



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

Profesor patrocinante:
Dr. Christian Figueroa Caro
Instituto de Ecología y Evolución
Facultad de Ciencias

Aspectos genéticos y bioquímicos de la especialización sobre tabaco en áfidos

Myzus persicae (Sulzer)

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y al Título
profesional de ***Bioquímico***

Marco Andrés Cabrera Brandt

Valdivia, Chile

2007

*“A Dios y mi familia...
...gracias”*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar al Dr. Christian Figueroa, por guiarme y apoyarme con sabios consejos en esta etapa de mi formación académica y profesional.

Quiero también hacer partícipes de mis agradecimientos a los profesores informantes Dra. Gudrun Kausel y Dr. Jaime Figueroa, por aceptar amablemente formar parte de la comisión evaluadora, y por aportar con su experiencia en la corrección de esta tesis.

Al Dr. Eduardo Fuentes Contreras, por su fundamental apoyo durante mis estadías en la Universidad de Talca.

También quiero agradecer a mis compañeros y amigos, y en especial a Felipe Sepúlveda, por su amistad desinteresada e incondicional.

A toda mi familia, en especial a Gladys, Marquito y Matías, quienes siempre han estado a mi lado apoyándome. Sin su amor y comprensión, no podría haber llegado hasta éste punto.

Agradezco en general a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, han contribuido en mi formación como bioquímico y persona.

Esta tesis fue financiada por los proyectos FONDECYT 3020051 y 1050644, y PBCT-Anillos ACT38 a CCF, y DID UACH.

TABLA DE CONTENIDOS

1 RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	3
2 INTRODUCCIÓN	5
2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO	10
2.2 OBJETIVOS GENERALES	11
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 ÁFIDOS	13
3.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE <i>MYZUS PERSICAE</i> MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES	15
3.3 DIFERENCIACIÓN GENOTÍPICA ENTRE CLONES DE LAS RAZAS GENERALISTA Y ESPECIALIZADA EN TABACO	16
3.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	17
3.4.1 EST	18
3.4.2 GST	18
3.4.3 OFM	19
3.4.4 PROTEÍNAS TOTALES	20
3.5 ANÁLISIS DE DATOS	20
4 RESULTADOS	21

4.1 GENOTIPIFICACIÓN	21
4.2 DIFERENCIAS GENÉTICAS ENTRE RAZAS	21
4.3. ACTIVIDAD DE EST	27
4.4 ACTIVIDAD DE GST	27
4.5 ACTIVIDAD DE OFM	28
5 DISCUSIÓN	36
5.1. ASPECTOS GENÉTICOS	36
5.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS	36
6. CONCLUSIONES	39
7. PERSPECTIVAS	40
8 REFERENCIAS	41
9 ANEXO: Listado de los reactivos comerciales utilizados en esta tesis	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Mpp: *Myzus persicae persicae*.

Mpn: *Myzus persicae nicotianae*.

GST: Glutación S transferasa.

EST: Esterasas.

OFM: Oxidasas de Función Múltiple.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Sitios de recolección de <i>Myzus persicae persicae</i> y <i>Myzus persicae nicotianae</i> en Chile Central	14
FIGURA 2: Gel de poliacrilamida 6%-urea 7M, teñido con nitrato de plata, en el que se muestran (flechas) algunos productos de amplificación (alelos microsatelitales) para <i>Myzus persicae</i>	22
FIGURA 3: Árbol del vecino más cercano construido usando la distancia genética D_{AS} , que ilustra el grado de parentesco genético entre los diferentes genotipos de <i>Myzus persicae</i> analizados	26
FIGURA 4: Actividades enzimáticas de EST, GST y OFM determinadas en los genotipos Myz 1 (a, c y f) y Myz 2 (b, d y g), a las 12, 24, 36, 48 y 72 horas de crecimiento sobre tabaco (barras sin colorear) y pimentón (barras negras)	29

ÍNDICE DE TABLAS

<p>TABLA 1: Genotipos multilocus de <i>Myzus persicae</i> caracterizados en este estudio usando 10 loci microsatélites. Se muestra además el rango de tamaño y el número de alelos informados previamente para cada locus</p>	23
<p>TABLA 2: Índices de diversidad genética de <i>Myzus persicae</i> en Chile, calculados a partir de la identidad genotípica con 10 loci microsatélites de los genotipos multilocus de <i>Myzus persicae</i></p>	24
<p>TABLA 3: Distancia genética D_{AS} entre los genotipos multilocus caracterizados para el complejo <i>Myzus persicae</i> en Chile</p>	25
<p>TABLA 4: Actividades enzimáticas de Esterasas en <i>M. persicae nicotianae</i> (n = 30 por condición), luego de transcurridas 12, 24, 36, 48 y 72 horas desde el cambio de planta hospedera (a: <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre tabaco; b: <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre pimentón) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar)</p>	30
<p>TABLA 5: Actividades enzimáticas de Esterasas en <i>M. persicae persicae</i> (n = 30 por condición), luego de 12, 24, 36, 48 y 72 horas desde cambio de planta hospedera (a: <i>Myzus persicae persicae</i> sobre pimentón; b: <i>Myzus persicae persicae</i> sobre tabaco) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar)</p>	31
<p>TABLA 6 Actividades enzimáticas de GST en <i>M. persicae nicotiane</i> (n = 30 por condición), a las 12, 24, 36, 48 y 72 horas después del cambio de planta hospedera (a: <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre tabaco;</p>	

b: <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre pimentón) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar)	32
---	----

TABLA 7: Actividades enzimáticas de GST en *M. persicae persicae*

(n = 30 por condición), después de 12, 24, 36, 48 y 72 horas de haber sido trasladados a una nueva planta hospedera (a: <i>Myzus persicae persicae</i> sobre pimentón; b: <i>Myzus persicae persicae</i> sobre tabaco) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar)	33
---	----

TABLA 8: Actividades enzimáticas de OFM en *M. persicae nicotianae*

(n = 30 por condición), luego de transcurridas 12, 24, 36, 48 y 72 horas desde el cambio de planta hospedera (a: <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre tabaco; b: <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre pimentón) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar)	34
--	----

TABLA 9: Actividades enzimáticas de OFM en *M. persicae persicae*

(n = 30 por condición), después de 12, 24, 36, 48 y 72 horas de haber sido trasladados a una nueva planta hospedera (a: <i>Myzus persicae persicae</i> sobre pimentón; b: <i>Myzus persicae persicae</i> sobre tabaco) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar)	35
---	----

1 RESUMEN

Los procesos adaptativos en insectos fitófagos están fuertemente relacionados con mecanismos metabólicos que les permiten superar las defensas químicas de sus plantas hospederas.

Los áfidos son insectos fitófagos ubicuos que constituyen plagas agrícolas, dentro de los cuales destaca *Myzus persicae*, una especie altamente generalista que, sin embargo, sobre tabaco ha desarrollado fenotipos altamente especializados.

Para iniciar estudios sobre procesos de especialización, se requieren conocer los aspectos genéticos y bioquímicos involucrados en la adaptación de *Myzus persicae* (Sulzer) a su planta hospedera. Para ello, se caracterizó la variabilidad genética de esta especie sobre distintos hospederos en Chile, utilizando 10 loci microsatélites. Luego, se evaluaron y compararon las actividades de enzimas involucradas en el metabolismo detoxificador Esterasas (EST), Glutación-S-transferasa (GST) y Oxidasas de función múltiple (OMF) entre dos genotipos, uno generalista y otro especialista, tras 12, 24, 36, 48, 72 horas de ser trasladados a plantas de tabaco y pimentón.

La diversidad genética total fue baja (15 genotipos; $D = 0.19$), mientras la heterocigosidad observada fue alta (>70%), comparada con poblaciones sexuales de la misma especie, sugiriendo que en las poblaciones chilenas predomina la partenogénesis como modo de reproducción. Al comparar esta diversidad genética entre plantas hospederas, se identificó un único genotipo presente sobre tabaco. Diferencias en cuanto a las actividades enzimáticas se observaron solo para el genotipo especialista, el cual presentó una alta actividad de Esterasas generales tras 48 horas de ser trasladado a tabaco.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de la existencia de una raza diferenciada sobre tabaco, en cuyo proceso de especialización participarían mecanismos enzimáticos de detoxificación.

1.1 SUMMARY

The adaptive processes in phytophagous insects are strongly related to enzymatic mechanisms of detoxification that allow insects to face plant chemical defenses. Aphids are ubiquitous phytophagous insects that frequently constitute agricultural pests. One of the most generalist aphid species is *Myzus persicae* (Sulzer), being able to feed on more than forty plant families. Interestingly, on tobacco this species has evolved a particularly well adapted race, which has rarely been observed on other hosts.

In order to begin studies on specialization processes, it is necessary to know the genetic and biochemical aspects involved in the adaptation of *Myzus persicae* (Sulzer) to their host plants. With this goal, the genetic variability of *M. persicae* on different hosts in Chile was assessed by using 10 microsatellites loci, and the activities of different enzymes involved in detoxification metabolism evaluated, including Esterases (EST), Glutathion-S-transferase (GST) and Multiple Function Oxidase (MFO). These assays were performed in two genotypes: one generalist and other specialist, at 12, 24, 36, 48, 72 hours after being transplanted to tobacco and pepper plants.

The overall genetic diversity was low (15 genotypes; $D = 0.19$) and the observed heterozygosity was high ($> 70\%$), in relation to sexual populations of this species, suggesting that parthenogenesis is the main reproductive mode in Chilean populations. A comparison of the genetic diversity among host plants evidenced only one genotype on tobacco. Significant differences in enzymatic activities were observed in the specialized genotype, which exhibited a high Esterase activity after 48 h. of rearing on tobacco.

The results support the hypothesis regarding the existence of a highly differentiated race on tobacco, which evolved throughout a specialization process mediated by enzymatic mechanisms.

2 INTRODUCCIÓN

Coevolución planta-insecto

El proceso co-evolutivo entre plantas e insectos fitófagos es el resultado de una interacción recíproca explicada mediante selección natural, que ha involucrado sistemas de defensa y contradefensa (Ehrlich y Raven, 1964; Jermy y cols., 1984; Futuyama y cols., 1988; Jaenike y cols., 1990; Futuyama y cols., 1991; Scriber y cols., 2002; Ballabeni y cols., 2003; Jermy y cols., 2003). Los procesos que conducirían la evolución de estos organismos, serían los responsables de la promoción de nuevos biotipos o razas especializadas de insectos fitófagos, lo que finalmente podría conducir a la formación de nuevas especies (Ehrlich y Raven, 1964; Via, 2001).

Los insectos fitófagos ejercen una presión de herbivoría sobre sus plantas hospederas al alimentarse de ellas. Estas presiones selectivas han promovido el desarrollo de mecanismos de defensa en las plantas para evitar ser consumidas (Brattsen, 1992; Berenbaum y Zangerl, 1998). Estas defensas incluyen tanto barreras físicas (espinas, pelillos urticantes, tricomas, secreción de resinas adhesivas, etc.), que tienen por finalidad dificultar la colonización de la planta por parte de los insectos, así como barreras químicas, principalmente aleloquímicos, tales como metabolitos secundarios (glucósidos iridoides, furanocumarinas, terpenos, ácidos hidroxámicos, etc.), los cuales provocan efectos nocivos sobre el insecto, incluyendo efectos antialimentarios, antibióticos y deterrentes. Estos mecanismos defensivos químicos juegan uno de los roles más significativos en esta relación interespecífica (Berenbaum y Zangerl, 1998).

Metabolismo de defensa en insectos fitófagos

Para alimentarse de sus plantas hospederas, los insectos fitófagos han desarrollado sistemas metabólicos para superar las defensas químicas producidas por sus plantas hospederas. Estos sistemas de defensa involucran principalmente mecanismos de detoxificación basados en sistemas enzimáticos, los cuales pueden catalizar la degradación de aleloquímicos (principalmente apolares) producidos por las plantas, transformándolos en compuestos polares de menor toxicidad y fácil eliminación. Entre estos destacan enzimas como las Esterasas, Oxidasas de Función Múltiple, y Glutación *S*-transferasa (Ahmad y cols., 1986; Halkier y Du, 1997; Berenbaum y Zangerl, 1998; Müller y cols., 2003).

Las Esterasas (EST) constituyen una gran familia de enzimas implicadas en la detoxificación de glicósidos fenólicos, carboxilesteres, amidas, terpenos y tioesteres, los cuales se encuentran unidos a una gran variedad de compuestos. La importancia relativa de estas enzimas está dada por su participación en el metabolismo de insecticidas organofosforados, y su rol en la generación de resistencia a insecticidas (Lindroth, 1989; Xinzhi y Sharron, 2003).

Las Oxidasas de Función Múltiple (OFM), son una familia de enzimas encontradas en muchas especies animales incluyendo insectos, que cumplen un importante rol en la degradación de esteroides y hormonas juveniles en insectos hemi y holometábolos, así como en la degradación de compuestos químicos de origen natural (por ej. fitotoxinas) o sintético (por ej. insecticidas). Un ejemplo de estas funciones es la capacidad que posee la mosca *Drosophila* del desierto de Sonora para metabolizar alcaloides isoquinolonas producidos por su planta hospedera, el cactus Senita (Danielson y cols., 1998).

En los insectos, la enzima Glutación S transferasa (GST) participa activamente en la detoxificación de xenobióticos, catalizando la conjugación de sustratos electrofilicos con glutación (GSH) (Francis y cols., 2001; Sheehan y cols., 2001).

Los áfidos como modelo de estudio

Los áfidos (Hemíptera: Aphididae) son insectos fitófagos ampliamente distribuidos alrededor del mundo que frecuentemente constituyen plagas agrícolas. Los áfidos exhiben características de plaga debido al daño directo que producen sobre su planta hospedera a través de la ingestión del floema, a la acumulación de fumagina, a su capacidad para transmitir virus fitopatógenos, y a su alta tasa de reproducción, la que puede alternar reproducción sexual con partenogénesis (Minks y Harrewijn, 1987; Moran y cols., 1992; Simon y cols., 2002).

El impacto económico que causan los áfidos es altamente significativo debido a que muchas especies que atacan cultivos agrícolas son polífagas, siendo capaces de atacar un amplio espectro de plantas hospederas, incluso con características químicas muy disímiles. Esta característica influye en que la estructura genética de las poblaciones de áfidos y el fenotipo de los áfidos estén fuertemente relacionados con sus plantas hospederas (De Barro y cols., 1995; Simon y Hebert, 1995; Lushai y cols., 1998; Vanlerberghe-Masuti y Chavigny, 1998; Figueroa y cols., 2004; Figueroa y cols., 2005).

Debido al creciente intercambio comercial, los áfidos se han distribuido por todo el mundo viajando como “polizones” durante el intercambio comercial. Entre las especies de áfidos destaca *Myzus persicae* (Sulzer), una especie altamente generalista, capaz de atacar más de 40 familias vegetales, incluyendo cultivos tan diversos como remolacha, hortalizas (crucíferas,

solanáceas y cucurbitáceas) y frutales de carozo (Van Emden y cols., 1969; Blackman y Eastop, 2000).

Especialización en áfidos

Al igual que en muchas especies de insectos fitófagos, los procesos adaptativos mediados por selección que enfrentan los áfidos al colonizar una nueva planta hospedera, son facilitados en parte por mecanismos enzimáticos de detoxificación, los cuales se encargan de la metabolización de fitotoxinas, aleloquímicos y compuestos deterrentes producidos por las plantas para evitar ser consumidas (Leszczynski y cols., 1994; Figueroa y cols., 1999a; Loayza-Muro y cols., 2000; Mukanganyama y cols., 2002; Fuentes-Contreras y cols., 2004; Francis y cols., 2005).

En el caso de *M. persicae*, una especie altamente generalista, se ha observado la existencia de una raza particularmente bien adaptada al tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) denominada *M. persicae nicotianae*, la que rara vez ha sido detectada sobre otros hospederos (Blackman, 1987). Aunque inicialmente se pensó que tanto la raza generalista (*M. persicae persicae*) como la especializada en tabaco, correspondían a especies distintas, una serie de estudios utilizando marcadores moleculares revelaron que *M. persicae nicotianae* no es una especie propiamente tal, sino que es una raza de *M. persicae* altamente especializada en tabaco (Margaritopoulos y cols., 2000).

Se ha hipotetizado que *M. persicae nicotianae* sería un punto intermedio en la formación de una nueva especie de áfido que tiene el atributo de poder superar las defensas producidas por el tabaco, rasgo del cual carecería la raza generalista *M. persicae persicae* (Margaritopoulos y cols., 2000). Este alto grado de especialización debe tener una base genético/bioquímica, la cual

explicaría la capacidad de las razas generalista y especialista de colonizar y adaptarse a plantas hospederas con características químicas diferentes.

Consecuentemente, el objetivo de la presente tesis es describir preliminarmente las bases genéticas y metabólicas involucradas en la adaptación y especialización de *M. persicae* *nicotianae* al tabaco. Con este fin, se caracterizaron los genotipos de la población chilena de *M. persicae*, para conocer el grado de diferenciación genética que presenta la raza especializada en tabaco con respecto a la raza generalista, para luego estudiar las diferencias en cuanto al metabolismo detoxificador entre ambas razas, comparándose las actividades enzimáticas de Esterasas generales, Glutación S-transferasa y Oxidasas de función múltiple.

2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Las poblaciones de áfidos de *Myzus persicae* generalistas y especializadas en tabaco son genotípicamente diferentes.
- Los sistemas enzimáticos detoxificadores de compuestos aleloquímicos de *Myzus persicae* de la raza generalista y de la raza especializada en tabaco, exhiben actividades distintas cuando estos áfidos son crecidos sobre pimentón y tabaco.

2.2 OBJETIVOS GENERALES

- I. Caracterizar genótipicamente los clones pertenecientes a las razas generalista y especializada en tabaco utilizando marcadores moleculares.

- II. Determinar las actividades enzimáticas de los principales sistemas detoxificadores de *M. persicae*, cuando los áfidos son crecidos en diferentes condiciones experimentales (plantas hospederas).

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I.1. Colectar áfidos *Myzus persicae* desde diferentes hospederos y crecerlos en el laboratorio bajo condiciones ambientales controladas, con el fin de asegurar su reproducción partenogenética.

I.2. Genotipificar los clones de áfidos *M. persicae* provenientes de diferentes hospederos, y determinar si corresponden a áfidos de la raza generalista o especializada en tabaco, usando marcadores microsatelitales.

I.3. Determinar el grado de similitud genética entre los diferentes genotipos caracterizados, para calcular el grado de diferenciación genética entre poblaciones.

I.4. Elegir dos genotipos de *M. persicae*, uno de cada raza, que exhiban las mayores diferencias genéticas para desarrollar los experimentos bioquímicos.

II.1. Crecer los dos genotipos de *M. persicae* elegidos (uno de la raza generalista y el otro especializado en tabaco) sobre distintas plantas hospederas (pimentón y tabaco) y a diferentes tiempos, para determinar las actividades enzimáticas de EST, OFM y GST en relación a la planta hospedera.

II.2. Determinar la existencia de diferencias entre las actividades enzimáticas de acuerdo con cada uno de los tratamientos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ÁFIDOS

Un total de 80 clones de *Myzus persicae* pertenecientes tanto a la raza generalista como a la especializada en tabaco, fueron recolectados entre Rancagua y Chillán (Fig. 1). Los individuos de *M. persicae persicae* fueron recolectados desde Yuyo (*Brassica spp.*), Remolacha (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*), Duraznero (*Prunus persica*), Ciruelo (*Prunus domestica*), Quinguilla (*Chenopodium album*), Chamico (*Datura stramonium*) y Duraznillo (*Polygonum sp.*), mientras que los individuos de *M. persicae nicotianae* fueron todos recolectados desde cultivos de tabaco. Los áfidos fueron transportados vivos al laboratorio de Ecología y Evolución Molecular del Instituto de Ecología y Evolución de la Universidad Austral de Chile, donde se procedió a criarlos individualmente bajo condiciones ambientales controladas de temperatura (20°C) y fotoperíodo (16 horas luz: 8 horas oscuridad), las que garantizan su reproducción partenogenética. De esta forma, cada individuo generó una colonia o linaje genéticamente idéntico (clón). Los individuos de *M. persicae persicae* fueron mantenidos sobre pimentón, mientras los de *M. persicae nicotianae* fueron mantenidos sobre tabaco, debido al buen desempeño (*performance*) que exhiben sobre estas plantas (Nikolakakis y cols., 2003).

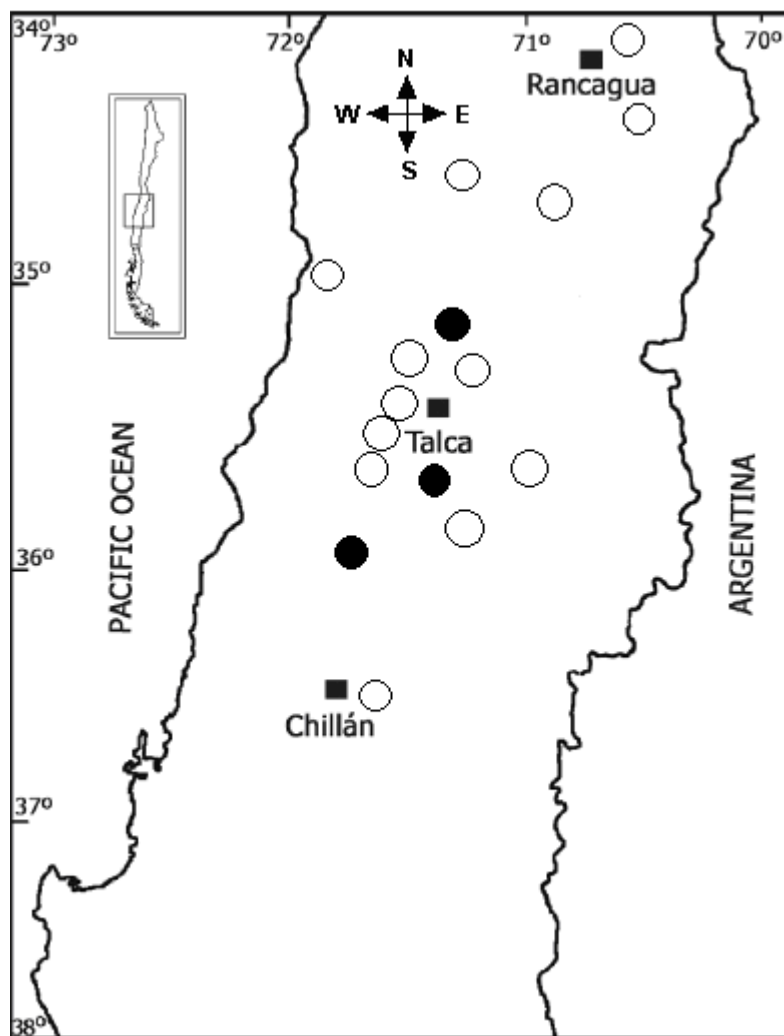


Figura 1: Sitios de recolección de *Myzus persicae persicae* (○) y *Myzus persicae nicotianae* (●) en Chile Central.

3.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE *Myzus persicae* MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

Con el fin de (i) identificar los genotipos de *M. persicae* en Chile y (ii) de determinar el grado de diferenciación genotípica entre las razas generalista y especializada en tabaco, todos los individuos fueron genotipificados mediante marcadores genéticos del tipo microsatélites, descritos previamente en la literatura (Sloane y cols., 2001; Wilson y cols., 2004). Para ello, se realizó una extracción de DNA a partir de un único individuo proveniente de cada uno de los 80 clones crecidos en el laboratorio. Con el DNA extraído, se procedió a la amplificación de 10 loci microsatélites mediante PCR, correspondientes a los loci M35, M37, M40, M77, M86, M107, Myz2, Myz3, Myz9 y Myz25 (Sloane y cols., 2001; Wilson y cols., 2004). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 6%-urea 7M y teñidos con nitrato de plata. El tamaño de los alelos microsatelitales se determinó por comparación del tamaño de cada fragmento PCR respecto a un estándar correspondiente a la secuenciación del vector pGEM – 3ZF (+) (Promega). Para cada locus se obtuvieron alelos (fragmentos de PCR) de un tamaño que generalmente estuvo dentro del rango informado en la literatura (Tabla 1, Fig. 2) (Terradot y cols., 1999; Sloane y cols., 2001; Zitoudi y cols., 2001; Fuentes-Contreras et al., 2004; Wilson y cols., 2004).

3.3 DIFERENCIACIÓN GENOTÍPICA ENTRE CLONES DE LAS RAZAS GENERALISTA Y ESPECIALIZADA EN TABACO

Considerando el total de clones analizados ($n = 80$), se procedió a calcular algunos de los principales parámetros que describen el grado de diversidad genética a nivel poblacional, incluyendo la diversidad alélica (A), la heterocigosidad observada (H_o) y el índice de diversidad genética de Nei. Utilizando el programa POPULATION versión 1.2.01 (disponible en <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo>), se determinaron las diferencias entre las poblaciones de *M. persicae* sobre tabaco y sobre otros hospederos muestreados (remolacha, duraznero, ciruelo, yuyo, duraznillo, quinguilla y chamico). Un análisis del parentesco entre los genotipos fue realizado utilizando la distancia genética D_{AS} (distancia de alelos compartidos) de acuerdo con Jin & Chakraborty (1993), con lo cual se construyó un árbol del vecino más cercano (Neighbour Joining Tree), el cual permite observar gráficamente las relaciones de parentesco (similitud genética) entre los distintos genotipos de *M. persicae* caracterizados, usando el programa TREEVIEW versión 1.6.6.

3.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Con el fin de estudiar el rol del metabolismo detoxificador en la diferenciación de las razas generalista y especializada en tabaco, se decidió trabajar con aquellos genotipos de *M. persicae persicae* y *M. persicae nicotianae* que exhibieran las mayores diferencias genéticas (Tabla 3 y Fig. 3). Para ello, se eligieron los genotipos Myz 2, como representante de la raza generalista, y Myz 1 correspondiente a la raza especializada en tabaco.

Para investigar si las enzimas detoxificadoras descritas para otras especies de insectos fitófagos, están o no relacionadas con la capacidad de *M. persicae* de alimentarse sobre tabaco, se evaluaron actividades enzimáticas en los dos genotipos elegidos crecidos sobre pimentón y tabaco. Para ello, áfidos adultos sincronizados en 12 horas, pertenecientes a ambos genotipos, y crecidos inicialmente sobre pimentón y tabaco, respectivamente, fueron transferidos tanto a su misma planta hospedera inicial (control) como a una planta diferente (tratamiento tabaco a pimentón y pimentón a tabaco). Después de 12, 24, 36, 48 y 72 horas de tratamiento, los áfidos fueron removidos de sus plantas, para proceder con la determinación de las actividades enzimáticas de EST, GST y OFM a partir de material fresco (30 mediciones por condición; 1800 mediciones de actividad enzimática en total).

La actividad de EST se determinó por diferencia de absorbancia, mientras que las actividades de GST y OFM se determinaron mediante fluorometría. También se determinaron las proteínas totales usando el método de Bradford (1976), el que permite determinar la concentración de proteínas totales a través de diferencia de absorbancia. Tanto para la medición de actividades enzimáticas, como para la determinación de proteínas totales, se usó un lector de microplacas Wallac 1420 Workstation Victor 3 (Perkin Elmer), en el Laboratorio de Entomología del Dr. Eduardo Fuentes-Contreras en la Universidad de Talca.

3.4.1 EST

La actividad de EST fue medida usando como sustrato α -naftil acetato (Van Asperen, 1962; Bouvier y cols., 1998). Para ello, se homogeneizó un individuo por condición con pistilo plástico en 100 μ l de buffer PBS/TWEEN en un tubo Eppendorf y se dejó sobre hielo (en triplicado). Luego, se tomaron 25 μ l de cada homogeneizado, los que se dejaron individualmente en un pocillo de una microplaca de 96 pocillos a temperatura ambiente, agregándose 25 μ l de buffer PBS/TRITON a cada pocillo. A continuación, se agregaron 150 μ l de sustrato α -NA a cada pocillo y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con 25 μ l de solución colorante Fast blue β (Sigma Chemical Co.), y se dejó en oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente. Como blanco enzima, se utilizaron 25 μ l de PBS 1X en lugar de sobrenadante. Como blanco sustrato se utilizaron 150 μ l de PBS 1X. Terminados los 20 minutos, se leyó la absorbancia a 620 nm. Paralelamente, se determinaron las proteínas totales mediante el método de Bradford (1976). Los resultados de la determinación de actividad enzimática de EST se expresaron como nmoles/minuto/mg proteína.

3.4.2 GST

La actividad de GST se determinó usando el método del monoclorobimano (MCB) como sustrato en microplacas negras (Nauen y Stumpf, 2002), con modificaciones en los volúmenes del extracto utilizado. Para cada determinación, se utilizaron 5 áfidos de cada raza (Myz 1 y Myz 2) por planta (pimentón o tabaco) y tiempo de alimentación (12-72 horas). Un total de 30 determinaciones se realizaron para cada condición. Los áfidos fueron colocados dentro de un

tubo Eppendorf, agregándose 300 μ l de buffer PBS 1X (NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4) a cada tubo. A continuación, los áfidos se homogeneizaron con un pistilo plástico y se procedió a centrifugar los tubos a 10.000 RPM durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se tomaron 30 μ l del sobrenadante de cada condición (extracto enzimático), y se depositaron individualmente en una placa de 96 pocillos, procedimiento que se realizó en triplicado. Luego, a cada pocillo se le agregaron 150 μ l de sustrato (Glutación reducido en buffer HEPES) más 20 μ l de monoclorobimano, dejándose incubar a temperatura ambiente por 20 minutos. Como blanco enzima se usaron 30 μ l de PBS 1X, y como blanco sustrato se usaron 150 μ l de PBS 1X. Pasado el tiempo de incubación, se midió la fluorescencia a 390 nm de excitación y 465 nm de emisión. Los valores obtenidos fueron divididos por las proteínas totales de cada insecto, de manera de expresar los resultados en unidades de fluorescencia insecto⁻¹ (Nauen y Stumpf, 2002).

3.4.3 OFM

Las OFM se determinaron a través de la actividad de la 7-etoxicumarina-O-desetilación (ECOD) (De Sousa y cols., 1995). El procedimiento consistió en tomar 3 áfidos correspondientes a cada condición, los que se depositaron en un pocillo de una microplaca de 96 pocillos (en triplicado). Luego, se agregaron 150 μ l de buffer HEPES y se “aplastaron” rápidamente los áfidos con un pistilo plástico. A continuación, se agregaron 100 μ l de sustrato (buffer fosfato 50 mM, pH 7,2 y etoxicumarina 0,4 mM) a cada pocillo con áfidos. Como blanco sustrato se usaron 100 μ l de glicina-etanol 50% v/v. Debido a que se usaron áfidos enteros en esta determinación no se uso blanco enzima. Seguidamente, se dejó incubar por 4 horas en baño termorregulado a 37°C. Una vez terminado el tiempo de incubación, se leyó la fluorescencia a 390 nm de

excitación y 460 nm de emisión. Los resultados se expresaron en ng de Hidroxicumarina (producto) / minuto.

3.4.4 PROTEÍNAS TOTALES

Para realizar los cálculos de actividades enzimáticas de EST y GST, fue necesario conocer la concentración de proteínas totales por áfido. Con este fin, se utilizó el método de Bradford (1976) para la determinación de proteínas totales, usando BSA como estándar.

3.5 ANÁLISIS DE DATOS.

Para determinar si había diferencias estadísticamente significativas en las actividades enzimáticas de EST, GST y OFM entre tratamientos, se utilizó la prueba estadística de ANOVA de medidas repetidas, seguido de una prueba a posteriori (LSD), esta última para identificar entre qué tratamientos habían diferencias significativas. Para normalizar los datos y así cumplir los supuestos de los análisis realizados se efectuaron transformaciones como $\log(\text{variable} + 1)$ y Raíz Cuadrada ($\text{variable} + 1$).

4 RESULTADOS

4.1. GENOTIPIFICACIÓN

Como resultado de la genotipificación mediante marcadores microsatélites, se encontró solo un genotipo multilocus sobre tabaco, el cual no estaba presente sobre otros hospederos (designado como Myz 1), mientras que en sobre los otros hospederos se encontraron 14 genotipos multilocus (designados como Myz 2 a Myz 15, respectivamente) (Tabla 1).

La caracterización de las muestras de individuos pertenecientes a las razas generalista y especializada en tabaco de *M. persicae*, arrojó una baja diversidad genética para la población chilena de *M. persicae* ($D = 0,19$), respecto a lo informado para otras poblaciones. La heterocigosidad observada ($H_O = 73,4\%$) fue alta en comparación con la de otras poblaciones informadas en la literatura ($H_O = 38,5\% - 42,3\%$) (Terradot y cols., 1999; Sloane y cols., 2001; Zitoudi y cols., 2001; Wilson y cols., 2002), mientras que la diversidad alélica promedio fue de $A = 3,9$.

4.2. DIFERENCIAS GENÉTICAS ENTRE RAZAS

El cálculo de las distancias genéticas entre los genotipos caracterizados en este estudio, muestra un alto grado de diferenciación (0,91) entre la raza especializada en tabaco (*M. p. nicotiane*), con respecto a los genotipos pertenecientes a la raza generalista (*M. persicae persicae*) (Fig. 3, Tabla 1, 2 y 3). Basándose en estos niveles de distancias genéticas entre genotipos ($D_{AS} = 0,9$), se eligieron los genotipos Myz 2 (generalista) y Myz 1 (especializado en tabaco) (Fig. 3, Tabla 1 y 3).

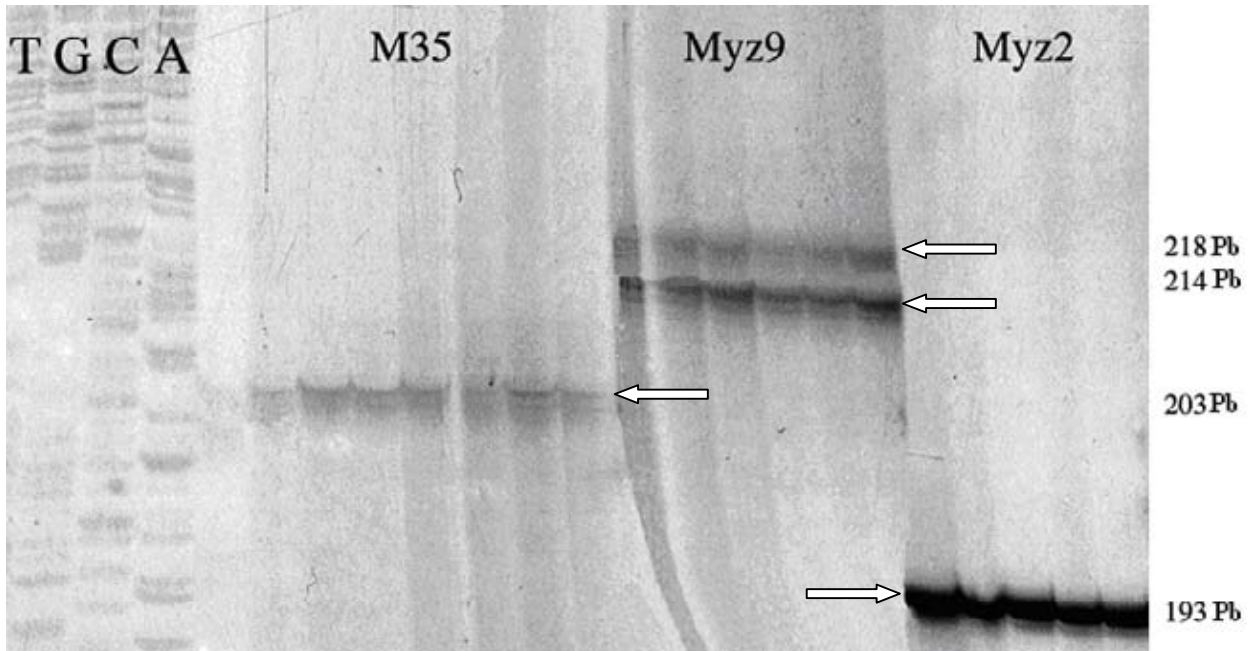


Figura 2: Gel de poliacrilamida 6%-urea 7M, teñido con nitrato de plata, en el cual se aprecian los productos de amplificación de los loci microsatélites M35, Myz9 y Myz2, para *Myzus persicae nicotianae* con su respectivo tamaño en pares de bases (Pb). A la izquierda se aprecia el estándar correspondiente a la secuenciación del vector pGEM – 3ZF (de izquierda a derecha T: ddTimina, G: ddGuanina, C: ddCitosina y A: ddAdenina).

Genotipo	Locus Microsatélite									
	Myz 2	Myz 3	Myz 9	Myz 25	M35	M37	M40	M77	M86	M107
Myz 1	191/193	125/125	214/218	123/123	203/203	155/157	128/130	139/140	115/117	134/142
Myz 2	000/000	106/106	210/226	120/120	185/189	159/161	133/136	138/140	99/101	137/142
Myz 3	000/000	106/106	210/226	120/120	185/189	157/159	125/127	138/140	109/111	137/142
Myz 4	000/000	106/106	210/226	120/120	185/189	159/161	125/127	138/140	99/101	137/142
Myz 5	000/000	106/106	210/226	120/120	185/189	159/161	140/143	138/140	99/101	128/131
Myz 6	000/000	106/106	210/226	123/123	185/189	159/161	130/130	138/138	99/101	128/131
Myz 7	000/000	106/106	210/226	120/120	185/189	159/161	130/130	138/138	99/101	128/131
Myz 8	000/000	106/106	210/226	120/120	185/189	000/000	128/130	000/000	99/101	128/131
Myz 9	000/000	106/106	210/226	120/123	185/189	000/000	125/143	000/000	99/101	128/131
Myz 10	000/000	106/106	210/226	120/123	185/189	159/161	125/130	138/140	99/101	128/131
Myz 11	000/000	106/106	210/226	120/120	185/189	159/161	125/130	138/138	99/101	128/131
Myz 12	000/000	106/106	210/226	120/123	185/189	153/161	125/130	000/000	99/101	128/131
Myz 13	000/000	106/106	210/226	123/123	185/189	155/157	125/127	000/000	99/101	128/131
Myz 14	000/000	106/106	210/226	120/123	185/189	159/161	125/125	000/000	99/101	128/131
Myz 15	000/000	106/106	210/226	120/120	185/189	153/161	125/125	000/000	99/101	128/131
Rango informado (pb)	177-199	109-125	206-218	120-123	163-198	153-157	123-135	138-146	97-141	133-145
N° de alelos informados	5	3	7	2	8	6	4	2	9	6

Tabla 1: Identidad genotípica usando 10 loci microsatélites de todos los genotipos multilocus de *Myzus persicae* caracterizados en este estudio. Se muestra además el rango de tamaño y el número de alelos informados previamente para cada locus. La combinación 000/000 significa que no hubo amplificación positiva después de repetir tres veces cada amplificación para individuos en que sí hubo amplificación positiva para otros loci. Estos alelos se conocen como alelos nulos (Sunnucks y cols., 1997).

ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA	VALOR
Diversidad genética de Nei (D)	0,19
Heterocigosidad observada (H_o) (%)	73,4
Diversidad alélica (A)	3,9

Tabla 2: Índices de diversidad genética, calculados a partir de la identidad genotípica con 10 loci microsatélites de los genotipos multilocus de *Myzus persicae* caracterizados en este estudio.

Genotipo	Myz 1	Myz 2	Myz 3	Myz 4	Myz 5	Myz 6	Myz 7	Myz 8	Myz 9	Myz 10	Myz 11	Myz 12	Myz 13	Myz 14	Myz 15
Myz 1	0	0.9	0.85	0.9	0.95	0.85	0.95	0.9	0.95	0.85	0.95	0.9	0.8	0.95	1
Myz 2	0.9	0	0.25	0.1	0.2	0.35	0.25	0.4	0.45	0.25	0.25	0.4	0.5	0.35	0.35
Myz 3	0.85	0.25	0	0.15	0.35	0.5	0.4	0.5	0.5	0.35	0.35	0.5	0.45	0.45	0.45
Myz 4	0.9	0.1	0.15	0	0.2	0.35	0.25	0.4	0.4	0.2	0.2	0.35	0.4	0.3	0.3
Myz 5	0.95	0.2	0.35	0.2	0	0.25	0.15	0.3	0.3	0.15	0.15	0.3	0.4	0.25	0.25
Myz 6	0.85	0.35	0.5	0.35	0.25	0	0.1	0.35	0.35	0.15	0.15	0.25	0.3	0.25	0.35
Myz 7	0.95	0.25	0.4	0.25	0.15	0.1	0	0.25	0.35	0.15	0.05	0.25	0.4	0.25	0.25
Myz 8	0.9	0.4	0.5	0.4	0.3	0.35	0.25	0	0.15	0.3	0.25	0.2	0.3	0.25	0.2
Myz 9	0.95	0.45	0.5	0.4	0.3	0.35	0.35	0.15	0	0.25	0.3	0.15	0.2	0.15	0.2
Myz 10	0.85	0.25	0.35	0.2	0.15	0.15	0.15	0.3	0.25	0	0.1	0.15	0.3	0.15	0.25
Myz 11	0.95	0.25	0.35	0.2	0.15	0.15	0.05	0.25	0.3	0.1	0	0.2	0.35	0.2	0.2
Myz 12	0.9	0.4	0.5	0.35	0.3	0.25	0.25	0.2	0.15	0.15	0.2	0	0.2	0.1	0.1
Myz 13	0.8	0.5	0.45	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.2	0.3	0.35	0.2	0	0.2	0.25
Myz 14	0.95	0.35	0.45	0.3	0.25	0.25	0.25	0.25	0.15	0.15	0.2	0.1	0.2	0	0.1
Myz 15	1	0.35	0.45	0.3	0.25	0.35	0.25	0.2	0.2	0.25	0.2	0.1	0.25	0.1	0

Tabla 3: Distancia genética D_{AS} (distancia de alelos compartidos de acuerdo con Jin & Chakraborty (1993)) entre todos los genotipos multilocus caracterizados para el complejo *Myzus persicae* en Chile.

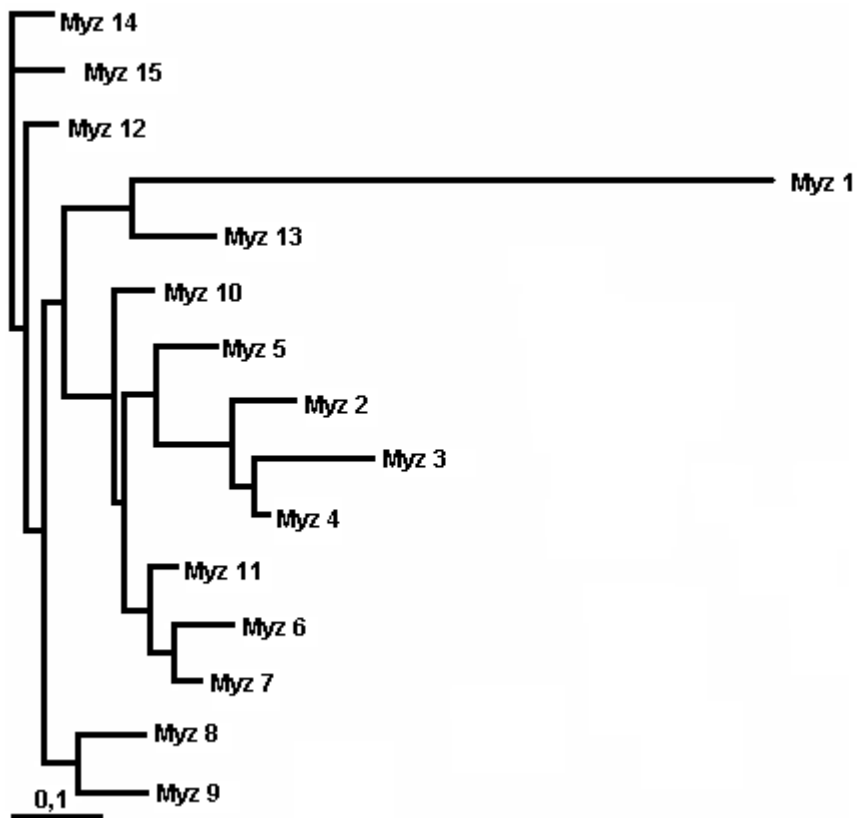


Figura 3: Árbol del vecino más cercano (Neighbour Joining Tree) construido usando la distancia genética D_{AS} . El árbol representa las relaciones de cercanía entre los distintos genotipos de *Myzus persicae* caracterizados utilizando los valores de distancia genética mostrados en la Tabla 2.

4.3. ACTIVIDAD DE EST

Para la actividad enzimática de EST en el genotipo especializado sobre tabaco Myz 1, no se aprecian diferencias significativas sobre ninguna planta durante las primeras 24 horas transcurridas desde el cambio de planta hospedera. Luego de 36 horas, se comenzó a observar un aumento en la actividad de Esterasas sobre tabaco, alcanzando un incremento significativo a las 48 horas del cambio ($F = 2,86$; $p < 0,05$). A continuación, se observa un descenso de la actividad enzimática a niveles similares a los observados durante las primeras 12 horas del experimento. Sobre pimentón, el genotipo especializado en tabaco no presentó variaciones significativas para las EST durante el periodo que duró el experimento.

En contraste, en áfidos generalistas Myz 2 no se observaron diferencias significativas para las actividades de EST, ya sea pimentón o tabaco, ni durante todo el tiempo abarcado por el experimento. (Fig. 4; Tablas 4 y 5).

4.4 ACTIVIDAD DE GST

Tanto para los áfidos especializados sobre tabaco (Myz 1), como para los pertenecientes a la raza generalista (Myz 2), no se observaron diferencias significativas en las actividades de GST durante todo el tiempo estudiado luego del traslado desde su planta hospedera original a una con características químicas similares o distintas a su planta de origen. En general, se observaron actividades de GST levemente mayores cuando el tabaco era la nueva planta hospedera, en contraste a lo observado sobre pimentón (Fig. 4; Tablas 6 y 7). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

4.5 ACTIVIDAD DE OFM

Para el genotipo especialista en tabaco (Myz 1), no se observaron diferencias significativas en las actividades enzimáticas de OFM durante todo el tiempo abarcado por el experimento, ya sea cuando estos fueron trasladados a plantas con características químicas similares a la de procedencia (otra planta de tabaco), o a plantas con características químicas distintas (pimentón). Resultados similares se observaron en los áfidos pertenecientes al genotipo generalista, los cuales no exhibieron diferencias en las actividades de OFM que puedan ser atribuidas a la influencia de la nueva planta hospedera (Fig. 4; Tablas 8 y 9).

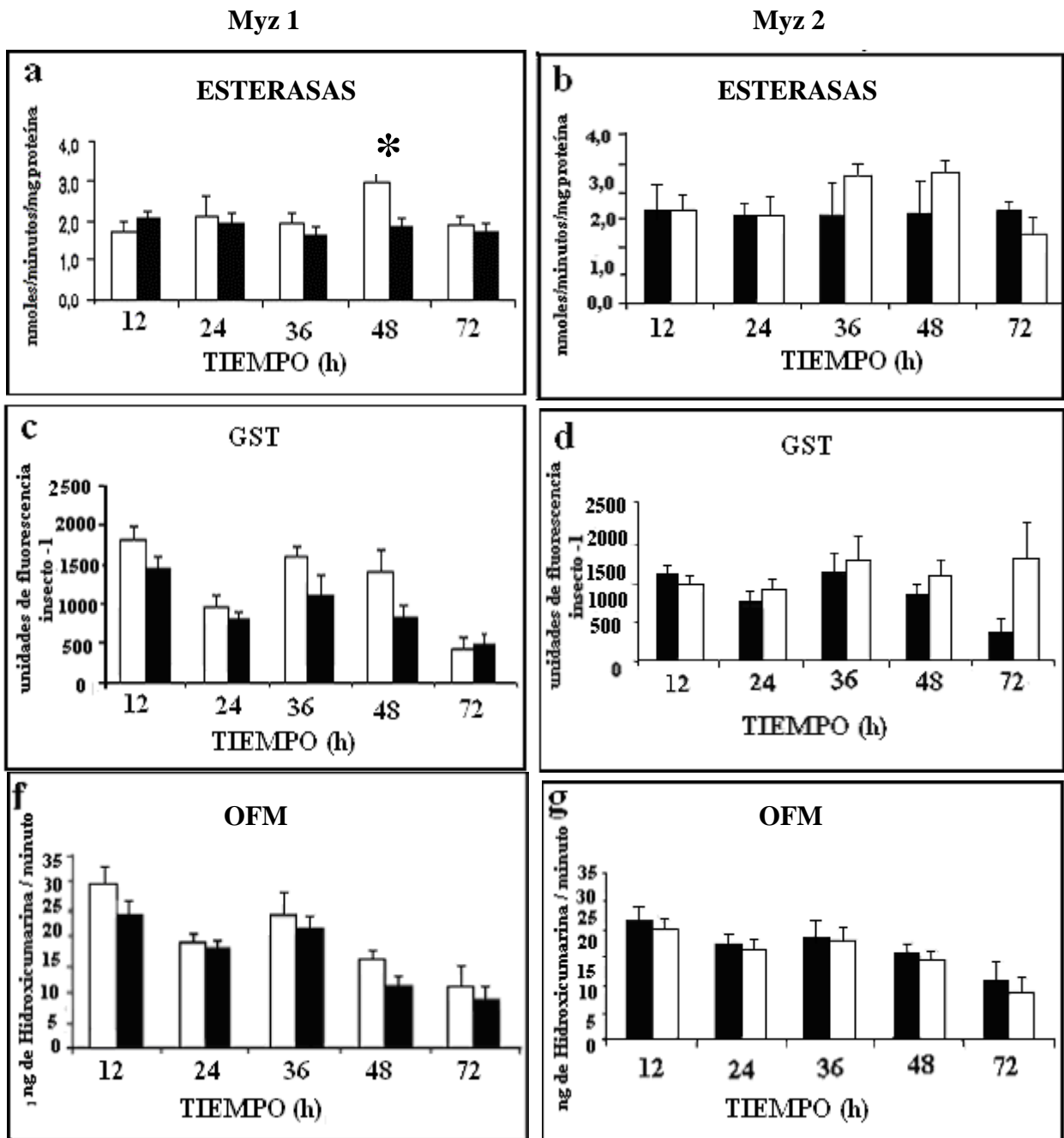


Figura 4: Actividades enzimáticas de Esterasas, Glutación S-transferasas (GST) y Oxidasas de función múltiple (OFM) determinadas en los genotipos Myz 1 (a, c y f) y Myz 2 (b, d y g), a las 12, 24, 36, 48 y 72 horas de crecimiento sobre tabaco (barras sin colorear) y pimentón (barras negras). Las barras de error corresponden al error estándar. *: F = 2,86; p < 0,05.

(a) <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre tabaco a diferentes tiempos (horas)	Actividad enzimática (nmoles/min/mg proteína)	SD	SE
12	1,657	0,875	0,160
24	2,068	1,628	0,297
36	1,922	0,826	0,151
48	2,925	1,165	0,213
72	1,877	0,537	0,098
(b) <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre pimentón a diferentes tiempos (horas)	Actividad enzimática (nmoles/min/mg proteína)	SD	SE
12	2,012	0,720	0,131
24	1,903	0,988	0,180
36	1,653	0,496	0,091
48	1,839	0,568	0,104
72	1,720	0,620	0,113

Tabla 4: Actividades enzimáticas de Esterasas en *M. persicae nicotianae* (n = 30 por condición), luego de transcurridas 12, 24, 36,48 y 72 horas desde el cambio de planta hospedera (**a:** *Myzus persicae nicotianae* sobre tabaco; **b:** *Myzus persicae nicotianae* sobre pimentón) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar).

(a) <i>Myzus persicae persicae</i> sobre pimentón a diferentes tiempos (horas)	Actividad enzimática (nmoles/min/mg proteína)	SD	SE
12	1,636	0,930	0,170
24	1,571	1,001	0,183
36	1,591	0,586	0,107
48	1,619	0,728	0,133
72	1,661	0,912	0,167
(b) <i>Myzus persicae persicae</i> sobre tabaco a diferentes tiempos (horas)	Actividad enzimática (nmoles/min/mg proteína)	SD	SE
12	1,649	1,581	0,289
24	1,580	0,705	0,129
36	2,281	1,856	0,339
48	2,359	1,874	0,342
72	1,247	0,551	0,101

Tabla 5: Actividades enzimáticas de Esterasas en *M. persicae persicae* (n= 30 por condición), luego de 12, 24, 36,48 y 72 horas desde cambio de planta hospedera (**a:** *Myzus persicae persicae* sobre pimentón; **b:** *Myzus persicae persicae* sobre tabaco). (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar).

(a) <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre tabaco a diferentes tiempos (horas)	Actividad específica (unidades de fluorescencia por insecto)	SD	SE
12	1801,498	532,688	97,255
24	948,510	437,047	79,793
36	1612,968	297,731	54,358
48	1259,609	730,436	133,359
72	431,042	398,320	72,723
(b) <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre pimentón a diferentes tiempos (horas)	Actividad específica (unidades de fluorescencia por insecto)	SD	SE
12	1438,418	507,065	92,577
24	797,590	333,595	60,906
36	1129,748	748,299	136,620
48	836,365	488,115	89,117
72	464,351	448,533	81,891

Tabla 6: Actividades enzimáticas de GST en *M. persicae nicotianae* (n = 30 por condición), a las 12, 24, 36, 48 y 72 horas después del cambio de planta hospedera (**a:** *Myzus persicae nicotianae* sobre tabaco; **b:** *Myzus persicae nicotianae* sobre pimentón) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar).

(a) <i>Myzus persicae persicae</i> sobre pimenton a diferentes tiempos (horas)	Actividad específica (unidades de fluorescencia por insecto)	SD	SE
12	1133,511	388,731	70,972
24	740,342	508,453	92,830
36	1120,699	870,876	158,999
48	845,695	446,959	81,603
72	1314,221	1528,430	279,052
(b) <i>Myzus persicae persicae</i> sobre tabaco a diferentes tiempos (horas)	Actividad específica (unidades de fluorescencia por insecto)	SD	SE
12	983,189	406,803	74,272
24	914,480	547,745	100,004
36	1294,810	969,980	177,093
48	1102,598	650,641	118,790
72	1314,221	1528,430	279,052

Tabla 7: Actividades enzimáticas de GST en *M. persicae persicae* (n = 30 por condición), después de 12, 24, 36, 48 y 72 horas de haber sido trasladados a una nueva planta hospedera (**a:** *Myzus persicae persicae* sobre pimentón; **b:** *Myzus persicae persicae* sobre tabaco) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar).

(a) <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre tabaco a diferentes tiempos (horas)	Actividad enzimática (ng de Hidroxicumarina / minuto)	SD	SE
12	29,853	10,611	1,937
24	19,315	6,120	1,117
36	24,806	10,039	1,833
48	16,144	5,674	1,036
72	11,297	13,192	2,409
(b) <i>Myzus persicae nicotianae</i> sobre pimentón a diferentes tiempos (horas)	Actividad enzimática (ng de Hidroxicumarina / minuto)	SD	SE
12	24,470	6,981	1,274
24	18,132	5,604	1,023
36	21,997	7,868	1,437
48	11,391	6,676	1,219
72	8,513	9,855	1,799

Tabla 8: Actividades enzimáticas de OFM en *M. persicae nicotianae* (n = 30 por condición), luego de transcurridas 12, 24, 36, 48 y 72 horas desde el cambio de planta hospedera (**a:** *Myzus persicae nicotianae* sobre tabaco; **b:** *Myzus persicae nicotianae* sobre pimentón) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar).

(a) <i>Myzus persicae persicae</i> sobre pimenton a diferentes tiempos (horas)	Actividad enzimática (ng de Hidroxicumarina / minuto)	SD	SE
12	21,743	7,876	1,438
24	17,362	6,231	1,138
36	18,704	9,283	1,695
48	15,650	5,819	1,062
72	10,597	12,022	2,195
(b) <i>Myzus persicae persicae</i> sobre tabaco a diferentes tiempos (horas)	Actividad enzimática (ng de Hidroxicumarina / minuto)	SD	SE
12	20,087	6,089	1,112
24	16,370	5,887	1,075
36	17,879	7,901	1,443
48	14,489	5,371	0,981
72	8,585	10,193	1,861

Tabla 9: Actividades enzimáticas de OFM en *M. persicae persicae* (n = 30 por condición), después de 12, 24, 36, 48 y 72 horas de haber sido trasladados a una nueva planta hospedera (**a:** *Myzus persicae persicae* sobre pimentón; **b:** *Myzus persicae persicae* sobre tabaco) (SD: Desviación estándar; SE: Error estándar).

5 DISCUSIÓN

5.1. ASPECTOS GENÉTICOS

La baja variabilidad genética respecto de otras poblaciones de la misma especie (Terradot y cols., 1999; Sloane y cols., 2001; Zitoudi y cols., 2001; Wilson y cols., 2002), y la alta heterocigosidad observada en las poblaciones chilenas de *Myzus persicae*, sugieren que la partenogénesis es el modo reproductivo que prevalece en nuestro país. Esto sería el resultado de las condiciones climáticas imperantes en Chile, con ausencia de inviernos demasiado fríos y con fotoperíodos reducidos, características que son necesarias para la aparición de morfos sexuales en otoño (Moran y cols., 1992; Simon y cols., 2002; Fuentes-Contreras y cols., 2004; Figueroa y cols., 2005).

Se puede apreciar un alto grado de diferenciación genética entre ambas razas de *Myzus persicae*, debido a la distancia genética que presenta el genotipo especialista (Myz 1) con respecto a los otros genotipos pertenecientes a la raza generalista. Sin embargo, el genotipo especializado en tabaco aún comparte algunos alelos microsatelitales, con algunos genotipos pertenecientes a la raza generalista (Myz25 y M40) (Tabla1), lo que sería un indicio de la reciente diferenciación entre ambas razas de *Myzus persicae* (Margaritopoulos y cols., 2000).

5.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS

Los mecanismos enzimáticos de detoxificación estudiados en áfidos cumplen un rol importante en la capacidad de estos últimos de superar las barreras químicas presentadas por las plantas (Leszczynski y cols., 1994; Figueroa y cols., 1999a; Loayza-Muro y cols., 2000; Mukanganyama y cols., 2002; Fuentes-Contreras y cols., 2004; Francis y cols., 2005). Estos

sistemas de detoxificación, además de favorecer el buen desempeño de los áfidos sobre sus plantas hospederas, estarían involucrados en los procesos de especialización de éstos a determinadas plantas hospederas, permitiéndoles colonizar nuevos nichos ecológicos, lo que eventualmente podría conducir hacia la formación de nuevas especies (Leszczynski y cols., 1994-97-98; Figueroa y cols., 1999a; Loayza-Muro y cols., 2000; Mukanganyama y cols., 2002; Fuentes-Contreras y cols., 2004; Figueroa y cols., 2004; Francis y cols., 2005).

El alto grado de especialización observado en *M. persicae nicotianae*, el cual rara vez ha sido observado sobre una planta hospedera distinta al tabaco (Blackman y cols., 1987; Fuentes-Contreras y cols., 2004), estaría influenciado por la capacidad de sus sistemas de detoxificación de superar las barreras químicas presentadas por el tabaco, en los cuales, según los resultados obtenidos, las esterasas tendrían una participación activa. Esto sería el resultado del rol que juegan estas enzimas en la detoxificación de terpenos, los cuales están presentes en los tricomas de las hojas del tabaco, elementos de defensa de la planta que son tocados por los áfidos al desplazarse mientras buscan un sitio de alimentación en la superficie foliar (Keene y Wagner, 1985).

En contraste a lo observado en *M. persicae nicotianae*, las actividades enzimáticas observadas para *M. persicae persicae*, no muestran diferencias significativas atribuibles al cambio de planta hospedera, lo que apoya la hipótesis de que la raza generalista carece de la capacidad de metabolizar aleloquímicos producidos por el tabaco. Sin embargo, para corroborar esta conclusión, es necesario realizar experimentos que midan el desempeño de la raza generalista sobre tabaco, en términos de sobrevivencia y reproducción, y determinar la existencia o no de diferencias alélicas para los genes que codifican las Esterasas entre ambas razas.

La elevada actividad enzimática de Esterasas exhibida por los áfidos pertenecientes a la raza especialista, concuerda con las observaciones realizadas para otras especies de insectos, en las cuales se ha observado que las Esterasas participan activamente en la metabolización de aleloquímicos producidos por las plantas, en defensa contra la herbivoría que ejercen los insectos fitófagos sobre ellas (Ahmad y cols. 1986; Berenbaum y Zangerl, 1993; Müller y cols., 2003; Mukanganyama y cols., 2002; Fuentes-Contreras y cols., 2004; Loayza-Muro y cols., 2000).

6. CONCLUSIONES

El hallazgo de un único genotipo sobre tabaco y la distancia genética que presenta con respecto a los genotipos pertenecientes a la raza generalista, apoya la hipótesis de la existencia de una raza altamente diferenciada capaz de adaptarse al tabaco, consecuencia de un proceso de especialización el cual estaría mediado en parte por mecanismos metabólicos de detoxificación en el cual participarían activamente la Esterasas a través de la modificación de terpenos de defensa presentes en los tricomas del tabaco.

7. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo abren nuevas interrogantes conducentes a comprender mejor el proceso de especialización de *M. persicae nicotianae* sobre tabaco, tales como: la mayor actividad enzimática de esterases observada ¿se debe a una sobre expresión o a una mutación en el sitio activo de la enzima?; ¿cuál es la isoenzima de esterases involucrada en la metabolización de los aleloquímicos del tabaco?; si *M. persicae nicotianae* necesita un mayor gasto metabólico para sobrevivir sobre tabaco que sobre pimentón, ¿cómo se explica su preferencia por tabaco?. Para responder estas interrogantes es necesario realizar nuevas investigaciones que apunten hacia los mecanismos moleculares, utilizando herramientas de la genómica, sin perder de vista los aspectos ecológicos y evolutivos involucrados en la interacción de *Myzus persicae* con su planta hospedera.

8 REFERENCIAS

- Ahmad, S., Brattsen, L.B., Mullin, C.A. y Yu, S.J. (1986). Enzymes involved in the metabolism of plants allelochemicals. En: *Molecular Aspects of insect-plant Associations*. Eds: Brattsen, L.B. y Ahmad, S. Plenum press, NY. pp. 73-152.
- Ballabeni, P., Gotthard, K., Kayumba, A., Rahier, M. (2003). Local adaptation and ecological genetics of host-plant specialization in a leaf beetle. *OIKOS* 101: 70–78.
- Berenbaum, M. R. y Zangerl, A.R. (1998). Population-level adaptation to host-plant chemicals: the role of cytochrome P450 monooxygenases. En: *Genetic structure and local adaptation in natural insect populations*. Eds: Mopper, S. and Strauss, S. Y. (Chapman and Hall), 91-112.
- Bouvier, J., Cuany A., Monier C., Brosse V. y Sauphanor B. (1998). Enzymatic diagnosis of resistance to deltamethrin in diapausing larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Arch. Insect Biochemistry Physiology*. 39: 55-64.
- Blackman, R.L. (1987). Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), and a key to New World *Myzus* (*Nectarosiphon*) species. *Bulletin of Entomological Research* 77: 713–730.
- Blackman, R.L. y Eastop V.F. (2000). Aphids on the world's crops. En *identification guide*. Wiley-Interscience. Chichester, 466 .

- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brattsen, L.B. (1992). Metabolic defenses against plant allelochemicals. *En Herbivores: Their interacciones with secondary plant metabolites*. Eds: Rosenthal, G. y Berenbaum, M. (Academic Press, CA.), 2: 175-242.
- Danielson, P. B. Foster, J. L. M. McMahon, M. M. Smith, M. K. Fogleman, J. C. (1998). Induction by alkaloids and phenobarbital of Family 4 Cytochrome P450s in *Drosophila*?: evidence for involvement in host plant utilization. *Molecular and general genetics* 259: 54 - 59
- De Barro, P.J., Sherratt, T.N., Carvalho, G.R., Nicol, D., Iyengar, A., Maclean, N. (1995). Geographic and microgeographic genetic differentiation in two aphid species over southern England using the multilocus (GATA) 4 probe. *Molecular Ecology* 4: 375–382.
- De Sousa G, Cuany A, Brun A, Amichot M, Rhamani R, Bergé JB. (1995). A microfluorimetric method for measuring ethoxycoumarin-O-deethylase activity on individual *Drosophila melanogaster* abdomens: Interest for screening resistance in insect populations. *Analytical Biochemistry* 229:86–91.
- Ehrlich, P.R. y Raven, P.H. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.

- Figuroa, C.C., Simon, J-C., Le Gallic, J-F., Prunier-Leterme, N., Briones, L.M., Dedryver, C-A., and Niemeyer, H.M. (2005). Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Heredity* 95: 24-33.
- Figuroa, C.C., Briones, L.M., Niemeyer, H.M., Fuentes-Contreras, E. (2004). Genetic and biochemical mechanisms involved in the use of host plants by phytophagous insects: genomic studies with *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae). XII *Symposium on Insect-Plant Relationships*. Berlin, Alemania.
- Figuroa, C.C., Simon, J-C., Le Gallic, J-F., Prunier-Leterme, N., Briones, L.M., Dedryver, C-A. y Niemeyer, H.M. (2004a). Effect of host defense chemicals on clonal distribution and performance of different genotypes of the cereal aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Chemical Ecology* 30 (12): 2515-2525.
- Figuroa, C.C., Briones, L.M., Niemeyer, H.M., Fuentes-Contreras, E. (2004b). Genetic and biochemical differences in host-plant use by the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). XXII *International Congress of Entomology*. Brisbane, Australia.
- Figuroa, C.C., Koenig, C., Araya, C., Santos, M.J. y Niemeyer, H.M. (1999a). Effect of DIMBOA, a hydroxamic acid from cereals, on peroxisomal and mitochondrial enzymes from aphids: evidence for the presence of peroxisomes in aphids. *Journal of Chemistry Ecology*. 25: 2465-2475.
- Francis, F., Haubruge, E., Dierickx, P., (2001). Glutathione S-transferase isoenzymes in the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 49: 158 – 166.

- Francis, F., Vanhaelen, N. y Haubruge, E., (2005). Glutathione S-Transferases in the Adaptation to Plant Secondary Metabolites in the *Myzus persicae* Aphid. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 58:166–174.
- Fuentes-Contreras, E., Figueroa, C.C., Reyes, M., Briones, L.M., Niemeyer, H.N. (2004). Clonal diversity and insecticide resistance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations from tobacco in Chile: evidence for the existence of a single predominant clone. *Bulletin of Entomological Research* 94, 11-18.
- Futuyma, D. J. (1991). Evolution of host specificity in herbivorous insects: genetic, ecological, and phylogenetic aspects. –In: Price, P. W., Lewinsohn, T. M., Fernandes, G.W. and Benson, W. W. (eds), *Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions*. John Wiley Sons : 431–454.
- Futuyma, D. J. y Moreno, G. (1988). The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19:207–233.
- Halkier, B. y Du L. (1997). The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in Plant Science* 2 : 425–431.
- Jaenike, J. (1990). Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 243–273.
- Jermy, T. (1984). Evolution of insect/host plant relationships. *American Naturalist* 124: 609-630.
- Jermy, T., Szentesi, A., (2003). Evolutionary aspects of host plant specialisation a study on bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *OIKOS* 101: 196–204.

- Jin, L. y Chakraborty, R. (1993). A bias-corrected estimate of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints [letter; comment]. *Molecular Biology and Evolution* 10:1112.
- Keene, C. y Wagner, G. (1985). Direct Demonstration of Duvatrienediol Biosynthesis in Glandular Heads of Tobacco Trichomes. *Plant Physiol.* 79, 1026-1032
- Leszczynski, B., Matok, H., Dixon, A.F.G., (1994). Detoxification of cereal plant allelochemicals by aphids: activity and molecular weights of glutathione S-transferase in three species of cereal aphids. *Journal of Chemical Ecology* 20: 387–394.
- Lindroth, R. y Bloomer, M. (1989). Biochemical ecology of the forest tent caterpillar: responses to dietary protein and phenolic glycosides. *Oecologia* 86: 408 - 413
- Loayza-Muro, R., Figueroa, C.C. y Niemeyer, H.M. (2000). Effect of two wheat cultivars differing in hydroxamic acid concentration on detoxifying and oxidative metabolism in the aphid *Sitobion avenae*. *Journal of Chemistry Ecology* 26: 2725-2731.
- Lushai, G., Sherratt, T.N., David, O., De Barro, P.J. y Maclean, N , (1998b). Host selection by winged summer females of the aphid *Sitobion avenae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85: 199-209.
- Margaritopoulos, J.T., Tsitsipis, J.A., Zintzaras, E. y Blackman, R.L. (2000). Host-correlated morphological variation of *Myzus Persicae* (Homoptera: Aphididae) populations En Greece. *Bulletin of Entomological Research* 90: 233-244.
- Minks, A.K. y Harrewijn P. (1987). Aphids: their biology, natural enemies and control. *Elsevier, Amsterdam* 1 : 450.

- Moran, N. A. (1992). The evolution of aphid life cycle. *Annual Review of entomology*. 37, 321-348.
- Mukanganyama, C.C. Figueroa , J.A. Hasler y H.M. Niemeyer (2002). Effects of DIMBOA on detoxification enzymes of the aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera aphididae). *Journal of Insect Physiology* 49: 223–229.
- Müller, C., Zwaan, B.J., de Vos, H. y Brakefield, P.M. (2003). Chemical defence in a sawfly: genetic components of variation in relevant life-history traits. Institute of Biology, Leiden University, The Netherlands *Nature Publishing Group* 90: 468–475.
- Nikolakakis, N., Margaritopoulos, J. y Tsitsipis, J. (2003). Performance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) clones on different host-plants and their host preference. *Bulletin of Entomological Research* 93: 235–242.
- Nauen, R. y Stumpf, N. (2002). Fluorometric Microplate Assay to Measure Glutathione S-Transferase Activity in Insects and Mites Using Monochlorobimane. *Analytical Biochemistry* 303 : 194–198.
- Scriber, J. M. (2002). Evolution of insect-plant relationships: chemical constraints, coadaptation, and concordance of insect/plant traits. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104: 217–235.
- Sheehan, D. Meade, G. Foley, V. y Dowd, C. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemistry journal* 360 : 1 – 16.

- Simon, J.-C., Hebert, P. D. N., Carillo C. y De Melo, R. (1995). Lack of clonal variation among Canadian populations of the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* Fitch (Homoptera: Aphididae). *The Canadian Entomologist* 127: 623–629.
- Simon J-C, Rispe C. y Snnucks P., (2002). Ecology and evolution of sex in aphids. *Trends in Ecology and Evolution*, 17 : 34-39.
- Sloane, M.A., Sunnucks, P., Wilson, A.C.C. y Hales, D.F. (2001). Microsatellite isolation, linkage group identification and determination of recombination frequency in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Genetic Research Cambridge*, 77 : 251-260.
- Sunnuck, P., De Barro, P. J., Lushai, G., Maclean, N. y Hales, D., (1997). Genetic structure of an aphid studied using microsatellite: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages, and host specialization. *Molecular ecology*, 6 : 1059- 1073.
- Terradot L., Simon J-C., Leterme N., Burdin E., Wilson ACC., Gauthier J-P. y Robert Y., (1999). Molecular caracterizacion of clones of the *Myzus persicae* complex (Hemiptera: Aphididae) differing in their ability to transmit the potato leafroll luteovirus (PLRV). *Bulletin of Entomological Research* 89: 355-363.
- Van Asperen K. (1962). A study of house fly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology* 8: 401–416.
- Van Emden, H.F., Eastop V.F., Hughes R.D. y Way M.J. (1969). The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Review of Entomology* 14: 197-270.

- Vanlerberghe-Masutti, F. y Chavigny, P. (1998). Host-based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprints. *Molecular Ecology* 7: 905–914.
- Via, Sara (2001). Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (7) : 381-390.
- Wilson, A.C.C., Sunnucks, P., Blackman, R.L. y Hales, D.F. (2002). Microsatellite variation in cyclically parthenogenetic populations of *Myzus persicae* in southeastern Australia. *Heredity* 88 : 258–266.
- Wilson, A.C.C., Massonnet, B., Simon, J-C., Prunier-Leterme, N., Dolatti, L., Llewellyn, K.S., Figueroa, C.C., Ramirez, C.C., Blackman, R.L., Estoup, A. y Sunnucks, P. (2004). Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application. *Molecular Ecology Notes* 4: 104-109.
- Xinzh, N. y Sharron, S. Q. (2003). Possible roles of esterase, glutathione S-transferase, and superoxide dismutase activities in understanding aphid–cereal interactions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 108 (3) : 187-195.
- Zitoudi, K., Margaritopoulos, J., Mamuris, Z. y Tsitsipis, J. (2001). Genetic variation in *Myzus persicae* populations associated with host-plant and life cycle category. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99: 303–311.

9 ANEXO

Listado de los reactivos comerciales utilizados en esta tesis

REACTIVO	MARCA
1-Cloro-2,4-Dinitro-Benzene	Sigma
α -Naphthyl Acetate	Sigma
7-Ethoxycoumarin	Sigma
Aceite Mineral	Promega
Acetato de Sodio 3H ₂ O	Sigma
Acetato de Sodio Anhidro	Vetec
Acetona	TCL
Ácido Acético Glacial	Vetec
Ácido Bórico	TCL
Ácido Nítrico 70%	TCL
Ácido Nítrico 90%	TCL
Ácido Tricloroacético	TCL
Acrilamida	TCL
Acrilamida:Bis Acrilamida 19:1	TCL
Acrilamida:Bis Acrilamida 19:1	TCL
Agar-Agar	Sigma
Agarosa	GibcoBRL
pGEM – 3ZF (+)	Promega

REACTIVO	MARCA
Albumin Bovine	Sigma
Agarosa	TCL
Amonio Persulfato	Sigma
Azul de Bromofenol	Sigma
Bis-Acrilamida	TCL
Bradford Reagent	Sigma
Bromuro de Etidio	TCL
Buffer TBE 10X	TCL
Buffer TBE 10X	TCL
Carbonato de Sodio	Riedel
Cloruro de Magnesio	Sigma
Cloruro de Potasio	Sigma
Cloruro de Sodio	Sigma
EDTA Sal Disódica:2H ₂ O	Sigma
Etanol 100%	Vetec
Etanol 95%	TCL
Fast Blue	Sigma
Formaldehído 37%	TCL
Formamida desionizada	TCL
Fosfato de Potasio Dibásico, 3H ₂ O	Sigma
Fosfato de Potasio Monobásico:Anhidro	Sigma

REACTIVO	MARCA
Fosfato de Sodio Dibásico:Anhídrido	Sigma
Glutathione Transferase	Sigma
Hidróxido de Sodio	Vetec
KCl	Sigma
Lauryl Sulfate	Sigma
Nitrato de Plata	TCL
PNA	Sigma
p-Nitrophenyl Acetate	Sigma
Proteinasa K	Sigma
Sigamacote	Sigma
Sucrosa	Sigma
Temed	TCL
TIO SO ₄	Sigma
Tris	TCL
Triton X-100	Sigma
Trizma Base	Sigma
Trizma HCl	Sigma
Tween 20	Sigma
Urea	TCL
Xileno Cyanol FF	Sigma
Agarosa	TCL

REACTIVO	MARCA
Fosfato de Sodio	Sigma
Hidróxido de Sodio	Vetec