

DIFERENCIACIÓN MOLECULAR DE LARVAS DE TRES ESPECIES DE *ANASTREPHA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN MÉXICO

SERGIO GÓMEZ-VIVEROS¹; VÍCTOR MANUEL PINTO¹;
ERNESTINA VALADÉZ-MOCTEZUMA^{1,2} Y CARLOS ALBERTO NÚÑEZ-COLÍN^{2,3}

¹ Maestría en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola

² Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO

³ Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Guanajuato, 38010, México.

Correo electrónico: (vmpinto@correo.chapingo.mx); (evaladez@correo.chapingo.mx)

DIFERENCIACIÓN MOLECULAR DE LARVAS DE TRES ESPECIES DE *ANASTREPHA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN MÉXICO.

RESUMEN: Se estandarizó la técnica de RAPD para diferenciar tres especies de moscas de la fruta de importancia agronómica y económica en México en los primeros estadios larvarios utilizando la técnica de RAPDs. *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* y *A. striata* se caracterizaron y diferenciaron con 14 iniciadores de la serie C de Roth con los que se obtuvieron un total de XXX fragmentos de DNA; sin embargo, los iniciadores OPC-05 y OPC-10 mostraron mayor eficiencia porque proporcionaron el mejor comportamiento equitativo y diferenciaron con pocos fragmentos a cada especie. El iniciador OPC-05 amplificó cuatro fragmentos específicos de DNA para *A. ludens*, nueve para *A. obliqua* y 25 para *A. striata*; mientras que OPC-10 amplificó 15 fragmentos para *A. ludens*, 6 para *A. obliqua* y 15 para *A. striata*. El conjunto de datos moleculares se agruparon mediante UPGMA y después se sometieron a un análisis factorial por correspondencias simples para detectar fragmentos de DNA exclusivos por especie. De este trabajo concluimos que la técnica RAPDs puede utilizarse para estudios similares en otros miembros de la familia Tephritidae. Particularmente, los iniciadores OPC-05 y OPC-10 se recomiendan con fines de diagnóstico eficiente para la detección rápida de larvas de las tres especies de insectos consideradas..

PALABRAS CLAVE: Caracterización molecular, marcadores de DNA, electroforesis, Moscas de la fruta, PCR, RAPD's.

MOLECULAR DIFFERENTIATION IN LARVAL STAGE OF THREE *ANASTREPHA* (DIPTERA:TEPHRITIDAE) PEST SPECIES IN MEXICO.

ABSTRACT: Molecular characterization and comparison in larval stage of *Anastrepha ludens*, *A. obliqua* and *A. striata* were made using RAPD's-PCR technique. From 14 primers selected, it was statistically determined that the primers OPC-05 and OPC-10 produced the better equitable behavior displayed for the analyzed species, because them amplified more specific DNA fragments; the OPC-05 amplified four DNA fragments to *A. ludens*, nine for *A. obliqua*, 25 to *A. striata* and 21 to *D. Melanogaster* (used as reference); and OPC-10 produced 15 to *A. ludens*, 6 to *A. obliqua* and 15 to *A. striata*. These results suggesting that both primers can be used for related studies as a fast test in order to differentiate each species, mainly in larval stage that is more difficult the identification. The phenogramme obtained with statistical analysis of molecular data had relationship with an appropriate taxonomic representation of the dipterans studied.

KEY WORDS: Molecular Characterization, DNA markers, electrophoresis, fruit flies, PCR, RAPDs.

INTRODUCCIÓN

La familia Tephritidae contiene alrededor de 450 géneros y 4300 especies descritas a nivel mundial, haciéndola una de las más grandes del orden Diptera (Paul *et al.*, 2002). En México existen más de 30 especies de moscas de la fruta del género *Anastrepha*, de las cuales sólo cuatro causan los mayores problemas económicos: *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* y *A. serpentina* debido a su amplia distribución, incidencia y rango de hospedantes (Aluja, 1994a; Barrios, 1969). Las larvas en particular causan los mayores daños directos al barrenar los frutos, e indirectos al limitar la comercialización de los mismos ocasionando pérdidas millonarias, e inclusive pueden provocar la desaparición de toda una zona citrícola (Aluja, 1994).

A pesar de su importancia, las larvas de las especies de tefritidos incluyendo a las del género *Anastrepha*, no se han estudiado lo suficiente (Aluja, 1994). Selivon y Perondini (1998) mencionan que la morfología de las larvas de esta familia es muy similar entre sí, dificultando la identificación de las distintas especies, ya que las principales diferencias morfológicas se observan en el último instar. Esto representa una limitante para monitorear nuevos hospedantes y hábitats del insecto adulto, así como realizar en tiempo el control de los mismos; otro problema de mayor importancia en México, es lograr la eficiente identificación en puertos aduanales de las larvas parasitarias en cítricos y productos frutícolas, tales como guayaba, ciruelo, chicozapote y mango, entre otros, destinados a la exportación utilizando una técnica confiable y rápida, acción que evitaría su posible dispersión.

Los marcadores genéticos en la última década han favorecido un avance espectacular en la taxonomía molecular y en la diferenciación de especies e infraespecies (Reyes *et al.*, 1996; Han and McPherson, 2001). La tecnología de PCR, y particularmente los RAPD (polimorfismo de DNA amplificado al azar) han sido ampliamente utilizados para dichos propósitos en una gama

de especies (Williams *et al.*, 1990; Valadez *et al.*, 2001). A diferencia de otras técnicas de PCR, los RAPD se han utilizado por su relativa facilidad de implementación, ya que requieren poco DNA, no se requiere conocer secuencias del genoma a analizar, son análisis que requieren poco tiempo de laboratorio y permiten comparar y diferenciar individuos, poblaciones o especies simultáneamente (Luna, *et al.*, 2004; Silva-Rojas *et al.*, 2005).

En especies de *Anastrepha* la técnica RAPD-PCR ha sido usada por diferentes investigadores como Basso *et al.*, (2003) quienes analizaron polimorfismos de DNA de varias poblaciones sudamericanas de *A. fraterculus*, encontrando que los fragmentos aislados del RAPD-PCR, junto con el análisis de cariotipos, evidenciaron que todas las poblaciones estudiadas pertenecen a una sola especie. Específicamente con larvas de *Anastrepha*, Shi y Lawrence (1999) emplearon el RAPD-PCR para determinar marcadores del ADN de una línea de células embrionarias de *A. suspensa* susceptibles a la infección por un entomopoxivirus que es inyectado al hemocelo de las larvas cuando son parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata*.

Dada la necesidad de identificar de forma rápida e inequívoca a larvas de insectos que parasitan cultivos y productos frutícolas de interés económico, el propósito del presente trabajo fue estandarizar un protocolo basado en RAPDs para diferenciar de forma eficiente a larvas de tres especies de *Anastrepha* de importancia económica en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Larvas vivas de tercer instar de las tres especies de *Anastrepha*: *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. striata* fueron obtenidas de los laboratorios de cría del Programa MOSCAFRUT en Metapa de Domínguez, Chiapas y transportadas al laboratorio para los análisis respectivos; como grupo de referencia se incluyó a *Drosophila melanogaster*. Las larvas (5 a 6) se lavaron y desinfectaron en alcohol 70%, posteriormente se maceraron con nitrógeno líquido.

El DNA se extrajo con el protocolo de Sambrook *et al.* (1989), con algunas modificaciones, que consistieron en la adición de una mayor cantidad de RNasa (10,000 µg/mL) y un proceso de doble fenolización. Después de su purificación, el DNA se diluyó en 50 µL de agua bidestilada, se cuantificó y se estimó su calidad en gel de agarosa 0.8% con amortiguador TAE 1X.

PCR

La tipificación de los genomas de las 4 especies de moscas de la fruta consideradas en el estudio se realizaron con la técnica de RAPDs seleccionando 14 iniciadores de secuencia aleatoria de la serie C (Carl Roth GMBH, Co.): OPC-01, OPC-02, OPC-03, OPC-04, OPC-05, OPC-06, OPC-08, OPC-09, OPC-10, OPC-11, OPC-12, OPC-13, OPC-14, OPC-15 y OPC-16.

Para las reacciones de PCR se utilizó un termociclador (Applied Biosystems, modelo 9700) programado de la siguiente manera: un ciclo a 94 °C por 60 segundos para pre desnaturalización; 35 ciclos (94 °C por 30 segundos; 40 °C a 30 segundos y 72 °C por 90 segundos) y posteriormente un ciclo de extensión final de 72 °C por 2.5 minutos.

Los productos de PCR, se separaron en geles de acrilamida 8 % utilizando 230 volts en amortiguador TBE 1X; para la visualización de los perfiles de DNA, los geles se tiñeron con nitrato de plata 0.2 %, se fotodocumentaron y se analizaron los pesos moleculares de cada fragmento de DNA con el programa Kodak Digital Science 1D V.2.0.3; como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas). Con los pesos moleculares se realizó una matriz binomial en donde el valor 1 (uno) correspondió a la presencia de un fragmento particular y el valor 0 (cero) a la ausencia del mismo.

Análisis estadístico

Con la matriz binomial se realizó inicialmente un análisis de agrupación (análisis cluster) mediante el índice de similitud de Jaccard y el método de

aglomeración UPGMA (media no ponderada), con la finalidad de corroborar la congruencia taxonómica (Sokal y Sneath, 1963); posteriormente los datos se sometieron a un análisis factorial por correspondencias simples. Debido a la distribución binomial de los datos, este tipo de análisis permite corroborar la agrupación y además simplifica, reduciendo la dimensionalidad, la forma de observar la variabilidad existente en las variables, por lo que se pueden asociar mediante los vectores característicos (eigenvectors) a las bandas de DNA (variables) con las especies de moscas (individuos) (Johnson, 1998); todos los análisis fueron realizados con NTSYSpc ver 2.2 (Rohlf, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de DNA

Para la extracción y purificación del DNA de las larvas de los insectos, fue necesario realizar pequeñas modificaciones al protocolo de extracción (Sambrook *et al.* 1989), pero muy significativas para nuestro caso, que consistieron en fenolizar al menos dos veces las muestras y utilizar mayor cantidad de RNasa dada la abundancia de RNA presente en las mismas, lo que evidenció el activo metabolismo en el estado larvario de los insectos. Por otro lado, es importante subrayar que el DNA que nos funcionó para la amplificación con PCR se obtuvo de larvas vivas; ya que inicialmente se había procesado de larvas muertas proporcionadas por los laboratorios referidos por motivos de seguridad, pero sin lograr un resultado eficiente, ya que el DNA procesado bajo esas últimas condiciones siempre mostró degradación, posiblemente debido a la rápida actividad de nucleasas.

Productos de RAPD-PCR.

En las figuras 1 a 4 se muestran los perfiles RAPDs obtenidos con cada iniciador en las cuatro especies de insectos consideradas en el estudio. Todos los perfiles mostraron bandas bien definidas, algunas de ellas se apreciaron con mayor grosor e inten-

Diferenciación molecular de larvas de tres especies de *anastrepha*

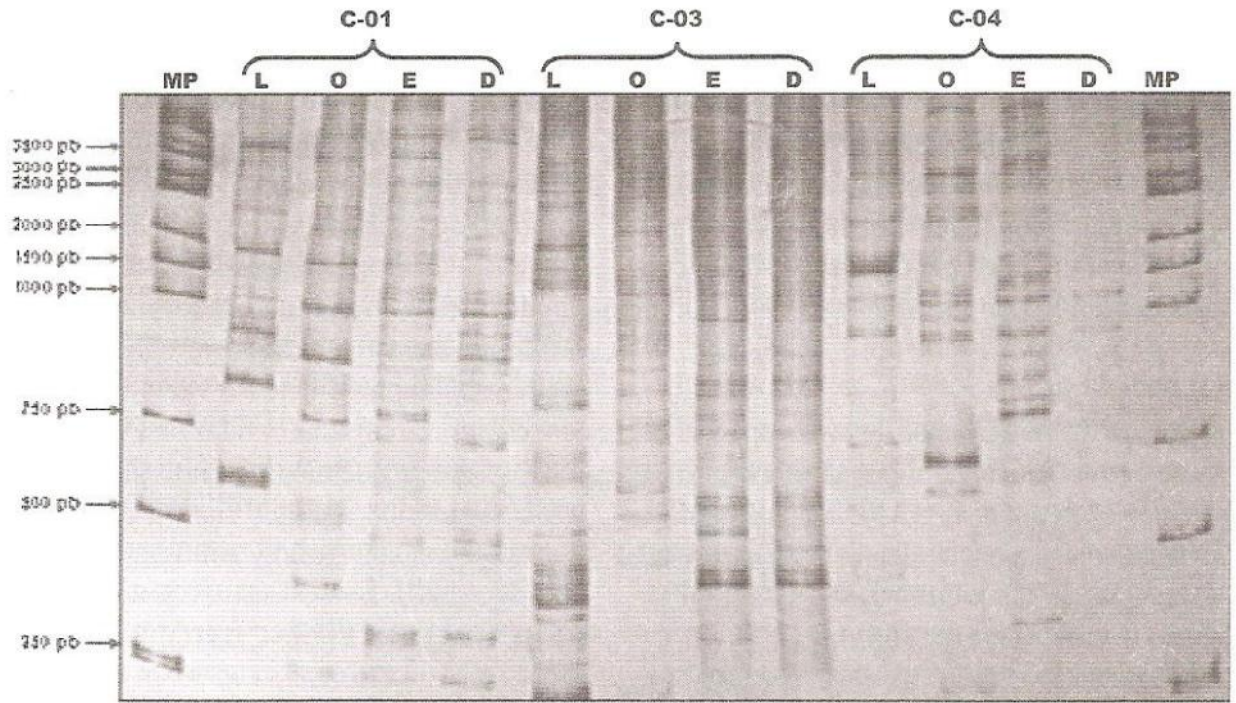


FIGURA 1. Productos amplificados de RAPD-PCR de larvas de moscas de la fruta del genero *Anastrepha* spp y *D. melanogaster*, obtenidos con los iniciadores ROTH C-01, ROTH C-03 y ROTH C-04.

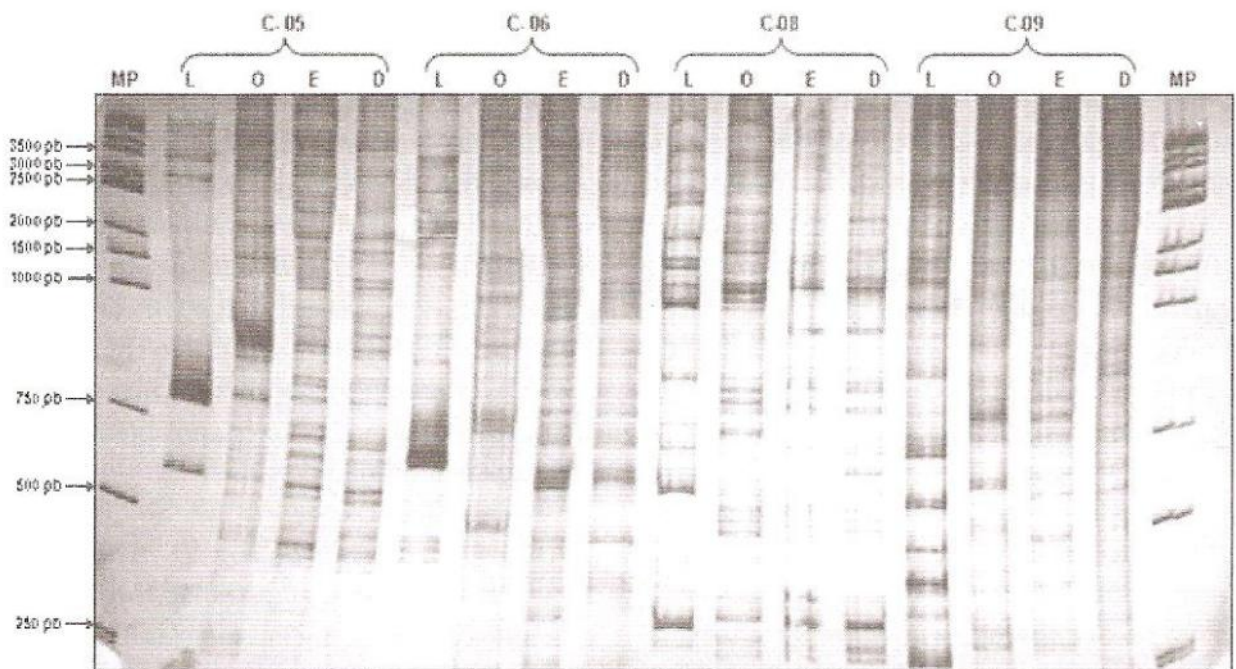


FIGURA 2. Productos amplificados de RAPD-PCR de larvas de moscas de la fruta del genero *Anastrepha* spp y *D. melanogaster*, obtenidos con los iniciadores ROTH C-05, ROTH C-06, ROTH C-08 y ROTH C-09.

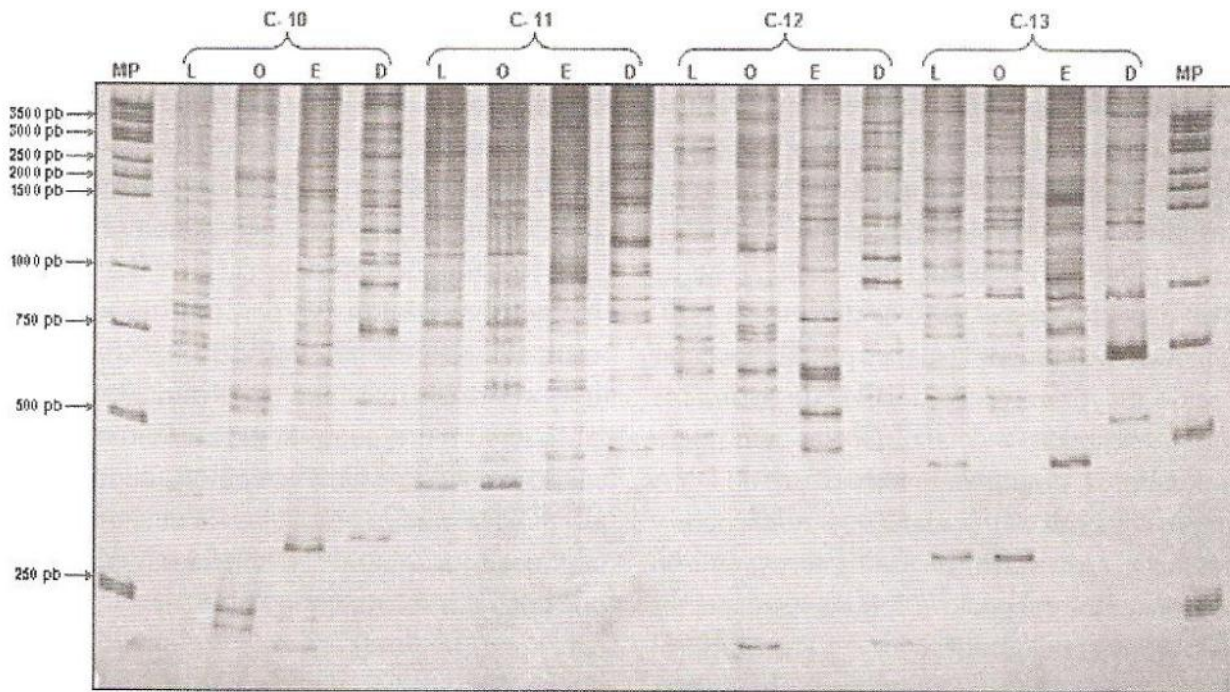


FIGURA 3. Productos amplificados de RAPD-PCR de larvas de moscas de la fruta del genero *Anastrepha* spp y *D. melanogaster*, obtenidos con los iniciadores ROTH C-10, ROTH C-11, ROTH C-12 y ROTH C-13.

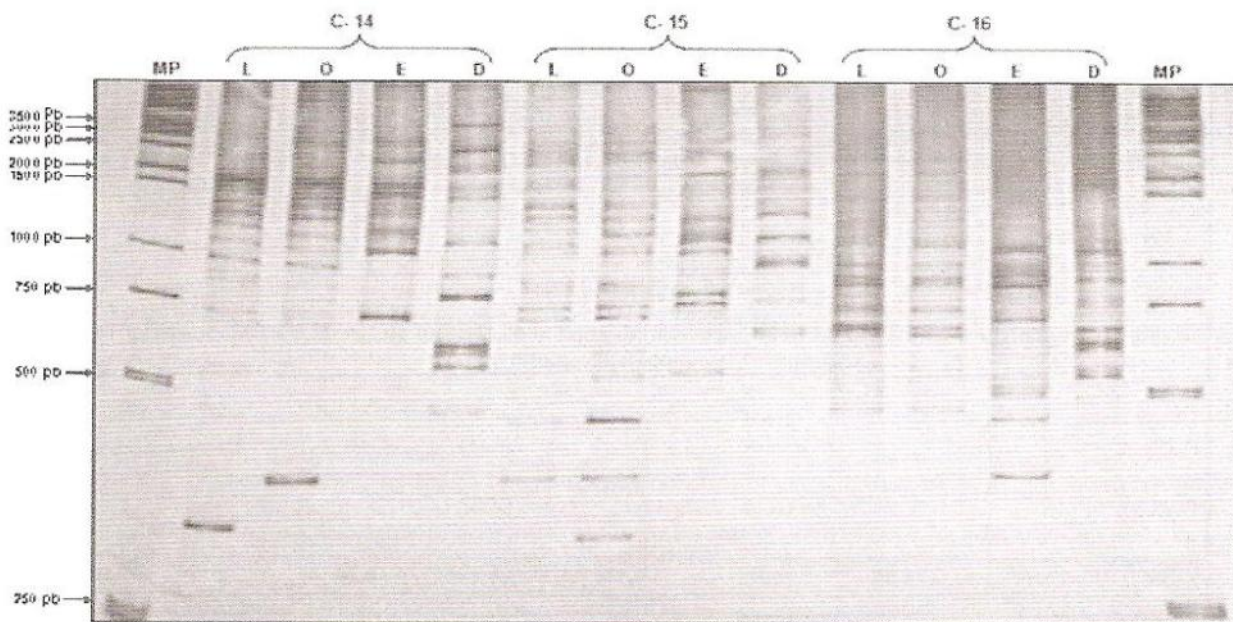


FIGURA 4. Productos amplificados de RAPD-PCR de larvas de moscas de la fruta del genero *Anastrepha* spp y *D. melanogaster*, obtenidos con los iniciadores ROTH C-14, ROTH C-15 y ROTH C-16.

sidad, lo que puede deberse a grupos de ampli-ficaciones con pesos moleculares similares que no se resolvieron en las condiciones electroforéticas utilizadas. También se observaron bandas tenues que pueden ser el producto de ampli-ficaciones con mínima homología entre el iniciador y el DNA. Con nuestros análisis, es evidente la diferenciación de las cuatro especies de las moscas de la fruta estudiadas; incluso de manera visual es posible apreciar un parecido mayor entre los perfiles de *A. ludens* y *A. obliqua* respecto a *A. striata* con cualquiera de los iniciadores; obviamente los perfiles de DNA de *D. melanogaster* utilizada como referencia y que pertenece a otra familia de dípteros, fueron muy contrastantes respecto a los de las especies de *Anastrepha* consideradas. Reyes *et al.*, (1996) y Callejas *et al.*, (1998) emplearon esta misma técnica en otros Tefrítidos; incluso, lograron la diferenciación de sus especies de interés utilizando también la serie C de iniciadores aleatorios; sus

resultados aunados a los nuestros, pueden sugerir que la caracterización y diferenciación de este tipo de insectos se puede resolver mediante RAPDs sin mayor problema, y con los iniciadores de la serie C. Es importante subrayar que la eficiencia de los RAPDs en nuestro trabajo también se debió a tres aspectos importantes: la calidad del DNA finalmente obtenido, la temperatura de alineamiento utilizada (40 °C en lugar de 35-37°C), lo que hace más reproducibles las ampli-ficaciones de PCR porque se incrementa la especificidad de los iniciadores, y finalmente el análisis de los productos de PCR separados en geles de acrilamida, lo que nos permitió obtener y considerar hasta 3 veces más datos informativos.

Análisis de agrupación

Los agrupamientos conformados con el análisis de los pesos moleculares se muestran en el Fenograma de la Figura 5, donde *Drosophila melanogaster*

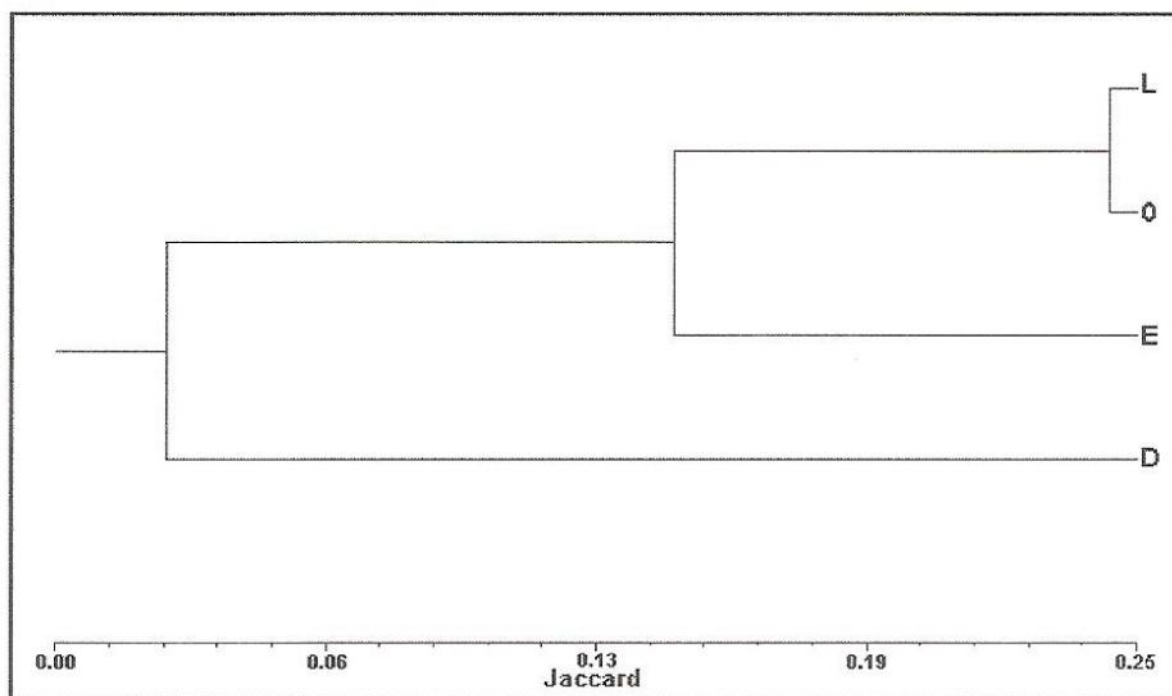


FIGURA 5. Fenograma de larvas del Género *Anastrepha* y *D. melanogaster* analizadas con 14 iniciadores RAPD, agrupados con el coeficiente de similitud de Jaccard y el método de conglomeración UPGMA.

(Drosophilidae) se separó claramente de las tres especies de *Anastrepha* (Tephritidae), y a su vez, *A. striata* (S) también se separó de *A. ludens* (L) y de *A. oblicua* (O). Esta separación es congruente con la clasificación actual de los dípteros estudiados hecha por Norrbom *et al.* (2001) y Hernández-Ortiz (1992) quienes en base a características morfológicas ubican a *A. striata* dentro del grupo Striata y a *A. ludens* y *A. oblicua* dentro del grupo Fraterculus. Esta propuesta de agrupamiento fue confirmada también posteriormente por McPheron *et al.* (2001) quienes demostraron que estas especies pertenecen a grupos diferentes al comparar las secuencias del gen 16S rDNA en 40 representantes de *Anastrepha*. A través de nuestros datos, además de corroborar la separación de las especies, también fue posible apreciar las diferencias genómicas entre las especies, ya que *A. ludens* y *A. oblicua* se agruparon

con un coeficiente de similitud apenas por arriba de 0.24; lo que señala que aún cuando son especies relativamente emparentadas, mantienen sus diferencias. También en el fenograma se aprecia que *A. striata* se asocia con un coeficiente de similitud menor (0.14), mientras que *D. melanogaster* se separa más ampliamente y solo se asocia a las tres especies de *Anastrepha* con un coeficiente cercano 0.04.

Análisis Factorial por Correspondencias simple

Los resultados del análisis factorial por correspondencias simple se presentan en los cuadros 1 y 2, donde se indican los valores y vectores propios para los componentes principales. En el cuadro 1 se observa que es representado el 100 % de variabilidad en los tres primeros componentes

Cuadro 1

Valores propios de larvas de moscas de la fruta del género *Anastrepha* y *D. melanogaster* producto del análisis factorial por correspondencia simple.

Componente Principal	Valor propio	% de varianza explicada	% de varianza acumulada
1	0.9040	44.01	44.01
2	0.6411	31.21	75.22
3	0.5090	24.78	100.00

Cuadro 2

Vectores propios asociados a larvas de moscas de la fruta del género *Anastrepha* y *D. melanogaster* producto del análisis factorial por correspondencia simple.

Accesiones	C1	C2	C3
L	0.5470	0.6873	0.9593
O	0.5137	0.5229	-0.9931
E	0.3060	-1.2468	0.0804
D	-1.9874	0.1705	0.0076

Cuadro 3

Número de vectores propios asociados a cada de iniciador Roth (Operon) de la serie C utilizados en la diferenciación de las larvas del Género *Anastrepha* spp y *D. melanogaster*.

Iniciador	Bandas asociadas				Total
	L	O	E	D	
C01	4	2	3	10	19
C03	7	10	1	1	19
C04	5	5	7	4	21
C05	4	9	25	21	59
C06	9	6	19	15	49
C07	8	18	7	14	47
C09	12	9	3	6	30
C10	15	6	15	9	45
C11	5	5	13	10	33
C12	1	10	13	11	35
C13	6	13	6	9	34
C14	8	8	7	12	35
C15	8	7	6	10	31
C16	5	3	19	11	29

principales, explicando 44.0 % de variabilidad el primer componente, 31.0 % el segundo y 25.0 % el tercero.

El cuadro 3 muestra el total de los vectores propios asociados a las bandas de DNA, y se marcan las relacionadas a las especies de *Anastrepha*. En estos vectores se pueden agrupar bandas específicas que son capaces de diferenciar entre cada una de las especies en estudio; es decir, que con cada uno de los iniciadores C01, C03, ..., C16 utilizados se obtuvieron bandas específicas de DNA para las diferentes especies de *Anastrepha*, e inclusive bandas específicas (exclusivas) para *Drosophila*; sin embargo, como se puede observar, para cada iniciador existió un número diferente de bandas específicas capaces de discriminar entre especies, pero no es posible establecer cual es el mejor iniciador sino que es recomendable utilizar dos o tres de ellos debido a que mientras mayor sea el número de datos utilizados para discriminar, los resultados

serán más cercanos a la realidad al momento de emitir conclusiones. Estos iniciadores pueden ser C05, C06, C07, C10, C13, C14 y C15 por el número de bandas exclusivas que generaron por especie y que son bandas capaces de discriminar entre las tres especies de *Anastrepha* estudiadas.

En la Figura 6 se muestra una representación tridimensional de las cuatro especies de moscas estudiadas, producto de la información del análisis factorial por correspondencias simple, que resultó de gran utilidad al permitir crear nuevas variables que redujeron la dimensionalidad; en otras palabras, en la información resultante del análisis se puede observar que en la representación tridimensional de los organismos estudiados (L, O, E, D) existe el 100 % de la variabilidad de los datos (las bandas de DNA en este caso) en solo tres componentes factoriales o principales; el primer componente factorial o principal explica un 44% de la variabilidad total y diferencia a los géneros de

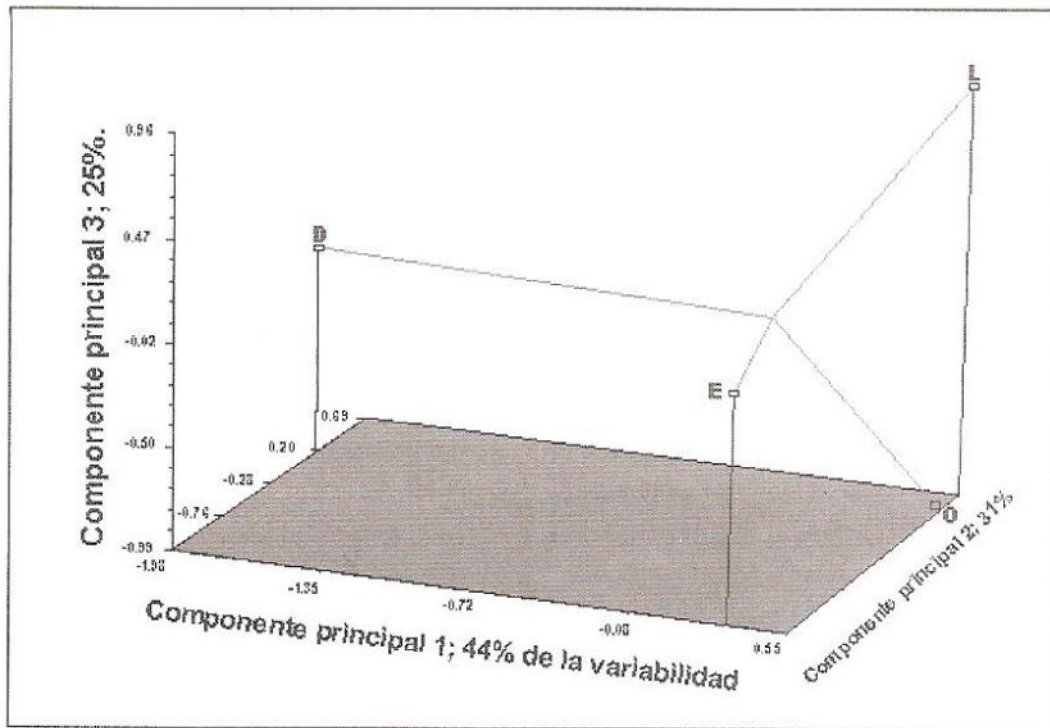


FIGURA 6. Representación tridimensional de los vectores propios para las bandas asociadas con exclusividad a larvas de cada especie del género *Anastrepha* y *D. melanogaster*, producto del análisis factorial por correspondencia simple.

las larvas estudiadas, mientras que el componente 2 que explica el 31 % de la variabilidad, permite separar las especies de las larvas de cada género en los grupos obtenidos por Hernández-Ortiz (1992), S las del grupo *Striata*; L y O dentro del grupo *Fraterculus*, y finalmente el componente 3, que explica un 25%, e indica la separación de las tres especies de *Anastrepha* en el género pero también indica la relación entre ellas.

En la gráfica de la Figura 7, se aprecia un conjunto de vectores propios o líneas para las bandas de DNA obtenidas con los distintos iniciadores que están asociadas exclusivamente a cada especie (*A. ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* y *D. melanogaster*). Solamente se eligieron a los iniciadores C-04, C-05, C-06, C-08, C-09, C-10 y C13 como los más adecuados para asociar identificar a las diferentes especies, pero para una prueba rápida los mejores iniciadores son C-10 y C-05. El iniciador C-05

generó 4 bandas específicas para *A. ludens*, 9 para *A. obliqua* y 25 para *A. striata* y el iniciador C-10 generó 15 bandas específicas para *A. ludens*, 6 para *A. obliqua* y 15 para *A. striata* (Cuadro 13).

Dada la amplitud e importancia de la familia Tephritidae, es necesario complementar con herramientas moleculares los estudios orientados a identificación de especies y taxonomía; ya que muchas subfamilias y tribus están pobremente clasificadas por caracteres morfológicos, y las relaciones entre muchos taxa aún no se definen claramente (McPherson *et al.*, 2001). La historia evolutiva del género *Anastrepha* que se ha considerado como un importante taxón debido a los efectos económicos de muchas de sus especies, ya muestra algunos acercamientos al respecto; solo por citar algunos, Berlocher (1980) diferenció *Rhagoletis pomonella* y *R. indifferens* con la enzima isotrato de hidrogenasa, Han y McPherson (2001) infirieron

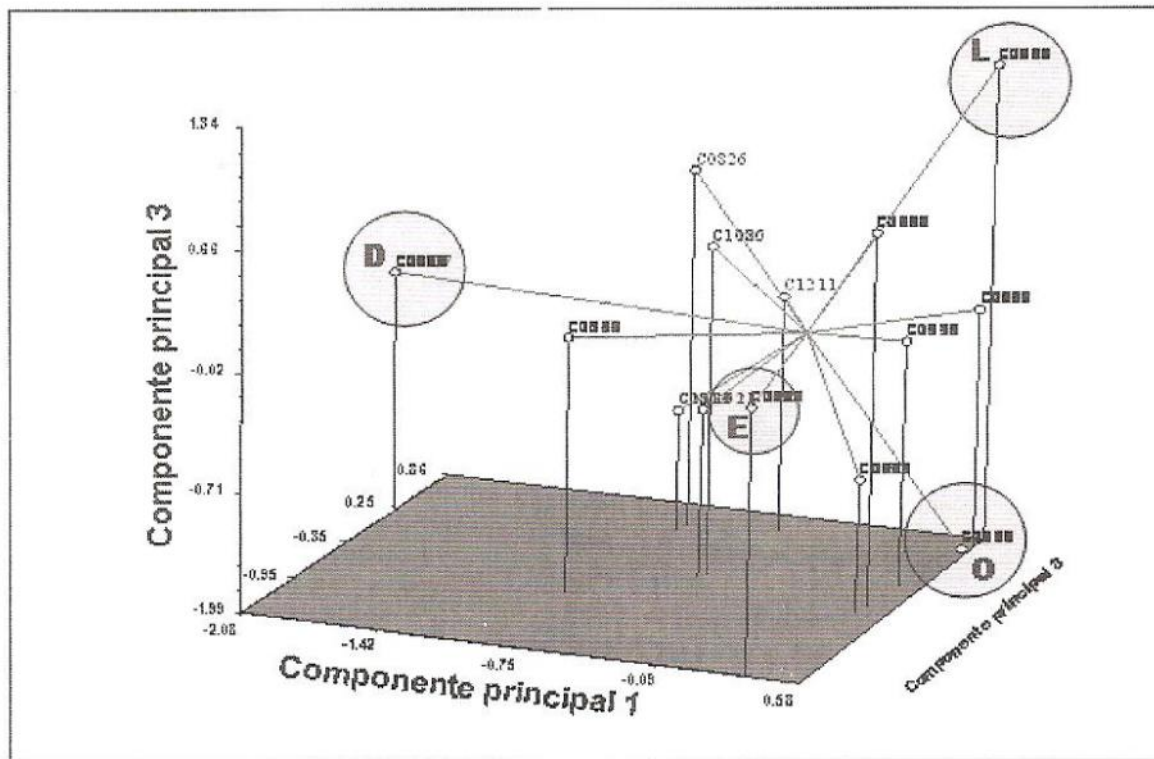


FIGURA 7. Representación tridimensional del conjunto vectores propios para las bandas asociadas a cada larva analizada, producto del análisis factorial por correspondencia simple.

la filogenia basada en secuencias del gen 16S rDNA y comprobaron la clasificación a nivel de género de la familia tephritidae; mientras que Paúl *et al.*, (2002) consideraron secuencias parciales de los genes 12S rDNA y CO2KD para sugerir linajes monofiléticos, particularmente en la subfamilia Trypetinae. Estos estudios, así como muchos otros (Callejas, *et al*, 1988; Reyes *et al*, 1966) muestran las ventajas de la utilización de las herramientas moleculares con fines de avanzar de manera rápida y eficiente en la caracterización y diferenciación de este grupo de insectos.

CONCLUSIONES

La técnica RAPD es una herramienta molecular altamente confiable para diferenciar especies del género *Anastrepha* a nivel larvario. Fue posible diferenciar a las especies *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua* y *Anastrepha striata* con

cualquiera de los iniciadores OPC-01, OPC-02, OPC-03, OPC-04, OPC-05, OPC-06, OPC-08, OPC-09, OPC-10, OPC-11, OPC-12, OPC-13, OPC-14, OPC-15 y OPC-16 de Roth. Del conjunto de iniciadores utilizados para la caracterización de las tres especies de moscas de la fruta, los iniciadores C-05 y C-10 resultaron más adecuados para lograr su diferenciación, por lo que podrían utilizarse como complemento a la identificación morfológica en estado larvario de estos insectos plaga. La agrupación de las tres especies en estudio mediante los polimorfismos de fragmentos aleatorios de DNA fue congruente con la clasificación taxonómica actual de los tefritidos. La información obtenida del análisis factorial por correspondencia simple de los datos moleculares, demostró que la técnica RAPD es una herramienta altamente confiable para diferenciar especies del género *Anastrepha* a nivel larvario con base a fragmentos exclusivos de DNA

que se asociaron a las tres especies y que puedan utilizarse para diagnósticos rápidos mediante la tecnología de PCR. Es necesario realizar otros trabajos similares para diferenciar molecularmente larvas de otras especies comunes de *Anastrepha* en México, particularmente de *A. fraterculus* y *A. serpentina*.

LITERATURA CITADA.

- ALUJA, S. M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology* 39: 155-178.
- ALUJA, S. M. 1994a. *Manejo integrado de la mosca de la fruta*. Editorial Trillas, México. 251 pp.
- BARRIOS, R. A. 1969. Observaciones sobre efectos de radiaciones gamma de Co 60 en la mosca mexicana de la fruta. *Fitófilo* 63-64:3-28.
- BASSO, A., A. SONVICO, L. QUESADA-ALLUE Y F. MANSO. 2003. Karyotypic and molecular identification of laboratory of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera:Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 96(4): 1237-1244
- BERLOCHER, S. H. 1980. An electrophoretic key for distinguishing species of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) as larvae, pupae, or adults. *Annals of the Entomological Society of America* 73(2): 131-137.
- CALLEJAS, C., P. RODA, A. REYES Y M. D. OCHANDO. 1998. Identificación genética de *Dacus*-*Bactrocera*-*oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) mediante marcadores RAPD-PCR. *Bol. San. Veg. Plagas*. 24: 873-882.
- FLETCHER, B. S. 1987. The biology of dacine fruit flies. *Annual Review of Entomology*, 32:115-144.
- HANCOCK, D. L. 1986. Classification of the Trypetinae (Diptera: Tephritidae), with a discussion of the Afrotropical fauna. *Journal of Entomological Society South African* 49: 275-305.
- HAN H. Y. AND B. MCPHERON A. 2001. Nucleotide sequence data as a tool to test phylogenetic relationships among higher groups of Tephritidae: A case study using Mitochondrial Ribosomal DNA. pp. 115-134. In: Aluja S. M. and Norrbom A. L. (Eds.). *Fruits flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. Editorial CRC Boca Raton, London New York Washington D.C. pp. 963.
- HEADRICK, D. H., AND GOEDEN R. D. 1998. The Biology of nonfrugivorous tephritid fruit flies. *Annual Review of Entomology* 43:217-241.
- JOHNSON, D. E. 1998. *Métodos multivariados aplicados al análisis de datos*. Editorial Thomson. México. pp 566.
- LUNA-PAEZ, A., H. SILVA-ROJAS, N. MARBÁN-MENDOZA Y E. VALADEZ-MOCTEZUMA. 2004. Variabilidad Genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. F. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato Mediante PCR-RAPDs en el Bajío, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(1), 44-51 pp.
- MCPHERON, B. C., HAN, H., SILVA G. JANISETE AND NORRBOM L. A. 2001. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rRNA mitochondrial DNA sequences. pp. 343-362. In: Aluja S. M. and Norrbom A. L. (Eds.). *Fruits flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. Editorial CRC Boca Raton, London, New York, Washington D.C.
- NORRBOM, A. L., ZUCCHI, R. A. AND HERNANDEZ-ORTIZ, V. 2001. Phylogeny of the genera *Anastrepha* y *Toxotrypana* (Trypetinae:Toxotrypanini) based in Morphology. pp 299-342. In: Aluja S. M. and Norrbom A. L. (Eds.). *Fruits flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. Editorial CRC Boca Raton, London, New York, Washington D.C.
- PAUL, T. S., MCPHERON, B.A. AND KAMBHAMPATI, S. 2002. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA supports the monophyly of Dacini fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America* 95(6): 658-664.
- PROKOPY, R. J. 1980. Mating behavior in frugivorous Tephritidae in nature. pp. 37-45. In: Koyama, J. (Ed.), *Proceedings of a symposium on fruit fly problems*. 16th International Congress of Entomology, Kyoto, Japan.
- REYES, A., C. CALLEJAS, P. RODA Y M. D. OCHANDO. 1996. Caracterización genética en *Ceratitidis capitata* asociada a fruto hospedador. II. Análisis mediante RAPD-PCR. *Bol. San. Veg. Plagas*, 22: 361-371.
- ROHLF, F. J. 200. *NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.10, User Guide*, Exeter software, Applied Biostatistic., New York, USA. 38pp.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd. Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- SELIVON, D. AND PERONDINI P. A. 1998. Eggshell morphology in two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America*. 91 (4):473-478.
- SHI, X. Y P. O. LAWRENCE. 1999. An embryonic cell line from the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *In Vitro Cell Dev. Biol-Animal* 35:12-14
- SILVA-ROJAS H., E. VALADEZ-MOCTEZUMA, M. WARBURTON, L. DÍAZ-HUERTA, L. ZELAYA-MOLINA, L. FUCIKOVSKY-ZAK. 2005. Polyphasic characterization of a new fluorescent *Pseudomonas* causing leaf spots in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology* 95 (6):S97.
- SOKAL, R. R. AND SNEATH, P. H. A. 1963. *Principles of numerical taxonomy*. Ed. Freeman, San Francisco, USA. 359 pp.
- VALADEZ-MOCTEZUMA E., G. KAHL, J. RAMSER, B. HÜTTEL Y A. RUBLUO-ISLAS. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Rev. Fitotec. Mex.* 24 (1): 103-120 .