

ESTUDIO ELECTROFORÉTICO EN DOS ESPECIES SIMPATRICAS Y SINTOPICAS DEL GENERO *PROCALUS* CLARK, 1865 (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)

XIMENA CORTÉS¹, VIVIANE R. JEREZ² Y RICARDO GALLEGUILLOS¹

RESUMEN

Mediante la técnica electroforética, se examinó la variación enzimática que presentan insectos de dos especies de crisomélidos, *Procalus mutans* Blanchard, (1851) y *P. reduplicatus* Bechyné, 1951 que en forma simultánea son simpátricas en la zona de Hualpén, (36° 47' lat. S), Concepción, Chile y sintópicas sobre *Lithrea caustica* (litre).

Sobre un total de 300 individuos se ensayaron 16 sistemas enzimáticos, de los que sólo 8 presentaron actividad: isocitrato deshidrogenasa (Idh), malato deshidrogenasa (Mdh), glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (6 Pgdh), aspartato aminotrasferasa (Aat), leucín aminopeptidasa (Lap), fosfoglucoisomerasa (Pgi), fosfoglucomutasa (Pgm) y esterasa-D (Est-d).

Se examinaron 11 loci enzimáticos, de los cuales uno es polimórfico para la enzima Lap-1. Seis loci diagnóstico permiten separar genéticamente las especies estudiadas.

La estimación del coeficiente de identidad de Nei (1972), $I = 0.44$ sumado a lo anterior, indicaría que *P. mutans* y *P. reduplicatus* son especies genéticamente distantes y por lo tanto biológica y taxonómicamente válidas.

ABSTRACT

The isozyme variation in two species of insects, originally identified as *Procalus mutans* (Blanchard, 1851) and *P. reduplicatus*, Bechyné, 1951 using gel electrophoresis techniques, was used.

This species are sympatric in the Hualpén area, Concepción, Chile (36° 47' lat S), and syntopic on *Lithrea caustica*. Over a total of 300 specimens, sixteen enzymatic system were surveyed, in which only eight were successfully tested: isocitrate dehydrogenase (Idh), malate dehydrogenase (Mdh), glucose 6-phosphate dehydrogenase (6-Pgdh), aspartate aminotransferase (Aat), leucin aminopeptidase (Lap), phosphoglucose isomerase (Pgi), phosphoglucomutase (Pgm), esterase-D (Est-d).

Eleven enzyme loci including one loci polymorphic for the enzyme Lap-1 were studied. The results demonstrated the presence of six diagnostic loci, by which the two species can be separated genetically.

Nei's (1972) genetic identity coefficient was 0,44 ($I = 0,44$) in addition to explained above, should indicate that these two morphos co-exist in sympatry, share *L. caustica* as host plant and belong to biological and taxonomic species.

INTRODUCCION

La aplicación de técnicas electroforéticas para resolver problemas biosistemáticos ha permitido determinar el estatus taxonómico de especies que son difíciles de distinguir por caracteres

morfológicos de tipo somático (Avisé, 1974; Buth, 1984).

Por otra parte, además de ser una herramienta útil para estimar el grado de divergencia genética entre especies (Hagen y Scriber, 1991), es posible detectar presencia o ausencia de híbridos entre poblaciones de especies simpátricas congénicas, lo que conlleva al reconocimiento de procesos de especiación parcial o total en taxa cercanamente emparentados (Hond *et al.*, 1989).

El género *Procalus* Clark (1865) comprende un pequeño grupo de especies de insectos, distribuidas entre los 31° 55' S y 36° 47' S, que están

¹Depto. de Biología Marina, Facultad de Ciencias, U. Católica de la Santísima Concepción, Prat 88, Talcahuano - Chile. (Trabajo financiado por Laboratorio de Genética).

²Depto. Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas y Rec. Nat., U. de Concepción, Casilla 2407, Concepción-Chile. (Proyecto N° 92.38.07 DIUC, Universidad de Concepción).

(Recibido: 4 de agosto de 1992. Aceptado: 29 de octubre de 1992)

especializadas tróficamente en especies vegetales de la familia Anacardiaceae (Jerez, 1985, 1988, 1992), propias de comunidades esclerófilas de la zona central de Chile.

En la península de Hualpén, VIII Región de Chile (36° 47' S y 73° 10' W), predomina *Lithrea caustica* (litre), planta hospedadora de dos especies de insectos que por sus características cromáticas han sido determinadas en una primera aproximación como *P. mutans* (Blanchard, 1851) y *P. reduplicatus* Bechyné, 1951.

Por el hecho de encontrarse en simpatría y compartir un mismo recurso trófico, se puede suponer que estamos frente a una población local de una única especie polimórfica. Este supuesto se basa en la presencia de patrones cromáticos característicos del estado adulto y a la ausencia de diferencias significativas en la morfología de la genitalia masculina y femenina ya que su estudio no ha revelado diferencias significativas que permitan suponer un aislamiento reproductivo entre ambas especies de insectos (Jerez, 1992). En caso contrario podría tratarse de dos especies que cohabitan sobre una misma planta hospedadora.

El presente trabajo tiene por objetivo caracterizar por medio de isoenzimas, estos dos morfos de insectos congénicos, simpátricos y sintópicos nominados como *P. mutans* y *P. reduplicatus*, para determinar sus niveles de diferenciación genética y contribuir a dilucidar la correcta identidad de ambos taxa.

MATERIAL Y METODO

En la zona de Hualpén durante los meses de octubre y noviembre de 1991, se recolectaron individuos de ambos sexos de *P. mutans* y *P. reduplicatus*, en "litre" (*Lithrea caustica*).

Los insectos se mantuvieron congelados a -20° C. hasta el momento de su utilización. Para cada gel se tomaron 10 individuos de cada morfo, los que se maceraron, previa extracción de los élitros y se homogeneizaron con agua destilada. Posteriormente, mediante la técnica de electroforesis horizontal en gel de almidón, se separaron las aloenzimas de diferentes loci enzimático.

En general, para el análisis electroforético y selección de antecedentes metodológicos, se tomaron como base los trabajos de Terranova y Roach (1987) y Harris y Hopkinson (1976).

En este trabajo se analizaron 16 sistemas

enzimáticos, que en su mayoría han sido detectados en diferentes órdenes de insectos como Ephemeroptera (Funk *et al.*, 1988), Homoptera (Abid *et al.*, 1989), Lepidoptera (Hagen y Scriber, 1991) y Diptera (Brust y Munstermann, 1992).

Como soluciones tampones se utilizaron Tris. HCL, pH 8; Tris. HCL, pH 7; Litio, pH 8 y Poulick. Los geles fueron hechos con almidón Conaught al 12,5% y los tiempos de corrida abarcaron de 4 y 5 horas según el sistema considerado. Después de la electroforesis, los geles se cortaron y tiñeron (de distinta manera para cada sistema enzimático); posteriormente se incubaron a 37° C durante un tiempo variable para cada sistema enzimático.

Para la designación de loci y alelos, se siguió la metodología planteada por Allendorf y Utter (1978). Los patrones de bandeo se enumeran en orden creciente de acuerdo a su movilidad anodal y se interpretan como expresiones alélicas. De este modo entregan información sobre los genotipos y en suma, pueden representar la composición genética de las poblaciones.

Los loci se consideraron polimórficos, si la frecuencia del alelo más común es igual o menor a 0,95 en cualquiera de los dos morfos o poblaciones de insectos.

Para calcular el número de individuos heterocigotos, en ambas poblaciones, los datos electroforéticos se analizaron utilizando el método de Fischer (Zar, 1984).

Para cada locus se calcularon los valores de frecuencias génicas y genotípicas para así, obtener el porcentaje de heterocigosidad. El test de Chi-cuadrado se aplicó, con el fin de determinar el estado de las poblaciones, con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para un análisis colectivo de los loci, se usó la metodología de Nei (1972) mediante la cual se obtiene un valor de distancia genética e identidad genética promedio.

RESULTADOS

Para las dos especies, de los 16 sistemas enzimáticos ensayados sólo ocho exhibieron buena resolución, los que pueden ser observados en la Tabla 1, junto con el número de loci codificados para cada enzima.

TABLA 1
P. MUTANS Y *P. REDUPLICATUS*. ISOENZIMAS CON
 MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.

Nombre de la enzima (Abreviación y número de la Comisión de Enzimas según Harris y Hopkinson, 1976)	Nº loci	Buffer
Isocitrato deshidrogenasa (Idh (1.1.1.37))	2	T.C.7.0
Malato deshidrogenasa (Mdh (1.1.1.37))	1	T.C.8.0
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (6Pgdh (1.1.1.49))	1	T.C.8.0
Aspartato aminotransferasa (Aat (2.6.1.1))	1	T.C.8.0
Leucín amino peptidasa (Lap (3.4.1.1))	3	Poulick
Fosfoglucosa isomerasa (Pgi (5.3.1.8))	1	T.C.7.0
Fosfoglucomutasa (Pgm (2.7.5.1))	1	T.C.7.0
Esterasa-D (Est-d (3.1.1.1))	1	T.C.8.0

Heterocigidad (Ho y He): La heterocigidad esperada promedio es para *P. mutans* de 0,012 mientras que para *P. reduplicatus* es de 0,029, valores muy bajos, lo que demuestra en este caso una deficiencia en la heterocigidad.

Hardy-Weinberg (X^2): A partir de las frecuencias alélicas de 11 loci (Tabla 2) y su aplicación en Hardy-Weinberg, se observa que ambas especies coexisten bajo una situación de equilibrio.

Loci diagnóstico: Se determina que de los 11 loci detectados en este estudio, 6 presentan diferencias en la distancia de migración de proteínas, por lo que se pueden considerar, como loci

diagnóstico para diferenciar electroforéticamente ambas especies.

Polimorfismo (P): El único sistema enzimático que muestra polimorfismo, corresponde a Lap-1, donde los heterocigotos aparecen con dos bandas, lo que indica la estructura monomérica de la enzima.

Identidad y Distancia: Para cada locus enzimático, se determinan valores de distancia genética (D) e identidad genética (I). Para *P. mutans* y *P. reduplicatus* se calcula una distancia genética de 0,82 y una identidad genética de 0,44.

Del total de loci, se observa que sólo uno es polimórfico para *P. mutans* y *P. reduplicatus*, y corresponde a la enzima Lap en su primer locus (Tabla 3). Para ambas especies se calcula un promedio de polimorfismo de 0,09.

DISCUSION

El análisis electroforético mostró variación isoenzimática en 6 sistemas, los que pueden considerarse como loci diagnóstico; al respecto debemos señalar que estos loci han demostrado ser una buena herramienta para verificar aislamiento reproductivo en poblaciones simpátricas de otros invertebrados, como sucede por ejemplo con especies de crustáceos del género *Liopetrolisthes* (Weber y Galleguillos, 1991).

Del cálculo de las frecuencias alélicas, cuyo rango fluctúa entre 0 a 1 se estima el grado de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg que presentan los individuos determinados como *P. mutans* y *P. reduplicatus*, concluyendo que ambas

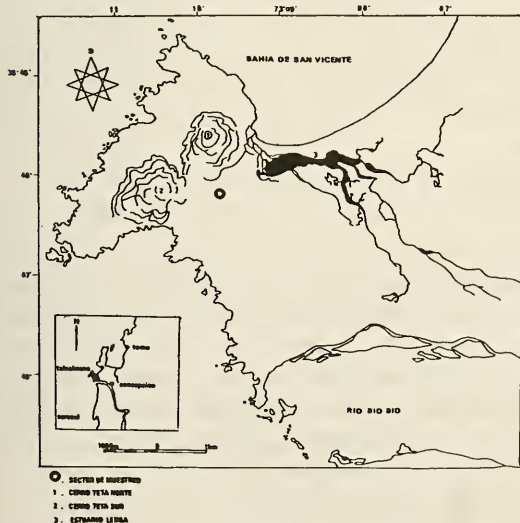


Fig. 1. Península de Hualpén. VIII Región. Chile. Sector de muestreo.

TABLA 2.
FRECUENCIAS ALÉLICAS, DISTANCIA E IDENTIDAD GENÉTICA EN 11
LOCI DE *P. MUTANS* Y *P. REDUPLICATUS*.

Locus	Variante	Frecuencia alélica		Identidad	Distancia
		<i>mutans</i>	<i>reduplicatus</i>		
Idh-1	100	1	1	1	0
Idh-2	100	0	1	0	--
	95	1	0		
Mdh-1	100	1	1	1	0
6 Pgdh-1	100	0	1	0	--
	95	1	0		
Aat-1	105	1	0	0	--
	100	0	1		
Lap-1	105	0	0,2	0,97	0,03
	100	0,93	0,8		
	95	0,07	0		
Lap-2	100	0	1	0	--
	95	1	0		
Lap-3	100	1	1	1	0
Pgi-1	100	1	1	1	0
Pgm-1	100	0	1	0	--
	95	1	0		
Est-d-1	105	1	0	0	--
	100	0	1		

especies coexisten en el sitio de estudio bajo una situación de equilibrio.

Con respecto a la identidad genética que existe entre organismos que comparten una historia evolutiva común, autores como Oxford y Rollinson (1983), Davis (1983) y Hagen y Scriber (1991), han estimado que si las poblaciones animales presentan una identidad genética que oscile entre 0.25 a 0.98, pueden ser consideradas como especies biológicamente válidas. Así por ejemplo, Bloem (1991) trabajando con dípteros del género

Aedes, considera a *Aedes varipalpus* como una especie muy alejada del resto de sus congéneres por el hecho de presentar una distancia genética de 0,52. Por otro lado, Hagen y Scriber (1991), en Lepidoptera reconocen a *Papilio glaucus* y *Papilio canadensis*, como dos especies, con un valor de identidad genética de 0,86.

En el presente estudio se determinó para *P. mutans* y *P. reduplicatus* una identidad genética de 0.44 lo que indica la existencia de 44% de genes idénticos en las dos poblaciones, y un 82% de

TABLA 3.

P. MUTANS Y *P. REDUPLICATUS*. GRADO DE POLIMORFISMO EN UN LOCUS DE LA ENZIMA LAP.

Población	Nº loci polimórfico	totales	Polimorfismo
<i>P. mutans</i>	1	11	0,09
<i>P. reduplicatus</i>	1	11	0,09
Total	1	11	x = 0,09

sustituciones alélicas por locus.

Dentro de las isoenzimas estudiadas, se observa que Lap-1 es el único locus polimórfico entre 11 loci presentes en ambas especies, por lo cual *P. mutans* y *P. reduplicatus* presentan un mismo grado de variabilidad genética con un promedio de polimorfismo igual a 0,09.

El número de individuos heterocigotos observados para la enzima Lap-1 en ambas especies es muy bajo, pese a esto son factibles cálculos que permiten asegurar que estos individuos no difieren significativamente en número entre una población y otra.

El promedio de heterocigosidad observada y esperada en ambas poblaciones, es muy pequeño e inclusive menor que el encontrado por Funk et al. (1988) para Ephemeroptera del género *Eurylophella*, donde el promedio de heterocigosidad esperada es de 0,11. En nuestro caso, lo anterior podría deberse al tamaño de las muestras analizadas las que tal vez no sean representativas de las poblaciones.

Las significativas diferencias en las frecuencias alélicas de ambas especies, el bajo valor de identidad genética, y la evidente ausencia de híbridos entre ellas, nos permite vislumbrar la existencia de una barrera al flujo génico entre ambos taxa.

Esto último es una prueba suficiente para definir la existencia de 2 especies taxonómicas y biológicamente válidas, asociadas a una misma especie de planta hospedadora.

A pesar del hecho que *P. mutans* y *P. reduplicatus* coexisten en la actualidad en una misma área geográfica y comparten el mismo recurso trófico, la extrema disimilitud genética encon-

trada entre ambas especies permite suponer que ellas no tendrían una historia evolutiva común o bien, que los mecanismos de aislamiento reproductivo han sido establecidos por factores extrínsecos a ellas.

Debemos señalar que se trabajó con individuos adultos, por lo que los resultados obtenidos consideran únicamente características imaginales y no ontogenéticas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos muy especialmente a la Srta. Marcela Astorga, por sus consejos; al Sr. Hernán Cortés y John Sanhueza por su ayuda en la recolección de muestras; al Sr. Peter Lewis por la traducción del resumen y a todos los que de una u otra forma hicieron posible el cumplimiento del presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- ABID, H.S.; S.D. KINDLER, S.G. JENSEN, et al. 1989. Isozyme characterization of sorghum aphid species and greenbug biotypes. (Homoptera: Aphidiidae). Ann. Entomol. Soc. Am., 82 (3): 303 - 306.
- ALLENDORF, F.W. & UTTER F.M. 1978. Population Genetics. In: Fish Physiology, W.S. Hoar., D.J. Randall y J.R. Brett (Eds.). Academic Press, London, 8: 407 - 454.
- AVISE, S.C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool., 23: 465 - 481.
- BECHYNÉ, J. 1951. Chrysomeloidea américains nouveaux ou peu connus. Rev. Chil. Ent., 1: 75 - 112.
- BLANCHARD, E. 1851. Fauna Chilena. Crisomélidas. In Gay, Historia Física y Política de Chile, 5: 522 - 558.
- BLOEM, S. 1991. Enzymatic variation in the Varipalpus group of *Aedes (Ochlerotatus)* (Diptera: Culicidae). An. Entomol. Soc. Am., 84 (3): 217 - 227.
- BRUST, R.A. & L. MUNSTERMAN, 1992. Morphological and genetic characterization of the *Aedes (Ochlerotatus) communis* complex (Diptera - Culicidae) in North America. Ann. Entomol. Soc. Am., 85 (1): 1 - 10.
- BUTH, D.G. 1984. The Application of Electrophoretic data in systematic studies. Ann. Rev. Ecol. Syst., 15: 501 - 22.
- CLARK, H. 1865. An Examination of the Dejeanian genus *Coelomera*. (Coleoptera - Phytophaga) and its affinities. An. Mag. Hist. 16 (3 eme séries): 256 - 268.

- DAVIS, G.M. 1983. Relative roles of molecular genetic, anatomy, morphometrics and ecology in assessing relationships among north american Unionidae (Bivalvia). In: Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance. Academic Press Inc. (London), 24: 193 - 222.
- FUNK, D.H., B.W. SWEENEY and R.L. VANNOTE. 1988. Electrophoretic studies of eastern north American *Eurylophella* (Ephemeroptera: Ephemerillidae) with the discovery of morphological cryptic species. Ann. Entomol. Soc. Am., 81 (2): 174 - 186.
- HAGEN, R. & J.M. SCRIBER, 1991. Systematic of the *Papilio glaucus* and *P. troilus* species groups (Lepidoptera: Papilionidae). Inferences from allozymes. Ann. Entomol. Soc. Am., 84 (4): 380 - 395.
- HARRIS, H. & D.A. HOPKINSON, 1976. Hand-book of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland. Publishing Co, Amsterdam.
- HOND, J.P.; M. GOYFFON; J. LALLEMAND et al. 1989. Electrophorese et Systematique. Bull. Soc. Zool. France, 114 (2): 61 - 83.
- JEREZ, V. 1985. Posición taxonómica y redescrpción de *Procalus viridis* (Philippi y Philippi, 1864). (Coleoptera - Chrysomelidae). Bol. Soc. Biol. Concepción, Chile, 56: 43 - 47.
- JEREZ, V. 1988. Ciclo de vida y biología de *Procalus viridis* (Phil y Phil 1864). (Coleoptera - Chrysomelidae). Comun. Mus. Reg. Concepción, 2: 7 - 11.
- JEREZ, V. 1992. Revisión sistemática del género *Procalus* Clark, 1865 (Chrysomelidae - Alticinae). Gayana Zool., 56(3-4): 105-121.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between population. Amer. Nat., 106: 283 - 291.
- OXFORD, G.S. AND D. ROLLINSON. 1983. Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance. Academic Press Inc. (London) L.T.D., 24: 1 - 405.
- TERRANOVA, A. & S.H. ROACH. 1987. Electrophoretic key for distinguishing South Carolina species of the genus *Phidippus* (Araneae: Salticidae) as spiderlings and adults. Ann. Entomol. Soc. Am., 80 (3): 346 - 352.
- WEBER, L. y R. GALLEGUILLOS. 1991. Morphometric and electrophoretic evidences for two species of the genus *Liopetrolisthes* (Crustacea: Decapoda: Porcellanidae) and some aspects of their variability. Com. Biochem. Physiol., 100 B (1): 201 - 207.
- ZAR, J.H. 1984. Biostatistical Analysis, Seg. Edición. Prentice-Hall, Inc. Englewood cliffs. New Jersey, USA.