 0,625 U de la ADN Polimerasa Fragmento Stoffel (PE Biosystems).

Se ha analizado un total de 80 individuos empleando 3 cebadores diferentes para las amplificaciones. Los cebadores utilizados, de 10 nucleótidos de longitud, fueron de las series A y C de Operon Technologies: A07 (GAAACGGGTG), C01 (TTCGAGCCAG) y C16 (CACACTCCAG).

El programa utilizado para las amplificaciones fue: un ciclo inicial de 5 minutos a

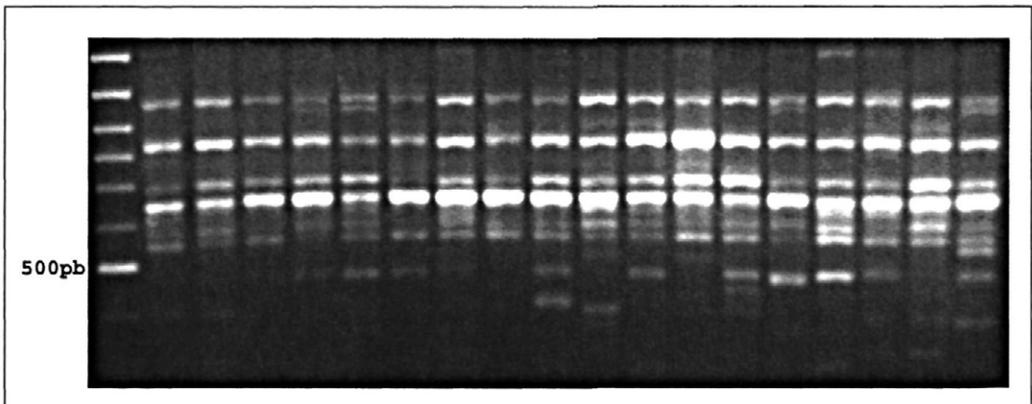


Figura 1. Gel de azarosa que muestra el perfil de bandas de ADN (RAPD-PCR) obtenido con el cebador C16 en *B. tabaci*. La primera columna corresponde a un marcador de peso molecular escalera de 100 pares de bases (pb) y el resto de columnas a distintos individuos de *B. tabaci*.

94 °C, para desnaturalización, 45 ciclos de amplificación en tres pasos (1 minuto a 94° C, 1 minuto a 36° C, 6 minutos a 72° C), y un último ciclo de terminación de 6 minutos a 72° C. Para la obtención de los perfiles de RAPD se utilizó un termociclador programable Peltier PTC (MJ Research).

Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2 % con tampón Tris-Acético-EDTA (TAE). Por último se visualizaron tras tinción con bromuro de etidio (EtBr, 1mg/ml) con un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron.

Todos los cebadores proporcionaron bandas de ADN claras y reproducibles. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de amplificación del ADN de *B. tabaci* con el cebador C16.

Análisis de datos.

Los resultados de amplificación se interpretaron en forma de presencia o ausencia de bandas, sin considerar las diferencias de intensidad.

En primer lugar, se buscaron bandas exclusivas de especie, es decir, bandas monomórficas presentes en todos los individuos de las cuatro muestras. También se buscaron bandas exclusivas de población, que son bandas monomórficas presentes en todos los individuos de una determinada muestra y ausentes en las demás. A continuación se realizaron comparaciones entre las frecuencias de las bandas variables o polimórficas, aquellas presentes en todas las muestras pero en distintas frecuencias.

Se realizaron análisis de la varianza molecular (EXCOFFIER *et al.*, 1992) para determinar qué proporción de la variabilidad total era atribuible a la varianza entre distintos grupos, entre muestras y entre individuos pertenecientes a una misma muestra. También se llevaron a cabo pruebas χ^2 para cada una de las bandas de ADN con el fin de detectar posibles diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su frecuencia en las distintas muestras. Y por último, se aplicaron análisis de diferencias estandarizadas para comprobar si

Cuadro 1. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA). En la columna 1 se muestran los distintos análisis, bien para el conjunto de las cuatro muestras, (1^{er} análisis), o bien agrupando dichas muestras en dos grupos diferentes. 2^a columna: grados de libertad. 3^a columna: estimas de los componentes de la varianza en los distintos análisis. 4^a columna: significación de los componentes de la varianza (tras 10000 permutaciones al azar). 5^a columna: porcentaje de la varianza con el que cada componente contribuye a la varianza total.

Fuente de variación	Grados de libertad	Componente de la varianza	Valor de P	% de la varianza total
1 grupo				
Entre muestras	3	0,0719	0,0152	3,12
Entre individuos de la misma muestra	76	2,2324	0,0142	96,88
2 grupos: generaciones 0 y 1				
Entre los 2 grupos	1	0,0438	0,3315	2,00
Entre muestras dentro de grupos	2	0,0349	0,1328	1,60
Entre individuos de la misma muestra	75	2,1106	0,0163	96,40
2 grupos: tratadas (B) y controles (T)				
Entre los dos grupos	1	-0,0322	1,0000	-1,49
Entre muestras dentro de grupos	2	0,0856	0,1310	3,96
Entre individuos de la misma muestra	75	2,1106	0,0171	97,53
2 grupos: B₁ y resto				
Entre grupos	1	0,0220	0,7489	-1,02
Entre muestras dentro de grupos	2	0,0749	0,0261	3,46
Entre individuos de la misma muestra	75	2,1106	0,0261	97,56

la frecuencia de una banda concreta en una determinada población era mayor o menor que en el conjunto de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los tres cebadores utilizados se obtuvo un total de 44 bandas diferentes, de las cuales 10 fueron invariables, presentes en el 100 % de los individuos estudiados y por tanto, y en principio, "diagnóstico" desde el punto de vista taxonómico y de identificación. Es decir, el biotipo B de *B. tabaci*, origen de nuestras muestras, puede resultar inambiguamente identificado mediante marcadores RAPD-PCR y con los cebadores utilizados, lo que aporta nuevas llaves taxonómicas a las ya conocidas (GAWEL y BARTLETT, 1993; GUIRAO *et al.*, 1994, 1997; de BARRO y DRIVER, 1997). Lógicamente, antes de considerar estas bandas invariables detectadas en el total de individuos y muestras analizadas como claramente "diagnóstico", sería preciso descartar su presencia en otros biotipos.

La detección y diferenciación de biotipos es habitual en entomología aplicada. Inicialmente basada en información estrictamente morfológica, pasó posteriormente a realizarse mediante análisis enzimático (MENKEN Y ULENBERG, 1987; LOXDALE y HOLLANDER, (eds.) 1989; BROWN *et al.* 1995) y actualmente, a escala genómica (GASPARICH *et al.*, 1995; HILLIS *et al.*, 1996; HAYMER *et al.*, 1997; SMITH y BUSH, 1997; REYES y OCHANDO, 1998). Pero el estudio del proceso en sí, de los cambios genéticos que se producen y que son fundamentales especialmente en los casos de resistencia inducida, resulta mucho más dificultoso y por ende, la información a este respecto es escasa cuando no inexistente.

En el presente trabajo se ha pretendido detectar, a diferentes niveles, posibles diferencias genéticas entre cuatro diferentes muestras de *B. tabaci*, como consecuencia de posibles efectos provocados por mecanismos de resistencia inducida a un elicitador específico, el benzotiadicol (BTH), aplicado sobre su planta hospedador, el tomate.

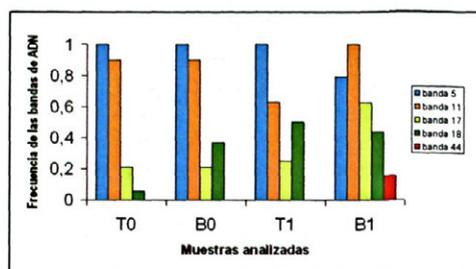


Figura 2. Bandas de ADN que presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a sus frecuencias entre las poblaciones analizadas al realizar pruebas de χ^2 .

No es habitual utilizar marcadores RAPD-PCR en la búsqueda de efectos de procesos selectivos como el de resistencia inducida. Ello se debe fundamentalmente al hecho de que este tipo de marcadores examina todo el genoma, y por tanto, gran parte de los marcadores moleculares detectados deben corresponder a secuencias posiblemente no codificadoras, o repetitivas (WILLIAMS *et al.*, 1990; GAWEL y BARTLETT, 1993), que es esperable se encuentren sometidas en mucho menor grado, si en alguno, a las presiones selectivas. Sin embargo, precisamente por ello, constituyen una muestra mucho más realista que la de cualquier otro tipo de marcadores para un análisis de la relación huésped-parásito en casos de resistencia inducida, y de los posibles efectos sobre el genoma de la plaga.

Los resultados del presente trabajo constituyen una aproximación preliminar a estos problemas, sobre todo considerando que las muestras analizadas pertenecen a dos sucesivas generaciones. No obstante, los datos obtenidos han resultado interesantes e indicativos.

Cualitativamente, se han detectado 4 bandas distintas entre las muestras tratadas y no tratadas, aún cuando están presentes en baja frecuencia. Tres de estas bandas sólo están presentes en la muestra testigo de la generación 1 (T_1), una originada por el cebador C01 y cuya frecuencia es 0,053, y dos con el cebador A07, con frecuencias de 0,053 y 0,158. También se ha detectado una banda presente sólo en las muestras tratadas con

BTH (B_0 y B_1), originada con el cebador C01 y con frecuencias de 0,053 en la muestra B_0 y de 0,133 en la muestra B_1 .

Cuantitativamente, el análisis de la varianza molecular (AMOVA) atribuyó a las diferencias entre muestras un bajo porcentaje, comprendido entre 3,12 y 3,96%, de la variabilidad total observada (Cuadro 1). Es decir, ha puesto de manifiesto que la variación detectada se debe en mayor proporción a variabilidad genética intrapoblacional. En concordancia con ello, la frecuencia de la mayoría de las bandas es muy parecida en todas las muestras, si bien los análisis de χ^2 han mostrado que 5 de las 44 bandas analizadas (11,36%) presentan diferencias significativas entre muestras (Figura 2). Es interesante resaltar que 2 de estas 5 bandas manifiestan esas diferencias atribuibles a la muestra tratada de la generación 1 (T_1).

Así pues, tanto en lo que se refiere a bandas exclusivas de población, como a marca-

dores con frecuencias diferentes en unas y otras muestras, se evidencia la existencia de ciertas diferencias genéticas entre las muestras analizadas, muy probablemente atribuibles a la presencia del elicitor. Diferencias que pueden representar el inicio de una tendencia, sin descartar un aspecto aleatorio o de la estructura familiar de las muestras analizadas. En cualquier caso podríamos afirmar que nuestros marcadores ofrecen una gran sensibilidad en un análisis detallado de los procesos de formación de biotipos de resistencia, fundamentales para una lucha más eficaz contra las plagas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. S. Pascual que nos proporcionase el material biológico. El presente trabajo ha sido financiado mediante subvenciones concedidas al Proyecto AGL2000-1591C02-01.

ABSTRACT

CALLEJAS C., M. D. OCHANDO. 2005. Genetic variability in *Bemisia tabaci* (Gennadius) related to induced resistance on tomato plants. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 71-77.

At present, the possible genetic changes underlying induced resistance mechanisms are practically unknown. Nonetheless, such information is necessary for an efficient integrated control pests. The tomato crop presents a large commercial production in Spain and *B. tabaci* constitutes one of its most important pests due to levels of plants infestation and virus transmission. In this work, genetic changes in *B. tabaci* owing to an elicitor presence in tomato host-plants have been analyzed. Preliminary results suggest some genetic differences among samples. These differences could provide a better understanding of host-parasitic interactions and induced resistance mechanisms.

Key words: *Bemisia tabaci*, induced resistance, RAPD-PCR, genetic variability

REFERENCIAS

- ABDULLAHI, I., WINTER, S., ATIRI, G.I., THOTTAPPILLY, G. 2003. Molecular characterization of whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera, Aleyrodidae) populations infecting cassava. *B. Entomol. Res.*, **93**: 97-106.
- BARRO, P.J. DE, DRIVER, F. 1997. Use of RAPD-PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Entomol.*, **36**: 149-152.
- BARUFFI, L., DAMIANI, G., GUGLIELMINO, C.R., MANDI, C., MALACRIDA, A.R., GASPERI, G. 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitidis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity*, **74**: 425-437.
- BROWN, J.K., FROHLICH, D.R., ROSSELL, R.C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex?. *Annu. Rev. Entomol.*, **40**: 511-534.
- BROWN, J.M., ABRAHAMSON, W.G., WAY, P.A. 1996. Mitochondrial DNA phylogeography of host races of the goldenrod ball gallmaker, *Eurosta solidaginis*

- (Diptera: Tephritidae). *Evolution*, **50**: 777-786.
- CALLEJAS, C., VELASCO, A., OCHANDO, M.D. 2001. Utilización de marcadores moleculares (RAPD-PCR) para la detección de posibles presiones selectivas en *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889). *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat.*, **96**: 331-338.
- CARNERO, A., MONTESDEOCA, M., PÉREZ, F., SIVERIO, A., RODRÍGUEZ, P. 1990. Presencia de *Bemisia tabaci* (Genn) en cultivos comerciales hortícolas y ornamentales de la isla de Tenerife (Islas Canarias). *Cuadernos de Fitopatología*, **25**: 176-180.
- CÉLIX, A., LÓPEZ-SESÉ, A., ALMARZA, N., GÓMEZ-GUILLAMÓN, M.L., RODRÍGUEZ-CEREZO, E. 1996. Characterization of curcubit yellow stunting disorder virus, a *Bemisia tabaci*-transmitted closterovirus. *Phytopathology*, **86**: 1370-1376.
- DABORN, P.J., YEN, J.L., BOGWITZ, M.R., LE GOFF, G., FEIL, E., JEFFERS, S., TIJET, N., PERRY, T., HECKEL, D., BATTERHAM, P., FEYEREISEN, R., WILSON, T.G., FRENCH-CONSTANT, R.H. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, **297**: 2253-2256.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479-491.
- FEDER, J.L., BUSH, G.L. 1991. Genetic variation among apple and hawthorn host races of *Rhagoletis pomonella* across an ecological transition zone in the Mid-Western United States. *Entomol. Exp. Appl.*, **59**: 249-265.
- FEDER, J.L., CHILCOTE, C.A., BUSH, G.L. 1988. Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Nature*, **336**: 61-64.
- GAWEL, N.J., BARTLETT, A.C. 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.*, **2**: 33-38.
- GASPARICH, G.E., SHEPPARD, W.S., HAN, H.Y., MCPHERON, B.A., STECK, G.J. 1995. Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations. *Insect Mol. Biol.*, **4**: 61-67.
- GÓMEZ-MENOR, J. 1943. Contribución al conocimiento de los Aleyrodidos de España (Hem. Homoptera) 1ª nota. *Eos*, **19**: 173-209.
- GUIRAO, P., BEITIA, F., CENIS, J.L. 1994. Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la taxonomía de moscas blancas (Hemiptera, Aleyrodidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**: 757-764.
- GUIRAO, P., BEITIA, F., CENIS, J.L. 1997. Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *B. Entomol. Res.*, **87**: 587-593.
- HAYMER, D.S., MCINNIS, D.O. 1994. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*, **37**: 244-248.
- HAYMER, D.S., HE, M., MCINNIS, D.O. 1997. Genetic marker analysis of spatial and temporal relationships among existing populations and new infestations of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). *Hereditas*, **79**: 302-309.
- HEMINGWAY, J., FIELD, L., VONTAS, J. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*, **298**: 96-97.
- HIGUCHI, R. 1989. Simple and rapid preparation of samples for PCR, in H.A. Erlich (ed) *PCR Technology* (New York: Stockton Press), pp: 31-38.
- HILLIS, D.M., MORITZ, C., MABLE, B.K. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Ass.
- LOXDALE, H.D., HOLLANDER, J. den (eds.). 1989. *Electrophoretic studies on Agricultural pests*. Syst. Ass. Clarendon Press, Oxford, UK.
- MENKEN, S.B.J., ULENBERG, S.A. 1987. Biochemical characters in agricultural entomology. *Agric. Zool. Revue*, **2**: 305-360.
- RANSON, H., CLAUDIANOS, C., ORTELLI, F., ABGRALL, C., HEMINGWAY, J., SHARAKHOVA, M.V., UNGER, M.F., COLLINS, F.H., FEYEREISEN, R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, **298**: 179-181.
- REYES, A., CALLEJAS, C., RODA, P., OCHANDO, M.D. 1996. Caracterización genética en *Ceratitis capitata* asociada a fruto hospedador II. Análisis mediante RAPD-PCR. *Bol. San. Veg. Plagas*, **22**: 361-371.
- REYES, A., OCHANDO M.D., 1998. Use of molecular markers for detecting the geographical origin of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **91**: 222-227.
- SMITH, J.J., BUSH, G.L. 1997. Phylogeny of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase II. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **7**: 33-43.
- TIJET, N., HELVIG, C., FEYEREISEN, R. 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, **262**: 198-198.
- WILLIAMS, J.K.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKY, J.A., TYNGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 6531-6535.

(Recepción: 27 febrero 2004)

(Aceptación: 8 julio 2004)