

**ESTUDIOS DE TAXONOMIA MOLECULAR EN POBLACIONES
DE *TRITATOMA INFESTANS* (KLUG, 1934) Y *TRITATOMA SPINOLAI*
PORTER, 1933 (HEMIPTERA: TRIATOMINAE)¹**

**MOLECULAR TAXONOMIC STUDIES IN *TRITATOMA INFESTANS*
(KLUG, 1934) AND *TRITATOMA SPINOLAI* PORTER, 1933
POPULATIONS (HEMIPTERA: TRIATOMINAE)¹**

DANIEL FRÍAS L.² y FRANCISCA KATTAN³

ABSTRACT

The enzymatic movility differences between *Triatoma infestans* and *T. spinolai* are described in this paper. Furthermore, the differences in genetic frequencies in both species are also discussed. For each species the identity and genetic distance coefficient is calculated. The taxonomic status of these populations is too discussed.

Key words: *Triatoma infestans*, *Triatoma spinolai*, enzymatic variations, Chagas's disease, isoenzymes.

INTRODUCCION

Las especies de la subfamilia Triatominae (Reduviidae) actúan como vectores de la enfermedad de Chagas cuyo agente causal es el *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad y sus agentes vectores se distribuyen en el continente americano y algunas islas del Caribe, entre los 42° de latitud Norte y los 45° de latitud Sur. Algunas especies de triatómidos, vectores potenciales, se distribuyen también en Africa, Asia y Australia, pero el protozoo *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad no ha sido reportado (Schofield, 1985).

En Chile, la enfermedad de Chagas ha sido detectada desde la I Región (Arica, 18°30' Lat. S.) hasta la VI Región (Provincia de Colchagua, 34°36' Lat. S.). El principal vector de esta enfermedad en Chile es *Triatoma infestans*, especie predominantemente doméstica que también se distribuye en Perú, Bolivia, Paraguay, Argentina, Uruguay y Sur de Brasil. *Triatoma spinolai*, especie endémica de nuestro país, es también vector de la enfermedad de Chagas. Esta especie se distribuye entre los paralelos 18° y 34°

Sur, desde el nivel del mar en el Norte de Chile hasta 3.000 m de altura. *Triatoma spinolai* ha sido encontrada ocasionalmente en el interior de viviendas humanas pero preferentemente vive asociada a ecotopos peridomésticos y también se le encuentra en ecotopos silvestres en donde se alimenta de pequeños roedores (*Octodon degu*), conejos, chinchillas, aves marinas, lagartijas, iguanas y culebras (Gajardo, 1953; Lent y Wygodzinsky, 1979; Schofield *et al.*, 1982).

Estudios taxonómicos efectuados en *Triatoma spinolai* han revelado diferencias morfológicas entre machos alados de la IV Región y Región Metropolitana (Frías *et al.*, 1987).

En este trabajo se describen las diferencias de movilidad enzimática entre *Triatoma infestans* y *Triatoma spinolai*. Además, para cada especie se comparan los patrones enzimáticos encontrados en poblaciones alopátricas y se describen las diferencias isoenzimáticas intraespecíficas. Este estudio de taxonomía molecular es importante para poder estimar el grado de distancia y similitud genética intraespecífica en *T. infestans* y *T. spinolai*. Además, a base de las diferencias genéticas interpopulacionales en cada especie se analizan algunos de los mecanismos microevolutivos que intervienen en el proceso de especiación de estos taxones. A base de los resultados será posible definir, en cada especie, el estatus taxonómico de cada población analizada.

¹Financiado con proyecto Fondecyt 0002/88.

²Instituto de Entomología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Casilla 147, Correo Central, Santiago, Chile.

³Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.

MATERIALES Y METODOS

Los individuos analizados en *T. infestans* provienen de poblaciones de la I Región (Codpa, Arica) y IV Región (Combarbalá). En *T. spinolai* se compararon individuos provenientes de poblaciones de la IV Región (Combarbalá) y Región Metropolitana (Colina). Para cada especie se analizaron adultos (machos y hembras) y ninfas de II, III, IV y V estado. El número de individuos analizados se detalla para cada enzima y para cada especie en las tablas 1 y 2, respectivamente. En total se analizaron 12 sistemas enzimáticos que se detallan a continuación. Se indica entre paréntesis, la abreviatura de cada enzima y el número de identificación, según la Comisión de Nomenclatura Enzimática (1974). Las enzimas estudiadas son: malato deshidrogenasa (ME, 1.1.1.40); fosfoglucomutasa (PGM, 2.7.5.1); isocitrato deshidrogenasa (IDH, 1.1.1.42); hexoquinasa (HEX, 2.7.1.1); hexanol deshidrogenasa (HEXDH); alfa glicerofosfato deshidrogenasa (α GPD, 1.1.1.8); lactato deshidrogenasa (LDH, 1.1.1.27); glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G_6 PD 1.1.1.49); fosfatasa ácida (ACPH, 3.1.3.2); glucofosfatasa isomerasa (GPI, 5.3.1.9); octanol deshidrogenasa (ODH, 1.1.1.73); estearasa (EST, 3.1.1.1).

Para la preparación de los geles se utilizó un almidón de trigo Sorelab, empleándose 400 ml de tampón Tris Citrato y 48 gr de almidón. En el tampón para el gel se utilizaron: 18,42 gr de trisma base; 2,1 gr de ácido cítrico en 1.000 ml de agua destilada, dilución, 1 solución: 3 de agua destilada (PH=8,6). En el tampón electrodo se utilizaron 83,2 gr de trisma base, 32,9 gr de ácido cítrico en 1.000 ml de agua destilada, dilución 1:1 (PH=8,0).

La preparación de las muestras y las condiciones para la detección de la actividad enzimática y electroforesis fueron las mismas que las descritas por Ayala *et al.* (1972); Hueffel y Bush (1972).

Para evitar la posible contaminación enzimática proveniente de la sangre del huésped y del *Trypanosoma cruzi* en muchos individuos se eliminaron los abdómenes y se trabajó con cabezas y tórax. En otros, con fines comparativos, se utilizó el individuo entero.

Los coeficientes de identidad y distancia genética fueron calculados por el método de Nei, 1972. El tiempo evolutivo fue estimado según el

método propuesto por Nei (1975). Para estimar la variación genética se determinaron la frecuencia de loci polimórficos, el promedio de alelos por locus y la heterocigocidad promedio (\bar{H}).

RESULTADOS

En las figuras 1 y 2 se observan las movilidades relativas para cada enzima y para cada especie. Cada locus se numeró en relación a su movilidad relativa, asignando el número 1 a aquellos loci que presentaban una movilidad menor y se encontraban por lo tanto más cerca del origen. En cada especie, el número de bandas sin numerar corresponde a aloenzimas.

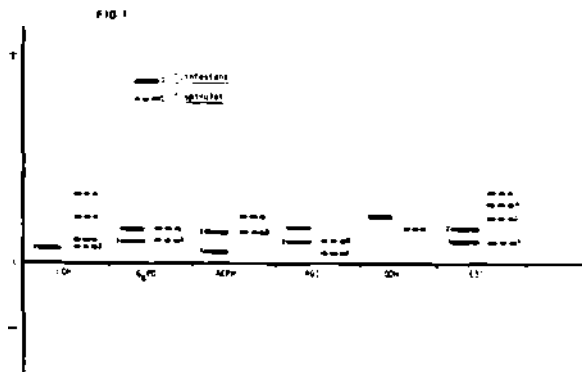


Figura 1. Movilidad enzimática relativa en poblaciones de *Triatoma infestans* y *T. spinolai*. Se comparan las siguientes enzimas: LDH, G_6 PD, ACPH, GPI, ODH, EST.

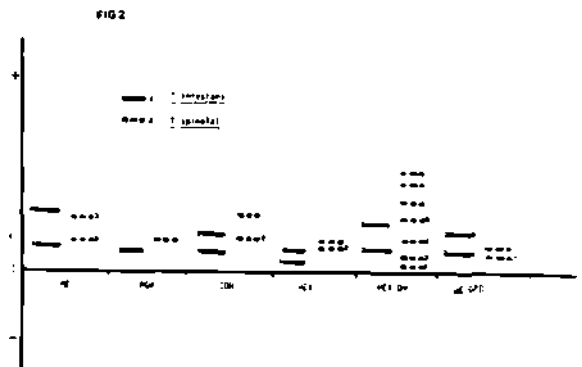


Figura 2. Movilidad enzimática relativa en poblaciones de *Triatoma infestans* y *T. spinolai*. Se comparan las siguientes enzimas: ME, PGM, IDH, HEX, HEXDH, α GPD.

En la tabla 1 se indican las movilidades relativas de cada enzima y frecuencias génicas correspondientes a los diferentes sistemas enzimáticos estudiados en poblaciones de la IV y I Región en *T. infestans*. En ME, IDH, HEXDH, α GPD, ACPH y EST, se detectaron isoenzimas codificadas por diferentes loci. ME₁, en ambas poblaciones, es una isoenzima que no aparece en todos los individuos analizados, ambas poblaciones difieren en las frecuencias génicas. En IDH₃ y α GPD₃ se encontró una situación similar. Es importante destacar que α GPD₃ es una isoenzima que sólo se detectó en el 80% en individuos de la IV Región, sin embargo, esta isoenzima no fue encontrada en los individuos de la I Región.

En la tabla 1 se indica además, para cada enzima, las frecuencias alélicas. Estos resultados muestran que la mayoría de las enzimas son monomórficas. En sólo tres de las enzimas estudiadas, HEX₁, G₆PD₁ y GPI₂ se detectó poli-

morfismo, correspondiendo probablemente a enzimas monoméricas.

En la tabla 2 se indican las movilidades relativas de cada enzima y frecuencias génicas en dos poblaciones de *T. spinolai*. En ME, HEXDH, EST y GPI se detectaron isoenzimas codificadas por diferentes loci. De manera similar a *T. infestans*, en *T. spinolai* la enzima ME₂ no se detectó en todos los individuos. Varios de los loci estudiados son polimórficos: IDH₂, HEX₂, HEXDH₆, α GPD₁, LDH₂, G₆PD, ACPH₂, EST₄, con la excepción de LDH₂ y HEXDH₆, todas estas enzimas son monoméricas. LDH₂ es probablemente un trímero en la población de Colina ya que aparecen cuatro bandas en los heterocigotos, sin embargo, en la población de la IV Región aparecen sólo dos bandas en los heterocigotos lo que sugiere la existencia de una enzima monomérica. En HEXDH₆ es preciso realizar más estudios para definir el número de subunidades posibles. Esta isoenzima apa-

Tabla 1
MOVILIDADES RELATIVAS Y FRECUENCIAS GÉNICAS
EN *TRITOMA INFESTANS*

Locus	Alelo	Frecuencias génicas		N° Total individuos analizados
		IV Región	I Región	
ME ₁	1.00	0.250 (8)*	0.888 (9)*	17
ME ₂	1.00	1.000 (8)	1.000 (9)	17
PGM ₁	1.00	1.000 (14)	1.000 (13)	27
IDH ₁	1.00	1.000 (23)	1.000 (13)	36
IDH ₃	1.00	0.217 (23)	0.461 (13)	36
HEX ₁	1.00	0.786 (14)	0.923 (13)	27
	0.50	0.214	0.077	
HEXDH ₃	1.00	1.000 (10)	1.000 (12)	22
HEXDH ₄	1.00	1.000 (10)	1.000 (12)	22
α GPD ₂	1.00	1.000 (5)	1.000 (8)	13
α GPD ₃	1.00	0.800 (5)	— (8)	13
LDH ₁	1.00	1.000 (10)	1.000 (10)	20
G ₆ PD ₁	1.00	0.642 (7)	0.500 (3)	10
	0.71	0.358	0.500	
ACPH ₁	1.00	1.000 (7) (cepario)	No se analizó	7
ACPH ₂	1.00	1.000 (7)	No se analizó	7
GPI ₂	1.50	—	0.214 (14)	27
	1.00	1.000 (13)	0.786	
ODH ₂	1.00	1.000 (3)	1.000 (3)	6
EST ₁	1.00	1.000 (4)	1.000 (5)	9
EST ₂	1.00	1.000 (4)	1.000 (5)	9

*Se indica entre paréntesis el número de individuos para cada localidad.

Tabla 2
MOVILIDADES RELATIVAS Y FRECUENCIAS GENICAS
EN *TRITOMA SPINOLAI*

Locus	Alelo	Frecuencias génicas		N° total de individuos analizados
		IV Región	Colina*	
ME ₂	1.00	0.750 (4)*	0.608 (23)*	27
ME ₃	1.00	1.000 (4)	1.000 (23)	27
PGM ₂	1.00	1.000 (25)	1.000 (16)	41
IDH ₂	1.00	0.973 (18)	0.976 (21)	39
	2.00	0.027	0.024	
HEX ₂	1.00	0.730 (13)	0.833 (9)	22
	0.92	0.270	0.167	
HEXDH ₁	1.00	1.000 (6)	1.000 (9)	15
HEXDH ₂	1.00	1.000 (6)	1.000 (9)	15
HEXDH ₄	1.00	1.000 (16)	1.000 (21)	37
	0.72	0.100	—	
	0.91	0.300 (6)	—	
	1.00	0.500	—	
HEXDH ₆	1.15	0.100	—	6
	1.00	0.500	—	
	1.15	0.100	—	
αGPD ₁	0.80	0.137 (11)	0.482 (28)	39
	1.00	0.863	0.518	
LDH ₂	1.00	0.930	0.835	27
	1.70	0.070 (21)	— (6)	
	3.30	—	0.165	
G ₆ PD	1.00	0.833 (6)	— (3)	9
	0.71	0.167	1.000	
ACPH ₂	1.43	0.250 (3)	No se estudió	3
	1.00	0.750		
GPI ₁	1.00	1.000 (8)	1.000 (7)	15
GPI ₂	1.00	1.000 (8)	1.000 (7)	15
ODH ₁	1.00	1.000 (7)	1.000 (4)	11
EST ₁	1.00	1.000 (4)	1.000 (14)	18
EST ₃	1.00	1.000 (4)	1.000 (14)	18
EST ₄	1.20	0.100 (10)	0.165 (3)	13
	1.00	0.900	0.835	

*Región Metropolitana.

*Se indica entre paréntesis el número de individuos para cada localidad.

rece sólo en poblaciones de la IV Región, no detectándose en la población de Colina.

En la tabla 3 se muestra la variación genética, tanto en *T. spinolai* como en *T. infestans*, estimada a base de la frecuencia de loci polimórficos, promedio de alelos por locus y heterocigocidad promedio (\bar{H}). Los valores de la tabla 3 indican que *T. spinolai* presenta una mayor variabilidad que *T. infestans*. Además, en las poblaciones de la IV Región de *T. spinolai* se detectó una mayor variación que en las poblaciones de Colina.

En la tabla 4 se indican, para cada especie, los coeficientes de identidad y distancia genética intraespecífica. Las poblaciones de *T. spinolai* comparadas presentan una menor identidad genética y una mayor distancia genética que las poblaciones que se compararon en *T. infestans*.

A base de la distancia genética, tanto en *T. spinolai* como en *T. infestans* se calculó el tiempo evolutivo o tiempo de separación de los taxa aplicando la fórmula de Nei (1975). Estos resultados sugieren que las poblaciones de *T. spinolai*

Tabla 3
ESTIMACION DE LA VARIACION GENETICA EN POBLACIONES
DE *TRITOMA SPINOLAI* Y *T. INFESTANS*.
SE CALCULO LA FRECUENCIA DE LOCI POLIMORFICOS,
EL PROMEDIO DE ALELOS POR LOCUS Y LA HETEROCIGOCIDAD PROMEDIO (\bar{H})

	<i>T. spinolai</i>		<i>T. infestans</i>	
	IV Región	Colina*	IV Región	I Región
Frecuencia de loci polimórficos	0.420	0.294	0.110	0.190
Promedio de alelos por locus	1.500	1.300	1.100	1.100
Heterocigocidad promedio (\bar{H})	0.240	0.290	0.210	0.140

*Región Metropolitana.

Tabla 4
COEFICIENTES DE IDENTIDAD GENETICA
Y DE DISTANCIA GENETICA
INTRAESPECIFICA EN *T. SPINOLAI*
Y EN *T. INFESTANS*

	<i>T. spinolai</i> (Pob. de IV Región y Colina)	<i>T. infestans</i> (Pob. de la I y IV Región)
Identidad genética	0.752	0.820
Distancia genética	0.285	0.198

se habrían originado hace aproximadamente 1.425×10^9 años y aquellos de *T. infestans* 990×10^3 años. Considerando que las poblaciones de *T. spinolai* se asocian a vertebrados silvestres, es difícil discutir su tiempo de origen. Sin embargo, en el caso de *T. infestans* el tiempo de separación de los taxa estudiados, estimado según el método de Nei es excesivo ya que obviamente la separación evolutiva de estas poblaciones por domesticación no podría haber ocurrido antes de la llegada del hombre a Sudamérica, vale decir, hace aproximadamente 11.000 años atrás.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los coeficientes de identidad y distancia genética indican que entre las poblaciones tanto de *T. spinolai* como de *T. infestans* existe una marcada divergencia genética. Esta divergencia es más marcada entre las poblaciones de *T. spinolai* que entre las poblaciones de *T. infestans*. Estos datos sugieren que, en cada especie, las poblaciones estudiadas podrían corresponder a razas geográficas o subespecies.

Esta hipótesis se apoya en la evidencia que en otras especies de insectos pertenecientes a los géneros *Drosophila*, *Rhagoletis* y *Anastrepha* (Ayala, 1975; Morgante *et al.*, 1980) se han encontrado coeficientes de identidad similares a los valores encontrados en este trabajo y se ha concluido que las poblaciones comparadas corresponden a especies incipientes.

La diferenciación genética encontrada entre las poblaciones de *T. spinolai* es concordante con la diferenciación morfológica encontrada entre machos alados de las poblaciones de la IV Región y Región Metropolitana (Colina). (Frías, *et al.*, 1987).

La menor variación genética encontrada en *T. infestans* podría deberse a que esta especie, durante su historia evolutiva, cuando se adaptó a los ambientes domésticos sufrió, por deriva genética (efecto fundador), una fuerte disminución de su variabilidad genética. A una conclusión similar llegaron Dujardin y Tibayrenc (1985) al comparar poblaciones bolivianas de *T. infestans*. Así, estos autores encontraron que sólo 3 loci eran polimórficos de un total de 19 loci analizados.

Por el contrario, *T. spinolai* sólo se asocia a ambientes silvestres peridomésticos y su presencia en ambientes domésticos es muy ocasional, de esta manera, en su historia evolutiva no habría sufrido un efecto de deriva por domesticación, manteniéndose así una mayor variación genética en sus poblaciones.

La gran distancia genética encontrada entre las poblaciones de *T. infestans* de la I y IV Región pueden deberse a la existencia de barreras geográficas (desierto de Atacama) que restringiría el flujo genético interpoblacional. A diferencia de lo encontrado en este trabajo, Dujar-

din *et al.* (en 1987) al comparar poblaciones silvestres y domésticas de *T. infestans*, no encontraron diferencias genéticas apreciables, por lo que concluyen que las poblaciones analizadas corresponden a una sola especie.

En *T. spinolai*, entre ambas poblaciones analizadas (IV Región y Región Metropolitana) se encontró también diferencias genéticas apreciables. Esto puede deberse a que, a pesar de la ausencia de barreras geográficas, la ausencia de alas en las hembras y en la mayoría de los machos colectados en las poblaciones naturales, limitaría fuertemente el flujo genético interpopulacional lo que favorecería la diferenciación genética en las poblaciones de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. W. Apt por proporcionarnos numerosos ejemplares de ambas especies para su análisis.

BIBLIOGRAFIA

- AYALA, F.J.; J.R. POWELL; M.L. TRACEY; C.A. MOURÃO and PÉREZ-SALAS (1972). Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* 70: 113-139.
- AYALA, F.J. 1975. Genetic differentiation during speciation process. *Evol. Biol.* 8: 1-78.
- DUJARDIN and M. TIBAYRENC. 1985. Etude de 11 enzyme et données de génétique formelle pour 19 loci enzymatiques chez *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 65: 271-280.
- DUJARDIN, J.P.; M. TIBAYRENC; E. VENEGAS; L. MALDONADO; P. DENIEUX and F.J. AYALA. 1987. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J. Med. Entomol.* Vol. 24(1): 40-45.
- ENZYME NOMENCLATURE. 1974. Commission on Biochemical Nomenclature. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Co.
- FRIAS, D.; H. MARTÍNEZ; A. WALTACI. 1987. Algunos aspectos taxonómicos de *Triatoma spinolai* Porter (Hemiptera: Triatominae). *Acta Entomológica Chilena* 14: 155-169.
- GAJARDO TOBAR, R. 1953. Algo más sobre *Mepraia spinolai* Porter, Hemiptera, Triatominae. *Revista Chilena de Entomología*, 3: 117-125.
- HUEFFEL, R.N. and G.L. BUSH. 1972. Starch gel electrophoresis of tephritid proteins. A manual of techniques. Group on fruit flies. International Biological Programme Press.
- LENT, H. and WYGODZINSKY. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, New York, Vol. 163, Article 3: 125-520.
- MORGANTE, J.S.; A. MALAYASI and G.L. BUSH. 1980. Biochemical Systematics and Evolutionary Relationships of Neotropical *Anatropa*. *Annals of Ent. Soc. of Am.* Vol. 73, N° 6: 622-630.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Natur.* 106: 283-292.
- NEI, M. 1975. *Molecular population genetics and evolution*. Amsterdam, North Holland Publishing Co.
- SCHOFFIELD, C.J.; W. ART and M.A. MILES. 1982. The ecology of Chagas' disease in Chile. *Ecology of Disease*, 1: 117-129.
- SCHOFFIELD, C.J. 1985. Control of Chagas' disease vectors. *British Medical Bulletin*. Vol. 45, N° 2: 187-194.