

## OFICI DE NATURALISTA

# Anàlisi sobre dos ecotipus de *Culex* (*Culex*) *pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) al Baix Llobregat

Roger Eritja\* &amp; Marta Goula\*\*

Rebut: 03.05.99

Acceptat: 02.06.99

## Resum

Hom ha abordat l'estudi del complex del mosquit *Culex pipiens* Linnaeus, 1758. La hipòtesi de treball fou que poblacions d'aquest mosquit, que poden pondre ous sense ingesta prèvia de sang (poblacions autògenes), podrien constituir per alguns autors una entitat taxonòmica diferent, *Culex molestus* Forskal, 1775, aïllada genèticament en biòtops subterranis tancats, i amb caràcters morfològics diferencials respecte de *Culex pipiens* s.s. Per provar aquesta hipòtesi, un total de 74 poblacions larvàries foren mostrejades en els anys 1993 i 1994 en diferents biòtops del Baix Llobregat (Barcelona, Espanya) per ser analitzades simultàniament des del punt de vista de l'autogènia, la morfologia, la dinàmica de poblacions i els fluxos genètics entre diferents hàbitats.

Les poblacions larvàries d'hàbitats subterranis tancats presentaven un percentatge més elevat de femelles autògenes, i l'autogènia era significativament associada a certs caràcters morfològics, tot i que no posseïen valor diagnòstic. Com que els intercanvis genètics eren amplis entre hàbitats, no es recolza la validesa taxonòmica de *Culex molestus*, donant a l'autogènia només un valor d'adaptació fisiològica.

L'anàlisi dels al·lels de resistència a insecticides organofosforats va trobar-los en altes freqüències, tot i que els mosquits deixaren de controlar-se amb

aquests productes des del 1992. El manteniment de la resistència podria ser afavorit per residus de plaguicides agrícoles en l'aigua. Es proposà un model dinàmic sobre aquesta informació, incloent també la influència de les activitats humanes de control de mosquits com a factor d'increment de la deriva genètica.

MOTS CLAU: Adaptació, Culícids, *Culex pipiens*, autogènia.

## Abstract

### Analysis of two ecotypes of *Culex* (*Culex*) *pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) in the Baix Llobregat area

Taxonomic differentiation was assessed in the mosquito species-complex *Culex pipiens* Linnaeus, 1758. The working hypothesis was that autogenous populations (i.e. those containing females that can lay their first egg batch without a blood meal) could represent a separate species, *Culex molestus*, morphologically differentiated and ecologically isolated in closed underground habitats.

A total of 74 populations were sampled from different habitats in the Baix Llobregat area, near Barcelona in Spain, during 1993 and 1994 in order to assess autogeny, morphology, population dynamics and gene flow between habitats.

Larval populations from closed underground habitats shows a higher percentage of auto-

\* Servei de Control de Mosquits. Consell Comarcal del Baix Llobregat. Parc Torreblanca. 08980 Sant Feliu de Llobregat.  
\*\* Departament de Biologia Animal (Artròpodes). Facultat de Biologia. Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.

genous females. The autogeny was related to certain morphological characters, although these lacked diagnostic value. Since the gene flow between habitats was estimated to be high, the taxonomic validity of *Culex molestus* is not supported, and the autogeny is considered to be only a physiological adaptation.

In addition, analysis of organophosphate pesticide resistance revealed high frequencies of resistance alleles up to two years after the withdrawal of these products. Maintenance of the resistance could be favoured by agricultural pesticide residues in the water.

A dynamic model is proposed that incorporates this data and also includes the influence of human mosquito-control activities as a factor increasing genetic drift.

**KEYWORDS:** Adaptation, Culicidae, *Culex pipiens*, autogeny.

## Resumen

### **Análisis sobre dos ecotipos de *Culex* (*Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) en el Baix Llobregat**

Se abordó la diferenciación en el complejo del mosquito *Culex pipiens* Linnaeus. La hipótesis de partida fue que poblaciones autógenas de esta especie (es decir, que pueden poner sus huevos sin ingerir sangre previamente) podrían constituir según algunos autores la entidad taxonómica diferenciada *Culex molestus* Forskal, 1775, aislada genéticamente en biotopos subterráneos cerrados, y con caracteres morfológicos diferenciales. Un total de 74 poblaciones larvarias fueron muestreadas en los años 1993 y 1994 en diferentes biotopos del Baix Llobregat (Barcelona, España) para ser analizadas simultáneamente desde los puntos de vista de la autogenia, la morfología, la dinámica de poblaciones y flujos génicos entre diferentes biotopos.

Las poblaciones larvarias de biotopos subterráneos cerrados presentaban un porcentaje mayor de hembras autógenas. La autogenia estuvo significativamente asociada con ciertos caracteres morfológicos, los cuales no poseyeron sin embargo valor diagnóstico. Puesto que además los intercambios genéticos entre hábitats eran importantes, no se confirmó la validez taxonómica de *Culex molestus*, valorándose la autoge-

nia únicamente como una adaptación fisiológica. Los alelos de resistencia a insecticidas organofosforados se hallaron en altas frecuencias a pesar de haberse abandonado estos productos para el control de mosquitos en 1992. El mantenimiento de estos alelos podría ser consecuencia de la presencia de residuos de plaguicidas agrícolas en el agua. Se propuso un modelo dinámico sobre el conjunto de los datos, que incluye también la influencia de las actividades humanas de control de mosquitos como un factor importante de incremento de la deriva genética.

**PALABRAS CLAVE:** Adaptación, Culicidos, *Culex pipiens*, autogenia.

## Introducció

Diferents poblacions del mosquit *Culex* (*Culex pipiens* Linnaeus, 1758 presenten comportaments reproductors i tròfics contraposats, que aparentment depenen de llurs biòtops larvaris. Els mosquits d'aigües subterrànies posseeixen la capacitat de pondre ous sense haver pres sang (autogènia), poden copular en espais molt reduïts (estenogàmia), i a més, tenen preferència pels mamífers a l'hora de fer la ingesta de sang (mamofília), cosa que els fa molt agressius per l'home. Aquestes poblacions solen ser anomenades *C. pipiens* «urbans» o *Culex molestus*, segons alguns autors. Els mosquits provinents d'aigües superficials, en canvi, són anautògens i eurígams, i ataquen els ocells més que no pas els mamífers (ornitofília); aquests són anomenats *Culex pipiens* «rurals».

Entre ambdues formes existeixen gradients de variació que plantegen problemes d'interpretació. Això ha generat tradicionalment polèmica en la sistemàtica de *Culex pipiens* en haver-se proposat la separació dels dos models biològics en espècies o subespècies, considerant també caràcters morfològics que hom ha relacionat amb l'autogènia. Aquesta facultat, que és possible només en el primer ci-

---

cle gonotròfic, es sol interpretar com un mecanisme de supervivència quan no hi ha hostes per picar i la temperatura exterior no és adequada per l'activitat (Roubaud, 1929; Callot, 1948), condicions que es donen als subsòls a l'hivern. Les repercussions pràctiques del millor coneixement de *C. pipiens* són importants, ja que les formes autògenes són les més agressives, i essent urbanes, les més properes a la població.

La finalitat del present treball és intentar esclarir si els dos conjunts de poblacions de *Culex pipiens* coexisteixen al Baix Llobregat, i si és legítima llur separació taxonòmica. Amb aquesta finalitat s'ha treballat de forma integrada sobre la combinació de dades morfològiques, fisiològiques, etològiques, ecològiques i genètiques, preses sobre les mateixes mostres. Aquests punts de vista havien estat explorats separatament fins ara, però mai no s'havien intentat aproximacions globals al problema. El present treball és, de fet, un resum d'aquest projecte integrat, que ha estat editat *in extenso* (Eritja, 1998).

El desenvolupament ovarià autogen és mitjançant per l'aparellament i no per l'àpat de sang (Tate & Vincent, 1936; Knight, 1951). Per aquest motiu, convé no interpretar l'autogènia de forma separada a la conducta copulatòria.

L'estenogàmia és la capacitat de copular en petits espais tancats i per parelles, mentre que els mosquits eurígams es reproduïxen a l'exterior formant eixams de còpula. Segons Bullini (1982) aquest és el mecanisme d'aïllament reproductor més probable entre les formes autògenes de *Culex pipiens* (estenògames) i les formes anautògenes (eurígams). Tant l'estenogàmia com l'autogènia, són hereditàries (Tate & Vincent, 1936; Knight, 1951). L'estenogàmia sembla determinada per un sol *locus* dominant, probablement relacionat amb el sistema genètic de l'autogènia (Ribeiro *et al.*, 1983). L'elevat nombre de ca-

sos en què es troben totes dues característiques relacionades no ha de fer oblidar que no es tracta d'un lligam obligat, essent probablement l'estenogàmia molt més freqüent que l'autogènia a la natura (Callot & Van Ty, 1943).

## Elements de l'estudi

Els criteris morfològics foren els primers que s'utilitzaren en l'estudi del complex de *Culex pipiens*. Als mascles, la relació entre la longitud total dels palps maxil·lars i la longitud de la trompa és un caràcter amb gran tradició. Aquesta relació en els mascles autògens presentaria valors més alts, ja que els palps són més curts en relació a la trompa (Marshall & Staley, 1937; Callot, 1954).

Diverses variables morfomètriques sobre les nerviacions alars (Kruppa, 1988; Ishii, 1979), no semblen haver estat prou conclouents pel que fa a *Culex pipiens* autogen, si bé ho foren per discriminar *C. pipiens* de *C. quinquefasciatus* (Kruppa, 1988).

En l'hipopigi masculí la relació DV/D (Sundararaman, 1949) és la relació d'obertures dels braços dorsals (D) i ventrals (V) de l'edeagus (Kruppa, 1988).

Altres caràcters molt usats es troben al sífo respiratori de les larves (Marshall & Staley, 1937). El més important és l'índex sífonic, que resulta de dividir-ne la llargada per la seva amplada. És molt utilitzat (Marshall & Staley, 1937; Ishii, 1967; Kruppa, 1988), si bé en ocasions resulta massa variable (Harbach *et al.*, 1984). Els índexs sífònics de poblacions autògenes serien més baixos, en ser més amples els seus sífons. La quietotàxia sífònica també ha estat usada per a distingir els individus autògens (Callot, 1948), mitjançant el nombre de rames de la seda 1-S, o bé el nombre total de sedes al sífo (Ishii, 1983). Quant al nombre de denticles en la pinta sífònica o *pecten* (Harbach, 1985), les larves autògenes

en tindrien més que les anautògenes (Ishii, 1967). Finalment, el nombre de dents que presenta el *mentum* larvari és per alguns autors un important caràcter taxonòmic per a separar la forma *pipiens* de la forma *molestus* (Jobling, 1938; Kruppa, 1988), però no per d'altres (Ishii, 1981).

Pel que fa als intercanvis poblacionals entre hàbitats, la teoria més acceptada propugna una extinció massiva de les poblacions a l'aire lliure en arribar l'hivern, o una migració cap els subterranis per a hivernar-hi, combinat amb un èxode primaveral autogen des d'aquests subterranis cap a l'exterior. Al Baix Llobregat, però, i en hiverns suaus, les femelles poden romandre actives a l'exterior durant l'estació freda. El clima no representaria aleshores un factor d'aïllament tan important, i els reservoris autògens subterranis no tindrien tanta transcendència com a *pool* colonitzador; podria esperar-se, per tant, una major heterogeneïtat genètica en la nostra situació local.

Per tal de definir el nivell de flux genètic entre poblacions, i el paper real de l'estenogàmia com a mecanisme d'aïllament genètic, hom ha utilitzat l'anàlisi electroforètica dels isoenzims. D'una banda, l'estudi dels *loci* neutres, en absència de selecció, pot indicar els fluxos genètics actuals i passats. D'altra banda, els al·lels que codifiquen enzims de resistència a insecticides organofosforats (OP) en *loci* no neutres, són fortament seleccionats en regions on aquests productes són d'ús freqüent, com és el cas del Baix Llobregat.

Hom ha descrit en *Culex pipiens* tres *loci* de gens de resistència. Dos d'ells, Est-A i Est-B, estan estretament lligats i codifiquen esterases de detoxificació. Els al·lels coneguts són A1 (Pasteur & Sinègre, 1975), A2, A4, A5, B2, B4 i B5, trobant-se'n alguns en fort desequilibri de lligament. Les associacions més freqüents són A4 amb B4, A2 amb B2, i A5 amb B5. El tercer *locus*, *Ace*, no codifica un enzim de detoxificació sinó una acetilco-

linesterasa modificada *Ace*<sup>R</sup>, insensible a l'acció d'aquells plaguicides que la tenen per diana. El 1991 Chevillon *et al.* (1995a) trobaren A1, A4B4, i *Ace*<sup>R</sup> al Baix Llobregat i als Aiguamolls empordanesos, si bé no al Delta de l'Ebre. A2B2 i A5B5 no es trobaren a la costa catalana.

Els al·lels de resistència són excel·lents marcadors de migració entre hàbitats, ja que tots ells són el resultat de mutacions recents i úniques; per tant, llur presència implica un esdeveniment migratori (Raymond *et al.* 1991, Raymond & Marquine 1994). Els programes químics de control de mosquits actuen com grans sistemes de selecció d'aquests al·lels. Però a més de la selecció, són factors importants la migració, la deriva i, sobretot, la contra-selecció dels al·lels resistents en absència d'insecticides; és a dir, el seu cost biològic.

En aquest estudi utilitzarem els al·lels de resistència com a marcadors de migració entre els hàbitats subterranis tancats i l'exterior, i també per estudiar l'evolució durant 1993 i 1994 de la distribució de la resistència, i per tant la contra-selecció i l'expressió dels costos biològics. Si fossin rellevants, caldria esperar una disminució de les freqüències al·lèliques i una homogeneïtzació a la baixa (en l'àmbit regional) entre el delta tractat en el període 1983-1992, i la vall del riu no tractada.

## Material i mètodes

La complexitat del treball obliga a detallar separadament els mètodes usats en cadascun dels aspectes desenvolupats.

### Mostreig

Al Baix Llobregat es mostrejaren 74 poblacions larvàries de *Culex pipiens* de diferents biòtops (45 l'any 1993 i 29 l'any 1994). Es recol·lectaren larves d'estadi IV i pupes, que emergiren al laboratori possibilitant de

---

realitzar les anàlisis sobre adults de la generació de camp i evitant influències atribuïbles a una cria en insectari. La captura es realitzà amb salabre de 250 µm de malla (Nyttal, Suïssa). Els individus es conservaren en aigua destil·lada en recipients de plàstic refrigerats a uns 8 a 10 °C fins al seu establiment a l'insectari, amb un temps de transport màxim d'una hora.

L'insectari es trobava a una temperatura de 24-26 °C, humitat relativa de 55 a 75 % i fotoperíode de 13 hores (dia) i 9 (nit), més un alba i un crepuscle d'una hora cadascun. Les gàbies de cria eren constituïdes per una ànima cúbica de tija de ferro i tul, de 25 × 25 × 35 centímetres. L'alimentació larvària consistia en una mescla de pinso per rates triturat, amb microencapsulats per crustacis (FRIPPAK #3CD, Inve, Bèlgica), més Clorur de Colina.

Prèviament al mostreig s'establí una classificació subjectiva del biòtop segons tres categories predefinides. La categoria «O» contenia biòtops subterranis, completament tancats. La categoria «U» era formada per biòtops subterranis, no completament tancats, i en tot cas amb obertures d'accés no superiors al 30 % de la superfície de l'aigua. La categoria «E» contenia hàbitats d'aigües superficials, contaminades o no.

S'obtingueren durant l'any 1993 un total de 45 mostres: 5 de la categoria O, 30 de la E i 10 de la U. La primera mostra s'obtingué el 8 de març, i la darrera, el 27 d'agost. D'aquestes mostres s'establiren 40 larves de cada població en recipients individuals, per als estudis de morfologia i genètica, i a més es conservaven 200 pupes en una safata, per l'anàlisi fisiològica per dissecció.

En la campanya de 1994 s'obtingueren dades dels al·lels de resistència. Inclogué 29 poblacions, algunes de les quals foren repetides entre elles, i algunes ho foren amb les de l'any anterior. Comptant amb l'experiència de 1993, només dues categories, la O i la E,

foren conservades; es mostrejà un total de dos focus de tipus O i vint-i-set focus de tipus E. En aquest cas l'única operació d'insectari era congelar uns 200 adults per població en nitrogen líquid, a les 24 hores de la seva aparició.

### Fisiologia

Per tal d'avaluar l'autogènia i l'estenogàmia es seguí el criteri de Christophers (1911, a Detinova, 1963). S'observaren els fol·licles ovarians al microscopi a 400x per a determinar llur estadi de desenvolupament; si estaven més enllà de l'estadi IV, la femella era considerada autògena. Les femelles eren disseccionades al cap de vint dies des de l'emergència del darrer adult d'acord amb Pasteur *et al.* (1977), sota una lupa binocular entre 40x i 60x.

Per valorar l'estenogàmia, es separaven les tres espermateques del darrer segment abdominal, i se'n feia un *squash* en sèrum fisiològic, que s'observava a 400x per a detectar la presència d'espermatozoides.

Els percentatges d'autogènia i d'estenogàmia foren analitzats amb proves no paramètriques, entre les quals hi havia la  $\chi^2$  i la correlació de Spearman per rangs, tant entre mostres individuals, com en percentatges acumulats entre els tres tipus d'hàbitats seleccionats.

Les 40 larves d'estadi IV per a l'estudi morfològic i genètic eren mantingudes individualment en recipients de vidre amb 8 cm<sup>3</sup> d'aigua cadascun, amb 16,5 mg de mescla alimentària. L'exúvia IV i la pupal eren recollides i conservades en alcohol al 70 %. A les 72 hores de l'aparició dels adults, se'ls matava amb cianur potàssic, i se'ls tallava l'ala dreta, que es fixava en etilenglicol-monoetil-èter juntament amb les dues exúvies, i els tres elements es muntaven en una preparació en Bàlsam del Canadà. Als mascles, addicionalment, se'ls disseccionava l'hipopigi amb un microbisturí, i es preparava segons una tècnica compendiada de diversos autors (Sundaraman, 1949;

Sasa *et al.*, 1967; Choochote, 1987), amb bany d'alcohol al 70 % seguit pel transparentat en KOH al 10 % a 80 °C per 60 minuts, fixació en un bany d'etilenglicol-monoetil-èter per 25 minuts, i muntatge en Bàlsam.

Els adults es guardaven en sec en tubs de congelació NUNC a raó de cinc individus per tub identificats individualment. Els codis de situació, sexe, número de tub i mostra a què pertanyien es gravaren en una base de dades. Un total de 1830 individus foren mesurats i congelats en nitrogen líquid, dels quals 1160 s'utilitzaren després per a l'anàlisi genètica.

### Morfologia

L'observació de les característiques morfo-mètriques de l'ala, el sifó, els palps maxil·lars i la genitèlia masculina es va fer amb ajut de lupa o microscopi, a 25x, 40x o 100x segons calgués. La longitud de l'ala (LALA) es mesurà sense l'âl·lula; les nerviacions mesurades foren M, M12, R23 i R3. Es calculà per a cadascuna la seva longitud relativa a la total de l'ala (MREL, M12REL, R23REL i R3REL).

Al sifó, la longitud (LSIF) es mesurà excloent les valves terminals, i l'amplada (ASIF) al punt on era màxima. La variable en què es calculà l'índex sifònic s'anomenà INDEXSIF. De la pinta sifònica (DENTS) i de la seda 1-S (SETA1S), s'adoptà el nombre de denticles o branques més alt d'ambdós costats. Aquestes variables, així com les dents del mènium (MENTUM), foren normalitzades per mitjà de la seva arrel quadrada (RQDENTS, RQSETA I RQMENTUM respectivament). L'ajust a distribucions normals permeté utilitzar aquests valors en anàlisis paramètriques.

Es mesuraren els tres segments anatòmics dels palps maxil·lars descrits per Kruppa (1988), corresponents als palpòmers 1-3 (PAL1), 4 (PAL2) i 5 (PAL3). Cada tram fou mesurat per separat i es computà numèricament el total (SPALP); no es comptà el pedicel

basal en la longitud del primer. La longitud del tòrax (LTOR) es mesurà des de la inserció del cèrvix, en el promontori anterior, fins el marge posterior de l'escutel.

Les obertures dels braços dorsals (D) i ventrals (V) de l'hipopigi s'usaren per calcular l'índex DV/D segons  $DV/D = (V-D)/2D$  (Sohn & Ishii, 1989). Els hipopigis immadurs que no havien completat la rotació foren descartats.

Les dades biomètriques foren analitzades estadísticament en relació al sexe, i a factors fisiològics i genètics, és a dir, el nivell d'autogènia poblacional, el nivell d'estenogàmia, el grup de mostreig, la presència d'esterases de detoxificació, i la presència de qualsevol al·lel de resistència. El sexe i les variables genètiques de resistència, que eren discretes, es dividiren en dos nivells. Els factors autogènia i estenogàmia foren dividits en tres nivells: les poblacions que presentaven el 0 % de les femelles amb la capacitat, les compreses entre l'1 i el 50 %, i les compreses entre el 51 i el 100 %.

En un pas preliminar, assumint l'existència de dimorfisme sexual i d'una elevada variabilitat, hom aplicà tècniques d'anàlisi de la variança balancejades a dos factors: el sexe, fix, que es combinà per torns amb cadascun dels altres. Per cada combinació es repetiren les anàlisis sobre sis sub-mostres que s'havien extret aleatòriament del conjunt de dades.

A continuació les variables es sotmeteren a anàlisi factorial i discriminant lineal, la primera per reclassificar les mostres, i la segona els individus. Ambdues tècniques foren aplicades sobre ambdós sexes. Per tal de no afavorir una influència excessiva de la mida corporal, es sotmeteren a aquestes anàlisis les variables índex, i no s'utilitzaren els valors directes si havien intervingut en el càlcul d'alguns dels índexs.

Les variables que s'usaren per les anàlisis factorial i discriminant per les femelles foren LTOR, LTROM, RQMENTUM, RQDENTS,

---

R23REL, MREL, R3REL, M12REL i INDEXSIF. Pels mascles entraren a l'anàlisi factorial LTOR, TROPAL, RQMENTUM, RQDENTS, DVD, MREL, R23REL, M12REL, R3REL i INDEXSIF. A l'anàlisi discriminant la variable DVD fou eliminada a causa d'un cert nombre de valors mancants, que forçava l'exclusió global d'aquests casos de l'anàlisi.

### **Polimorfisme enzimàtic als loci neutres**

La quarantena d'individus per població usats per la biometria i conservats en nitrogen líquid es sotmeteren posteriorment a electroforesi en gel de midó en el sistema de tampons TME-7,4 (Tris/Maleat/EDTA), seguint les tècniques descrites a Pasteur *et al.* (1988). El polimorfisme enzimàtic fou estudiat en els quatre loci neutres (Chevillon *et al.*, 1995b) *Aat-1* i *Aat-2* (EC.2.6.1.1), *Pgm* (EC 2.7.5.1), i *Pgi* (EC 5.3.1.9). Les soques usades com a referència de mobilitat foren les descrites per Chevillon *et al.* (1995a). L'anàlisi dels al·lells neutres es dugué a terme únicament sobre les mostres de 1993; les dades de genètica de la resistència s'obtingueren el 1993 i el 1994.

L'ajust a les proporcions de Hardy-Weinberg es verificà amb la prova exacta d'Haldane (1954) utilitzant l'algoritme de Louis & Dempster (1987) fins a quatre al·lells. Per cinc al·lells o més, es calculà una estimació no esbiaixada del valor exacte  $P$  utilitzant el mètode de Guo & Thompson (1992) basat en cadenes de Markov.

El nivell de significació global dels tests múltiples per cada mostra s'estimà amb un test de Fisher de probabilitats combinades (Fisher, 1970). Aquest mètode assumeix que els valors  $P$  per cada test independent segueixen una distribució uniforme entre 0 i 1, i per tant és lleugerament imprecís (Yates, 1955). Tot i això, quan la mida mostral o bé el nombre d'al·lells és elevat, l'aproximació contínua és lícita perquè el nombre de taules genotípiques diferents considerades (i per tant valors de probabilitat) és molt gran.

Els valors  $F_{is}$  es calcularen d'acord amb Weir & Cockerham (1984). Pels dèficits d'heterozigots en múltiples mostres usarem un test exacte descrit per Rousset & Raymond (1995). El paràmetre  $F_{st}$  fou calculat seguint Weir & Cockerham (1984). La probabilitat de l'error de tipus I associada a la hipòtesi nul·la ( $H_0: F_{st} = 0$ , o sigui, no hi ha diferenciació) es calculà mitjançant un test exacte per la  $F_{st}$  (Raymond & Rousset, no publicat).

Per cada població, el desequilibri global de lligament entre parells de loci fou estimat pel coeficient de correlació simple (Weir, 1990), i provat usant el test exacte de Fisher en una taula de contingència.

El nombre de migrants efectius ( $N_m$ ) s'estimà per dos mètodes, a partir dels paràmetres  $F$  d'acord amb l'equació  $N_m = (1/F_{st} - 1)/4$  (Wright, 1969), i també pel mètode dels al·lells privats (Slatkin, 1985). El nivell de significació per cada test va ser ajustat per a tenir en compte els altres tests, utilitzant el mètode seqüencial de Bonferroni, tal com descriu Holm (1979).

### **Al·lells de resistència**

Ambdues campanyes de mostreig s'analitzaren segons el mateix protocol, si bé en aquest capítol hom dividí el mostreig en dues regions. D'una banda, el delta del riu, que rebé tots els tractaments químics entre 1983 i 1992; de l'altra, la vall del riu Llobregat, que no fou objecte de control de mosquits aquella època. A efectes pràctics, definírem un disc de 9 km de radi aproximadament, que es superposà al delta. La distància entre el seu centre i cada punt de mostreig es computà com la variable DIST. Per l'estudi dels al·lells de resistència, les categories mostrals E i U foren reunificades.

Les esterases de detoxificació als loci A i B foren analitzades pels mateixos mètodes que els al·lells neutres. En no poder distingir els heterozigots de l'homozigot resistent, aquesta tècnica només permeté d'establir fenotipus; el fenotipus caracteritzat per absència d'este-

rases fou anomenat *Nul*; als altres se'ls anomenà per l'esterasa(es) detectada(es).

Els genotipus per l'acetilcolinesterasa foren determinats en homogenats de cap i tòrax, utilitzant la prova TEP descrita per Raymond & Marquine (1994). S'anomenà *Ace<sup>R</sup>* l'al·lel per l'acetilcolinesterasa insensible a la inhibició pels organofosforats, i *Ace<sup>S</sup>* l'al·lel susceptible; *Ace<sup>RS</sup>* són els heterozigots, que amb aquesta tècnica poden ser discriminats per llur reacció intermèdia. Les desviacions de l'equilibri de Hardy-Weinberg en aquest *locus* foren analitzades segons Rousset & Raymond (1995) amb dues hipòtesis alternatives (H1 = dèficit d'heterozigots, H2 = excés d'heterozigots), usant el mètode de Louis & Dempster (1987).

La homogeneïtat en la composició dels gens de resistència de les R mostres recollides va ser analitzada amb una prova exacta de Fisher en taules RxC, utilitzant el programari GENEPOP v.2, escrit per Raymond & Rousset (1995). Les C columnes de les taules de contingència RxC fan referència als fenotipus, per les esterases, i a al·lells o bé genotipus, per l'acetilcolinesterasa.

Per tal d'avaluar una possible disminució de les freqüències dels al·lells de resistència, o la homogeneïtzació de la composició al·lèlica general a causa del flux gènic, s'executaren anàlisis clàssics de la covariància, utilitzant el programari GLIM. El dia i l'any del mostreig foren codificats en la variable DATA (amb DATA=1 pel 8 de març de 1993), i pel factor ANY, respectivament; la localització del mostreig fou codificada en la variable DIST. L'evolució d'aquesta distribució geogràfica entre 1993 i 1994 fou analitzada per mètodes de covariància amb DIST, tenint en compte el factor ANY.

Les restes de plaguicides fitosanitaris poden arribar a l'hàbitat de *C. pipiens* per escorrentia, i actuar-hi com una força selectiva lleu però contínua (Curtis *et al.*, 1978; Mani,

1985). És per això que al llarg de 1994 es realitzaren anàlisis d'aigües per cromatografia de gasos d'alta resolució (HRGC) en 9 dels punts de mostreig, a la recerca de residus de pesticides. S'utilitzaren detectors Nitrogen-Fòsfor (NPD) pels organofosforats (OP) i de captura d'electrons (ECD) pels organoclorats (OC), amb columnes capil·lars de 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm DB-17 (OP) i DB-5 (OC). L'extracció líquid-líquid es dugué a terme en diclorometà; 1 microlitre de l'extracte prèviament concentrat s'injectà en mode *splitless* en un cromatògraf Carlo Erba 5360, emprant Heli com a vehicle gasós a 45 cm/seg. La comparació dels temps relatius de retenció es féu amb dos patrons estàndard, un pels OP i l'altre pels OC, que permetien d'identificar 35 OC i 31 OP (patrons no mostrats).

## Resultats

### Fisiologia

El 32 % de les mostres contingueren algun individu autogen. El 100 % de les mostres de la classe O en contienien, el 75 % de la U i el 13 % de la E. Més del 90 % de les mostres contienien individus estenògams, i només quatre poblacions de classe E no en contenia cap.

De les 1608 femelles disseccionades el 0,7 % eren únicament autògenes, el 9,5 % autògenes i estenògames, el 13,2 % només estenògames; el 76,7 % restant no eren autògenes ni estenògames. A la Taula 1 hom hi ha resumit la distribució de les freqüències d'autogènia i estenogàmia per grups mostrals.

Ni l'autogènia ni l'estenogàmia estaven distribuïdes uniformement per hàbitats ( $\chi^2$ , P = 0,0000, Taula 1). Les freqüències d'individus estenògams i la d'autògens foren superiors en els focus subterranis tancats, i significativament diferent dels altres dos, que no diferiren entre si. La comparació de les freqüències de l'autogènia i l'estenogàmia demostrà que



TAULA 1. Característiques fisiològiques de *Culex pipiens* recol·lectats en hàbitats subterranis tancats (O), subterranis oberts (U) i superficials (E). Les lletres indiquen diferència entre files ( $P < 0,01$ ).

Life history traits of *Culex pipiens* collected in closed underground habitats (O), open underground habitats (U) and open air habitats (E). Letters show differences between rows ( $P < 0,01$ ).

	% Estenogàmia	% Autogènia	N
O	86,3 <sup>a</sup>	76,7 <sup>a</sup>	146
U	17,7 <sup>b</sup>	3,7 <sup>b</sup>	383
E	15,7 <sup>b</sup>	3,4 <sup>b</sup>	1079

ambdues facultats eren significativament correlacionades (correlació de Spearman per rangs,  $r_s = 0,60$ ,  $N = 41$ ,  $P = 0,000$ ).

### Morfologia

La taula 2 presenta els resultats biomètrics. De les variables inicialment previstes, es descartà SETA1S i la seva transformació (RQSETA), ja que la combinació del seu recorregut discret, els casos mancants i els seus baixos valors (mínim = 1, màxim = 5) provocaren una variació intrínseca impossible d'analitzar i que emmascarava la variabilitat deguda als factors inclosos a l'estudi.

Els resultats de les anàlisis de la varianza no són mostrats en detall. Pel que fa a factors, ni les esterases per separat ni la resistència considerada en conjunt no tingueren influència significativa sobre cap de les variables. Pel que fa a les variables, les longituds relatives de M12 (M12REL), i M (MREL), la cel·la R23 tant en longitud absoluta (R23) com relativa (R23REL), el nombre de dents del *mentum* (RQMENTUM), i les variables de la genitèlia masculina no foren influenciades per cap dels factors estudiats; aquests factors i variables foren descartats de les anàlisis posteriors. De les anàlisis restants, les variacions més àmplies es donaren sota els factors concomitants autogènia, estenogàmia i grup de mostreig, que influenciaren en tots dos sexes l'amplada del sífo i per tant l'índex sífonic, el

nombre de denticles al sífo, la longitud de l'ala i algunes cel·les alars. En els mascles, els palps maxil·lars foren significativament més curts en les poblacions més autògenes, principalment a causa de PAL2 i PAL3. Ja que la trompa no presentà cap diferència sota l'autogènia, la relació trompa/palps fou validada com a caràcter lligat a l'autogènia, com també indiquen Jobling (1938) i Kruppa (1988).

La classificació múltiple de les mitjanes pel mètode de Tukey (dades no presentades) de la longitud de l'ala, i cel·les alars M i M12 sota l'autogènia no permeté d'interpretar les diferències detectades, coincidint en això amb diferents autors (Kruppa, 1988; Packer & Corbet, 1989). Per contra, l'anàlisi de les mitjanes parcials del nombre de dents al *pecten*, l'amplada del sífo i l'índex sífonic fou coherent, ja que, en tots tres casos, el grup d'autogènia màxima fou diferent dels altres dos. De conformitat amb Marshall & Staley (1937) i Kruppa (1988) es confirmà que l'índex sífonic és menor en poblacions més autògenes, a causa d'un augment en l'amplada.

Pel que fa a l'anàlisi factorial, els dos primers factors extrets per la tècnica dels components principals acumularen el 56,5 % de la varianza conjunta pels mascles, i el 62,1 % per les femelles. Hom presenta a la taula 3 les saturacions de cada variable morfomètrica sobre aquests factors, per femelles i per mascles. Els forts pesos sobre el primer factor de les va-

TAULA 2. Descriptius per totes les variables biomètriques mesurades a *Culex pipiens*. x, mitjana; s, desviació típica; CV, coeficient de variació (expressat en percentatge); N, mida mostral.  
 Descriptors of the biometric variables measured on *Culex pipiens*. x, mean; s, standard deviation; CV, coefficient of variation (in percentage); N, sample size.

VARIABLE	MASCLES				FEMELLES				CONJUNT			
	x	s	CV	N	x	s	CV	N	x	s	CV	N
LTOR	1,4483	0,1029	7,1	731	1,5974	0,1305	8,1	1012	1,5349	0,1405	9,1	1743
LALA	3,0434	0,2203	7,2	636	3,5485	0,2709	7,6	926	3,3428	0,3533	10,5	1562
LTROM	2,2587	0,1490	6,5	715	2,1619	0,1679	7,7	988	2,2025	0,1672	7,5	1703
M12	0,7185	0,0705	9,8	714	0,9819	0,0952	9,6	981	0,8709	0,1558	17,8	1695
M12REL	0,2359	0,0136	5,7	612	0,2768	0,0164	5,9	902	0,2603	0,0252	9,6	1514
M	0,4996	0,0446	8,9	720	0,5457	0,0528	9,6	979	0,5262	0,0544	10,3	1699
MREL	0,1644	0,0128	7,7	619	0,1540	0,0117	7,5	900	0,1583	0,0132	8,3	1519
R3	0,9198	0,0908	9,8	714	1,2943	0,1493	11,5	985	1,1369	0,2249	19,7	1699
R3REL	0,3021	0,0180	5,9	611	0,3652	0,0314	8,5	902	0,3397	0,0410	12,0	1513
R23	0,3306	0,0394	11,9	723	0,2846	0,0396	13,9	987	0,3041	0,0456	14,9	
1710												
R23REL	0,1091	0,0138	12,6	619	0,0804	0,0108	13,4	905	0,0920	0,0186	20,2	1524
MENTUM	21,479	1,5402	7,1	770	21,4441	1,5246	7,1	1011	21,4593	1,5310	7,1	1781
RQMENTUM	4,6316	0,1662	3,5	770	4,6278	0,1648	3,5	1011	4,6295	0,1654	3,5	1781
DENTSIF	14,375	2,0237	14,0	762	15,0929	2,3088	15,2	1001	14,7828	2,2182	15,0	1763
RQDENTS	3,7822	0,2655	7,0	762	3,8736	0,2967	7,6	1001	3,8341	0,2872	7,4	1763
LSIF	1,3692	0,1264	9,2	760	1,4214	0,1333	9,3	1001	1,3989	0,1329	9,5	1761
ASIF	0,3746	0,0412	10,9	759	0,3976	0,0474	11,9	1001	0,3877	0,0463	11,9	1760
INDXSIF	3,6947	0,4940	13,3	759	3,6144	0,4666	12,9	1001	3,6491	0,4801	13,1	1760
SETA1S	3,0554	0,8458	27,6	523	2,9971	0,8263	27,5	701	3,0221	0,8349	27,6	1224
RQSETA	1,7317	0,2385	13,7	523	1,7152	0,2353	13,7	701	1,7222	0,2367	13,7	1224
PAL1	1,5117	0,0962	6,3	714								
PAL2	0,5694	0,0582	10,2	712								
PAL3	0,6091	0,0665	10,9	711								
SPALP	2,6909	0,1975	7,3	711								
TROPAL	0,8412	0,0424	5,0	709								
D	0,1546	0,0099	6,4	528								
V	0,1107	0,0100	9,0	528								
DV/D	-0,0034	0,0009	26,4	528								

riables de mesura directa indicaren que aquest element responia a les dimensions absolutes de l'insecte. Per contra, quasi totes les variables lligades al segon factor, havien estat significatives sota anàlisi de la variança per l'autogènia, l'estenogàmia, i el grup de mostreig. En conseqüència, s'atribuí al segon factor un component d'aquestes característiques.

Les puntuacions numèriques de cada mostra sobre els factors poden usar-se per a obtenir gràfics de situació en un espai euclidià. Si la interpretació exposada era correcta, les mostres havien de resultar agrupades pel seu grau

d'autogènia al llarg del segon eix, i les puntuacions sobre el segon factor havien de mantenir una forta correlació amb el percentatge d'autogènia.

Aquesta representació en un espai bifactorial es troba a la figura 1, on el diàmetre dels cercles expressa el percentatge d'autogènia de la mostra representada, i on s'observa efectivament una agrupació de les mostres d'autogènia més elevada.

Per l'anàlisi discriminant hom trobà que un total de 789 femelles i 524 mascles reuniren les condicions per ser utilitzats usant les matei-

TAULA 3. Anàlisi factorial de les variables morfològiques de *Culex pipiens*. Saturacions de les variables a l'anàlisi sobre els factors extrems: a l'esquerra les femelles i a la dreta els mascles.  
Factor analysis on morphological variables of *Culex pipiens*: variable weights for each factor. Left: females, Right: males.

VARIABLE	FACTOR 1	FACTOR 2	VARIABLE	FACTOR 1	FACTOR 2
LTOR	0,82591	0,23336	MREL	0,84044	0,04772
LTROM	0,81552	0,24776	LTOR	-0,79707	-0,09959
R23REL	-0,79094	0,10933	R23REL	0,79633	-0,38056
MREL	-0,76846	0,37234	M12REL	-0,71566	0,30847
RQMENTUM	0,72904	0,41395	DVD	0,61056	0,07697
R3REL	-0,25936	0,01180	RQMENTUM	-0,44868	0,19481
INDXSIF	-0,18019	-0,78334	TROPAL	0,18920	0,81398
M12REL	0,49925	-0,77115	RQDENTS	0,03633	0,78485
RQDENTS	0,11709	0,70395	R3REL	-0,32179	0,67805
			INDEXSIF	0,21280	-0,60503

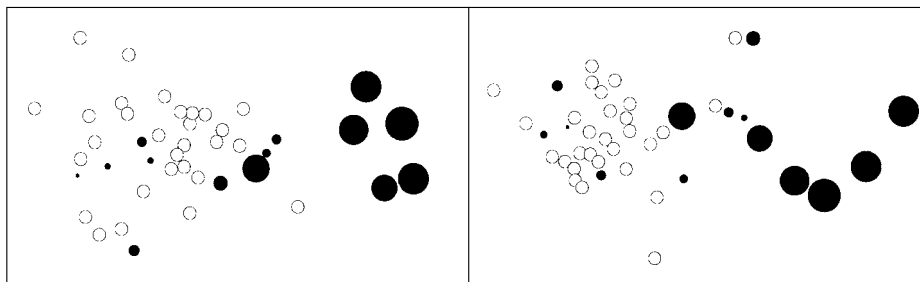


FIGURA 1. Representació gràfica de l'anàlisi factorial sobre dades morfològiques. Cada mostra amb presència d'autogènia és representada per un cercle negre de diàmetre proporcional al seu percentatge autogen. El cercle buit representa el percentatge zero.

Graphical representation of the factor analysis. Samples showing any autogeny level are depicted by black-filled spots; their diameter is relative to the autogeny level. Empty circles represent a level zero of autogeny.

xes variables que en l'anàlisi factorial. A la taula 4 hom hi ha resumit els resultats d'aplicar aquestes funcions discriminants als individus originals, per tal de verificar l'eficiència de l'anàlisi. L'aplicació de les funcions obtingudes per a reclassificar els individus va tenir el rendiment òptim en el grup de màxima autogènia (86,5 % d'encerts en les femelles i 84,5 % en els mascles). Globalment, el 64,4 % de les femelles i el 62,60 % dels mascles resultaren classificats correctament.

#### Polimorfisme enzimàtic als *loci* neutres

Entre tots els parells de *loci*, la independència només fou rebutjada per la interacció Sexe-*Pgi* (correlació 0,23,  $P = 0,004$ ). Aquesta manca d'independència no romangué significativa al nivell 0,05 quan es tingueren en compte els tests múltiples.

L'equilibri de Hardy-Weinberg fou rebutjat ( $P < 0,05$ ) en 40 de 158 proves (dades no presentades), un resultat superior a allò que s'esperava per l'atzar sota la hipòtesi nul·la.

TAULA 4. Anàlisi discriminant usant les variables morfològiques de *Culex pipiens*. Eficàcia en la reclassificació d'individus per grups d'autogènia. Les caselles amb classificacions correctes són en negreta.

Discriminant analysis based on *Culex pipiens*. morphological characteristics: efficiency of the classification of the individuals by autogeny group. Correct classification figures are shown in bold type.

GRUP REAL	GRUP PRONOSTICAT			N
	0 %	1 - 50 %	51 - 100 %	
<b>FEMELLES</b>	0 %	1 - 50 %	51 - 100 %	N
0 % Autogènia	<b>58,0 %</b>	30,2 %	11,8 %	507
1 - 50 %	22,2 %	<b>64,3 %</b>	13,5 %	126
51 - 100 %	7,7 %	5,8 %	<b>86,5 %</b>	156
<b>MASCLES</b>				
0 % Autogènia	<b>60,6 %</b>	30,6 %	8,9 %	350
1 - 50 %	30,1 %	<b>54,4 %</b>	15,5 %	103
51 - 100 %	11,3 %	4,2 %	<b>84,5 %</b>	71

TAULA 5. Equilibris de Hardy-Weinberg. Valors mitjans de  $F_{is}$  per cada *locus* i en cada tipus de biòtop. Els valors significatius ( $P < 0,05$ ) són en negreta.

Hardy-Weinberg equilibrium test: mean  $F_{is}$  values for each *locus* in each habitat type. Significant values ( $P < 0,05$ ) are shown in bold type.

<i>Locus</i>	TANCATS (O)		INTERMEDIS (U)		OBERTS (E)		TOTS	
	$F_{is}$	$P_d$	$F_{is}$	$P_d$	$F_{is}$	$P_d$	$F_{is}$	$P_d$
<i>Aat-1</i>	0,17	0,05	0,18	0,057	0,079	<b>0,002</b>	0,11	0,0006
<i>Aat-2</i>	0,50	<b>0,015</b>	0,56	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,27	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,35	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>
<i>Pgm</i>	0,17	<b>0,026</b>	0,22	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,18	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,19	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>
<i>Pgi</i>	0,029	<b>0,0002</b>	0,24	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,066	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,13	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>
Total	0,22	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,26	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,12	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>	0,16	<b>&lt;10<sup>-4</sup></b>

Quan la prova es realitzà sobre tots els *loci* en l'interior de cada mostra, l'equilibri hagué de ser descartat en 19 de les 45 mostres. 4 de les 19 romanien significatives sota els tests múltiples, existint-hi un clar dèficit d'heterozigots (dades no presentades).

Dins dels respectius tipus d'hàbitats (Taula 5), la  $F_{is}$  mitjana fou positiva per tots els *loci*, indicant un continuat dèficit d'heterozigots, que era significatiu ( $P_d < 0,05$ ) en 10 de 12

casos. Quan hom considerà tots els *loci* agrupats, foren evidents dèficits d'heterozigots significatius ( $P_d < 10^{-4}$ ) en tots els tipus d'hàbitat.

La diferenciació global de poblacions fou altament significativa ( $P < 10^{-5}$ ) corresponent a un valor  $F_{st}$  de 0,067 (Taula 8). Per tal d'estudiar la diferenciació de forma jerarquitzada hom considerà diferents grups. En primer lloc, la diferenciació entre els tres hàbitats

TAULA 6. Diferenciació entre poblacions de diferents biòtops, i entre biòtops, segons l'anàlisi dels *loci* neutres. Les probabilitats per l'error de tipus I del test exacte de  $F_{st}$  figuren entre parèntesi, i en negreta quan són significatives ( $P < 0,05$ ).

Differentiation among populations from different habitats and between habitats, according to the analysis of neutral loci. Type-I error probabilities of the  $F_{st}$  exact test are in brackets, and in bold type when significant ( $P < 0,005$ ).

	$F_{st}$					Nm	
	<i>Aat-1</i>	<i>Aat-2</i>	<i>Pgm</i>	<i>Pgi</i>	TOTS	Fst	A.privats
<b>Totes les mostres</b>							
	0,067 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,046 ( <b>0,001</b> )	0,034 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,090 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,067 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	3,5	—
<b>Entre hàbitats</b>							
O:U:E	0,010 ( <b>0,0055</b> )	0,014 ( <b>0,0030</b> )	0,019 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,12 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,055 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	4,3	6,0
O+U:E	0,0044 (0,063)	0,0037 (0,063)	0,010 ( <b>0,0012</b> )	0,023 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,013 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	19	4,0
O:U	0,021 ( <b>0,012</b> )	0,041 ( <b>0,00061</b> )	0,026 ( <b>0,00042</b> )	0,27 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,13 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	1,7	5,3
E:U	0,0075 ( <b>0,034</b> )	-0,0013 (0,57)	-0,0006 (0,49)	0,0023 (0,089)	0,0028 (0,055)	89	4,8
O:E	0,011 ( <b>0,017</b> )	0,0030 ( <b>0,0023</b> )	0,042 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,021 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,10 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	2,2	2,1
<b>Dintre d'hàbitats</b>							
O	0,091 ( <b>0,00020</b> )	-0,0095 (0,67)	0,034 ( <b>0,028</b> )	0,029 ( <b>0,010</b> )	0,051 ( <b>&lt;10<sup>-4</sup></b> )	4,7	3,7
U	0,047 ( <b>0,024</b> )	0,55 ( <b>0,0070</b> )	0,050 ( <b>0,002</b> )	0,0046 ( <b>0,021</b> )	0,032 ( <b>0,0001</b> )	7,6	3,4
E	0,063 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	0,034 ( <b>0,0027</b> )	0,012 (0,053)	0,029 ( <b>0,0039</b> )	0,037 ( <b>&lt;10<sup>-5</sup></b> )	6,5	—

(obert, subterrani tancat i intermedi) amb un resultat significatiu ( $P < 10^{-5}$ ), amb un valor  $F_{st}$  de 0,055 (Taula 6). En segon lloc, hom comparà els hàbitats superficials oberts amb el conjunt dels tancats més els intermedis, i la diferenciació també resultà significativa. En tercer lloc, les comparacions per parelles entre tots tres tipus d'hàbitat mostraren que els d'aire lliure i els intermedis no eren significativament diferenciats. Finalment, la diferenciació de poblacions fou també significativa dins de cada hàbitat per separat.

L'estimació del nombre de migrants efectius entre hàbitats o dins de cadascun d'ells forní resultats semblants, amb valors al voltant de 4. En foren excepció els hàbitats subterranis tancats, al voltant de 2 (Taula 6). Per tant, segons Wright (1969) excepte en intercanvis amb aquests hàbitats, el flux gènic era suficient per a anul·lar els efectes de la deriva.

### Resistència

Els fenotipus d'esterases més freqüents foren Nul i els resistents A1 i A4B4. Les estera-

ses A2B2 es trobaren únicament el 1993, en quatre punts veïns i en freqüència molt baixa. Aquesta fou la primera cita d'aquest fenotipus al sud dels Pirineus (Chevillon *et al.*, 1995b). Pel que fa a l'acetilcolinesterasa, ambdós al·lels, el resistent ( $Ace^R$ ) i sensible ( $Ace^S$ ) eren presents en freqüències variables. Dins de les mostres, només en un cas s'observaren desviacions significatives de l'equilibri de Hardy-Weinberg, a causa d'excés d'heterozigots ( $P = 0,0005$ ). En el conjunt de les mostres no hi havia cap tendència ( $P > 0,05$ ) ni de dèficit ni d'excés d'heterozigots.

S'estudià l'associació entre la composició d'esterases i l'acetilcolinesterasa durant la campanya de 1994. S'observà que dins de cada mostra, la combinació de tots els valors  $P$  confirmà la tendència general d'independència de la composició en acetilcolinesterasa respecte dels fenotipus d'esterases.

Entre mostres, però, la freqüència al·lèlica d' $Ace^R$  s'incrementà significativament amb la freqüència del fenotipus d'esterasa A4B4 (regressió logística,  $r = +0,56$ ,  $F_{1,25} = 11,56$ ,  $P < 0,01$ ) però no amb la freqüència del fenotipus A1 (regressió logística,  $r = 0,41$ ,  $F_{1,25} = 5,64$ ,  $P > 0,05$ ).

La freqüència de l'homozigot resistent  $Ace^{RR}$  i la freqüència al·lèlica d' $Ace^R$  foren les úniques variables que canviaren significativament entre anys, amb una freqüència mitjana major el 1994 que el 1993 (factor ANY,  $F_{1,55} \geq 10$ ,  $P < 0,005$ ,  $(a_2 - a_1) > 0$ ) (Taula 7).

Totes les variables que descriuen la composició dels gens de resistència (Nul, A1, A4B4,  $Ace^R$ ,  $Ace^{RR}$ ,  $Ace^{RS}$  i  $Ace^{SS}$ ) van variar significativament amb DIST ( $P < 0,03$  en tots els casos). Aquesta observació es correspon amb una disminució gradual en resistència als OP quan augmenta la distància a l'àrea tractada. Excepte per A1, no s'observaren canvis en aquest patró geogràfic entre 1993 i 1994 quan es substituï al model la variable DIST per la interacció ANY\*DIST ( $P > 0,1$ ). En el cas

de A1, però, el pendent de la clina decreixent de freqüències fou major el 1994 que el 1993.

Pel que fa als hàbitats, la separació entre biòtops subterranis tancats i tots els altres es correspongué també amb diferències en la composició d'al·lels de resistència. Les freqüències dels fenotipus A1 i A4B4, així com de l'acetilcolinesterasa insensible  $Ace^R$ , foren menors en hàbitats de tipus tancat que en tots els altres (prova de Fisher,  $P < 0,05$ ). Considerant només els hàbitats tancats, a més, la composició no varià al llarg dels dos anys. A4B4 no hi fou mai trobada, indicant potser contra-selecció local, i només A1 hi aparegué en freqüència molt baixa. La freqüència d' $Ace^R$  disminuï fortament entre 1993 (0,23) i 1994 (0,12). En general, la ja baixa freqüència d'al·lels resistents en els hàbitats subterranis tancats trobada el 1993 sofrí una tendència a disminuir encara més amb el temps.

### Pesticides residuals

Es detectaren OC i OP en les nou mostres d'aigua estudiades (Taula 8). Els plaguicides més abundants foren Chlordane pels OC i Azinphos i Malathion pels OP (no es presenten dades de productes individuals). Les concentracions màximes del conjunt d'OC i del d'OP foren de 1344 ng L<sup>-1</sup> i 487 ng L<sup>-1</sup> respectivament. Les concentracions totals conjuntes d'ambdues classes de productes anaren des de 443 fins a 1753 ng L<sup>-1</sup> (0,000443 fins a 0,001753 ppm). Aquests valors poden considerar-se mitjans o alts segons els publicats a la bibliografia existent (Fingler *et al.*, 1992; Mhlanga & Madziva, 1990).

### Discussió

Al Baix Llobregat, l'autogènia i l'estenogàmia foren significativament més freqüents als hàbitats subterranis tancats, però es confirma que no n'eren exclusives.

Taula 7. Anàlisi de la covariança de les freqüències dels al·lels de resistència en *Culex pipiens*. S'han pres en consideració l'any de mostreig (ANY), la distància al centre del delta (DIST), i la interacció (ANY\*DIST). Les clines de freqüències X són definides pel model  $\text{Logit}(X) = a_k + b_k \text{DIST}$  on  $k$  és l'any. Els valors significatius de  $F(P < 0,05$ , valors de  $P$  no mostrats) són en negreta, i en aquest cas es mostren els paràmetres. Han estat excloses les mostres subterrànies tancades. Covariance analysis on the frequency of resistance alleles in *Culex pipiens*. The factors were: the sampling year (ANY), the distance to the center of the delta (DIST), and their interaction (ANY\*DIST). Frequency clines X are defined according to a model  $\text{Logit}(X) = a_k + b_k \text{DIST}$  where  $k$  is the year. Significant values of  $F(P < 0,05$ , P values not shown) are in bold type, and the parameters are shown in these cases. Samples from closed underground habitats were excluded.

X Variables	ANY $H_0: a_1 = a_2$	DIST $H_0: b = 0$	ANY*DIST $H_0: b_1 = b_2$
Nul	$F_{1,67} = 1,2$	<b><math>F_{1,67} = 14,43</math></b> $b = 0,077 \pm 0,02$	$F_{1,66} = 0,8277$
A4B4	$F_{1,67} = 3,37$	<b><math>F_{1,67} = 11,4</math></b> $b = -0,07 \pm 0,022$	$F_{1,65} = 0,231$ <b><math>F_{1,66} = 4,21</math></b>
A1	$F_{1,67} < 2,61$ <b><math>F_{1,55} = 10</math></b>	<b><math>F_{1,67} = 5,345</math></b> $b = -0,06 \pm 0,028$	$B_1 = -0,05 \pm 0,027$ $B_2 = -0,12 \pm 0,044$
<i>Ace<sup>R</sup></i>	$a_2 - a_1 = 0,54 \pm 0,17$	<b><math>F_{1,54} = 14</math></b> $b = -0,06 \pm 0,01$	$F_{1,51} = 0,04$
<i>Ace<sup>SS</sup></i>	$F_{1,55} = 3,3$	<b><math>F_{1,55} = 7</math></b> $b = 0,07 \pm 0,02$	$F_{1,54} = 2,04$
<i>Ace<sup>RS</sup></i>	$F_{1,55} = 1,27$ <b><math>F_{1,55} = 16,2</math></b>	<b><math>F_{1,55} = 7,16</math></b> $b = -0,05 \pm 0,02$	$F_{1,54} = 0,12$
<i>Ace<sup>RR</sup></i>	$a_2 - a_1 = 1,05 \pm 0,28$	<b><math>F_{1,54} = 0,4</math></b> $b = -0,08 \pm 0,027$	$F_{1,53} = 2,8$

TAULA 8. Residus globals de plaguicides a l'aigua de nou punts de mostreig de la comarca del Baix Llobregat; OC i OP indiquen les concentracions d'organoclorats i organofosforats respectivament, en  $\text{ng L}^{-1}$ . Pesticide residues found in 9 water samples from the Baix Llobregat area; OC and OP indicate organochlorine and organophosphates, respectively. Concentrations are given in  $\text{ng.L}^{-1}$ .

	E49	E50	E53	E51	E52	E55	O07	E56	E57
O.C.	253	748	191	1.344	1.077	809	711	497	271
O.P.	345	464	63	409	16	487	347	303	172
TOTAL	598	1212	254	1753	1093	1296	1058	800	443

En general, l'autogènia implicava gairebé sempre l'estenogàmia, però a l'inrevés no va ésser pas certa. Per tant, l'estenogàmia no pot actuar com a mecanisme d'aïllament reproductor, anul·lant-se un dels principals arguments a favor de la segregació de formes.

La morfologia de *Culex pipiens* al Baix Llobregat presentà una forta variabilitat, que concorda amb el reconegut polimorfisme de l'espècie. Algunes variables resultaren significativament lligades a l'autogènia, com ara el nombre de dents del *pecten*, l'índex sifònic, i

la longitud dels palps maxil·lars en els mascles. L'estenogàmia i el grup de mostreig, essent factors concomitants amb l'autogènia, produïren els mateixos efectes.

Malgrat aquestes diferències morfològiques, les anàlisis estadístiques discriminants construïdes sobre la seva base només assoliren un 86 % de classificacions correctes. Per tant, aquests paràmetres perden la seva utilitat diagnòstica i no permeten la classificació dels individus.

L'anàlisi genètica revelà que existia una diferenciació entre els hàbitats subterranis tancats, on es trobaven les poblacions més autògenes i també morfològicament diferenciades, amb tots els altres hàbitats reunits. Però aquesta diferenciació entre dos grans grups no tenia prou rellevància, ja que també existia entre mostres del mateix grup, malgrat comprovar-se una forta taxa de migració entre hàbitats. Aquesta paradoxa fou relacionada amb les activitats humanes del control de mosquits. El nostre model de dinàmica de poblacions parteix d'una població adulta reduïda i delmada pel continu control larvari, així com de la disponibilitat de molts biòtops larvaris colonitzables. La conjunció d'ambdós factors implicaria abundants efectes fundadors locals, incrementant la deriva i provocant dèficits d'heterozigots, sense afectar per això les capacitats d'intercanvi genètic i migració. Noves extincions larvàries massives mantindrien aquest sistema, deixant lliures de competència els hàbitats larvaris i mantenint la població adulta a un nivell baix. Aquesta diferenciació genotípica podria ser també la responsable de la variabilitat morfològica observada, que en seria el reflex fenotípic.

Restà oberta en conseqüència la discussió sobre la influència que determinades extincions repetitives, mediatas per l'home o no, podrien tenir en la composició genètica de les poblacions.

La migració de mosquits entre hàbitats fou

confirmada també per la presència general d'al·lels de resistència, si bé alguns d'ells semblaven ser fortament contra-seleccionats als biòtops subterranis. Els al·lels A1, A4B4 i *Ace<sup>R</sup>* eren presents en freqüències elevades a l'exterior el 1993 i no disminuïren el 1994, malgrat que el control de mosquits no usà plaguicides químics que els seleccionessin; només una disminució dels costos biològics, o bé la selecció oculta per part d'altres plaguicides, podien explicar aquesta persistència en absència d'insecticides. En les anàlisis trobarem quantitats no menyspreables de residus de plaguicides; per tant, és factible una hipòtesi dual, que implicaria una disminució del cost de certs al·lels resistents, i al mateix temps el manteniment de lleus però persistents forces selectives exercides per pesticides d'origen agrícola.

Tant pel que feia a la fisiologia com a la morfologia i també a la composició genètica, fou palès que l'única distinció ecològica vàlida implicava separar els hàbitats subterranis i totalment tancats (on eren la majoria de les poblacions molt autògenes), de tots els altres.

## Conclusions

Els resultats d'aquest treball sobre el complex de *Culex pipiens* al Baix Llobregat descriuen poblacions d'autogènia elevada, distribuïdes preferentment en subsòls tancats, i presentant diferències morfològiques que no són diagnòstiques a cap tipus d'estudi. Tot i l'estructuració genètica entre hàbitats s'hi constata un elevat flux genètic, i per tant, es conclou que existeix un intercanvi, probablement durant tot l'any. Les diferències biomètriques observades són un aspecte colateral de la selecció local per l'autogènia. Tant l'estructuració genètica com l'alta variabilitat morfològica posen de manifest que les poblacions d'aquest mosquit a la zona no se-



gueixen una dinàmica totalment natural, sinó que són subjectes a extincions massives i repetitives causades per les activitats de control. Totes les dades reunides no permeten separar els grups observats, sinó que més aviat al contrari, confirmen el profund politipisme de la població o metapoblació de *Culex pipiens* al Baix Llobregat.

## Agraïments

Els autors expressen llur reconeixement al Consell Comarcal del Baix Llobregat pel suport de tot tipus donat a aquest treball. El personal del Servei de Control de Mosquits, d'aquest mateix Consell, col·laborà en la recollida de mostres i proveí suport tècnic. Les anàlisis genètiques es realitzaren al *Laboratoire de Génétique et Environnement* dirigit per Nicole Pasteur a la Universitat de Montpellier. Manel Almarcha i Joan Rovira executaren les anàlisis cromatogràfiques i en discutiren els resultats; i Toni Arcas prestà assessorament estadístic.

## Bibliografia

- BULLINI, L. 1982. Genetic, ecological, and ethological aspects of the speciation process. *Mechanisms of Speciation*, Alan R. Liss Ed., New York. P. 241-264.
- CALLOT, J. & VAN TY, D. 1943. Sur quelques souches françaises de *Culex pipiens* L. *Bull. Soc. path. Exot.* XXVI: 229-232.
- CALLOT, J. 1948. La vie hivernale de *Culex autogenicus* Roubaud. *La Feuille des naturalistes* III: 79-80.
- CALLOT, J. 1954. Le rapport trompe/palpes dans les biotypes du complexe *Culex pipiens* et leurs hybrides. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 29: 131-134.
- CHEVILLON, C.; PASTEUR, N.; MARQUINE, M.; HEYSE, D. & RAYMOND, M. 1995a. Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 49: 997-1007.
- CHEVILLON, C.; ERITJA, R.; PASTEUR, N. & RAYMOND, M. 1995b. Commensalism, adaptation and gene flow: mosquitoes of the *Culex pipiens* complex in different habitats. *Gen. Res. Camb.* 66: 147-157.
- CHOOCHOTE, W. 1987. Observations on the D/V ratio of male genitalia of *Culex pipiens* complex in Amphur Muang Chiang Mai, northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Trop. Medic. and Public Health* 18(1): 115-120.
- CURTIS, C.F.; COOK, L. M. & WOOD, R. J. 1978. Selection for and against insecticide resistance and possible methods of inhibiting the evolution of resistance in mosquitoes. *Ecological Entomology* 3: 273-287.
- DETINOVA, T. S. 1963. Méthodes à appliquer pour classer par groupes d'âge les diptères présentant une importance médicale. *Organisation Mondiale de la Santé*, Genève, 220 p.
- ERITJA, R. 1998. Anàlisi integrada sobre dues formes ecològiques de *Culex (Culex) pipiens* Linné 1758 (Diptera: Culicidae) al Baix Llobregat. *Tesi doctoral*. Ed. Consell Comarcal del Baix Llobregat. 292 p.
- FINGLER, S.; DREVENKAR, V.; TKALCEVIC, B & SMIT, Z. (1992) Levels of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and chlorophenols in the Kupa river and in drinking waters from different areas in Croatia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 805-812.
- FISHER, R. A. 1970. *Statistical Methods for Research Workers*. 14th ed. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- GUO, S. W. & THOMPSON, E. 1992. Performing the exact test of Hardy Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- HALDANE, J. B. S. 1954. An exact test for randomness of mating. *Genetics* 52: 631-635.
- HARBACH, R. E.; HARRISON, B. A. & GAD, A. M. 1984. *Culex (Culex) molestus* Forskål (Diptera: Culicidae): neotype designation, description, variation, and taxonomic status. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 86(3): 521-542.
- HARBACH, R. E. 1985. Pictorial keys to genera of mosquitoes, subgenera of *Culex* and the species of *Culex (Culex)* occurring in southern Asia and Egypt, with a note on the subgeneric placement of *Culex deserticola* (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 17(2): 83-107.
- HOLM, S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6: 65-70.
- ISHII, T. 1967. On the *Culex pipiens* group in Japan, Part II. 1. Some larval characters of autogenous *Culex pipiens* L. collected in Sendai (Diptera, Culicidae). *Sci. Rep. Tôhoku Univ. Ser IV* 33: 509-517.
- ISHII, T. 1979. On the *Culex pipiens* group in Japan, Part III. A Historical Review of its Research. 3. Review of the adult characters (2). *J. Sci. Univ. of Tokushima V* (12): 43-60.
- ISHII, T. 1981. On the *Culex pipiens* Group in Japan, Part III. A Historical Review of its Research. 5. Review of the larval characters (1). *J. of Sci. Univ. of Tokushima V* (14): 89-105.
- ISHII, T. 1983. On the *Culex pipiens* Group in Japan Part III. A Historical Review of its Research 7. Review of the larval characters (3). *J. Sci. Univ. of Tokushima* 16: 27-109.

- JOBLING, B. 1938. On two subspecies of *Culex pipiens* L. (Diptera). *Trans. R. Ent. Soc. Lond.* 87(8): 193-216.
- KNIGHT, K. L. 1951. A review of the *Culex pipiens* complex in the mediterranean subregion (Diptera, Culicidae). *Trans. R. Ent. Soc. Lond.* 102 (7): 354-364.
- KRUPPA, T. 1988. *Vergleichende Untersuchungen zur Morphologie und Biologie von drei Arten des Culex pipiens - Komplexes*. Dissertació per Tesi doctoral Univ. Hamburg, 72 p. + 68.
- LOUIS, E. J. & DEMPSTER, E. R. 1987. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics* 43: 805-811.
- MANI, G. S. 1985. Evolution of resistance in the presence of two insecticides. *Genetics* 109:761-783.
- MARSHALL, J. F. & STALEY, J. 1937. Some notes regarding the morphological and biological differentiation of *Culex pipiens* Linnaeus and *Culex molestus* Forskål (Diptera, Culicidae). *Proc. R. Ent. Soc. Lond.* (A) 12 (1-2) Feb. 17-26.
- MHLANGA, A. & MADZIVA, T. J. 1990. Pesticide residues in lake McIlwaine, Zimbabwe. *AMBIO* 19: 368-372.
- PACKER, M. J. & CORBET, P. 1989. Size variation and reproductive success of female *Aedes punctator* (Diptera: Culicidae). *Ecological Entomology* 14: 297-309.
- PASTEUR, N. & SINÈGRE, G. 1975. Esterase polymorphism and sensitivity to Dursban organophosphorous insecticide in *Culex pipiens pipiens* populations. *Biochem. Genet.* 13: 789-803.
- PASTEUR, N.; RIOUX, J. A. & GUILVARD, E. 1977. Nouvelle mention, pour le Midi méditerranéen, de populations naturelles anautogènes et sténogames de *Culex pipiens pipiens* L. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 52(2): 205-210.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; CATALAN, J.; BONHOMME, F. & BRITTON-DAVIDIAN, J. 1988. *Practical Isozyme Genetics*. John Willey and Sons / Ellis Horwood Ltd., Chichester, England.
- RAYMOND, M. & MARQUINE, M. 1994. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* populations: the Corsican paradox. *Jour. Evol. Biol.* 7: 315-337.
- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- RAYMOND, M.; CALLAGHAN, A.; FORT, P. & PASTEUR, N. 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 350 (14): 151-153.
- RIBEIRO, H.; PIRES, C.A. & RAMOS, H. 1983. Research on the mosquitoes of Portugal (Diptera, Culicidae) VIII - On the occurrence of *Culex (Culex) molestus* Forskål, 1755. *J. Soc. Cienc. Med.(Lisboa)*, 147(3): 185-188.
- ROUBAUD, M. E. 1929. Cycle autogène d'attente et générations hivernales suractives inapparentes chez le moustique commun, *Culex pipiens*. *C.R. Acad. Sci. Paris* 188: 735-738.
- ROUSSET, F. & RAYMOND, M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140: 1413-1419.
- SASA, M.; SHIRASAKA, A.; WADA, Y. & KANDA, T. 1967. Comparative studies on some morphological and physiological characters of the *Culex pipiens* complex of Japan and Southern Asia. *Japan. J. Exp. Med.* 37(5): 475-504.
- SLATKIN, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- SOHN, S. R. & ISHII, T. 1989. The male genitalia in *Culex pipiens* collected in Taegu, South Korea. *Mosq. Syst.* 21 (2): 67-76.
- SUNDARARAMAN, S. 1949. Biometrical studies on intergradation in the genitalia of certain populations of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* in the United States. *Am. J. of Hyg.* 50: 307-314.
- TATE, P. & VINCENT, M. 1936. The biology of autogenous and anautogenous races of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitology* 28: 115-145.
- WEIR, B. S. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer Publishers, Sunderland, MA, USA.
- WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- WRIGHT, S. 1969. *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 2. The theory of gene frequencies*. University Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- YATES, F. 1955. A note on the application of the combination of probabilities test to a set of 2 x 2 tables. *Biometrika* 42: 404-411.