



Universidad Austral de Chile

**Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias**

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

**ORIGEN DEL AFIDÓ *Myzus persicae ssp. nicotianae* (Hemiptera: Aphididae)
(Blackman) INTRODUCIDO EN CHILE**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
**Grado de Licenciado en Ciencias
Biológicas.**

FRANCISCA ANDREA ZEPEDA PAULO
VALDIVIA – CHILE

2007

Para mi Gabriel...

Gracias a ti papá.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Christian Figueroa C. por la invaluable ayuda, conocimiento y apoyo en el desarrollo de esta tesis. A los estudiantes Felipe Sepúlveda, Marcos Cabrera y la Sra. Lucia Briones por enseñarme el trabajo en laboratorio. A Sebastián Fuentes por su ayuda en la digitación de esta tesis.

Esta investigación fue financiada por los proyectos PBCT-Anillos ACT-38 y ECOS/CONICYT C04B01.

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Abreviaturas	iv
1. Resumen	i
1.1. Summary	2
2. Introducción	3
2.1. Invasiones biológicas	3
2.2. Marcadores moleculares para estudiar invasiones biológicas	4
2.3. Los áfidos como modelo de estudio	6
2.4. Estrategias reproductivas en áfidos y el éxito en la colonización de nuevos hábitat	6
2.5. El caso de <i>Myzus persicae</i>	8
2.6. Objetivos de este trabajo de tesis	10
2.7. Hipotesis de trabajo	12
2.8. Objetivo general	12
2.9. Objetivos específicos	12
3. Materiales y métodos	13
3.1. Áfidos	13
3.2. Análisis con microsatélites	17
3.3. Análisis de datos	21

4. Resultados	24
4.1. Identidad y distribución de los genotipos multilocus	24
4.2. Diversidad genética en las poblaciones	28
4.3. Diferenciación genética de las poblaciones	32
4.4. Relaciones entre las poblaciones	34
5. Discusión	37
5.1. Diversidad genética en las poblaciones	37
5.2. Potencial origen de <i>Myzus persicae</i> ssp. <i>nicotianae</i> en Chile	40
5.3. Predominancia de un genotipo en América y la hipótesis del “Superclón”	43
5.4. Conclusiones	46
5.5. Perspectivas	47
6. Referencias	48
7. Anexo	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	20
Gel de poliacrilamida 6% urea, teñido con nitrato de plata, en el cual se aprecian los productos de amplificación del locus microsatelital Myz2 para <i>Myzus persicae nicotianae</i> .	
Figura 2	27
Distribución y frecuencias de los genotipos de <i>Myzus persicae nicotianae</i> entre los cinco países estudiados.	
Figura 3	36
Árbol del vecino mas cercano (Neighbour-joining tree) construido con la Distancia de alelos compartidos calculada con 7 loci microsatélites.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	15-16
Localidades muestreadas, número (n) de individuos colectados y número de genotipos obtenidos en los diferentes países considerados en este estudio.	
Tabla 2	19
Características de los 7 loci microsatelitales empleados para el análisis de <i>Myzus persicae</i> .	
Tabla 3	25-26
Combinaciones alélicas en base al tamaño en pares de bases para 7 loci microsatélites de los genotipos multilocus encontrados en los 5 países estudiados.	
Tabla 4	30
Índices de diversidad genética de las poblaciones, Heterocigosidad observada y esperada y desviaciones respecto a lo esperado según el equilibrio de Hardy - Weinberg.	
Tabla 5	31
Frecuencias esperadas de alelos nulos calculadas usando el segundo estimador de Brookfield (1996) implementado en el programa MICROCHECKER.	

Tabla 6	33
Diferenciación genética entre las poblaciones de <i>Myzus persicae ssp. nicotianae</i> (F_{st}).	
Tabla 7	35
Distancia genética D_{as} (Distancia de Alelos Compartidos de acuerdo con Jin & Chakraborty (1993)), entre las poblaciones de <i>Myzus persicae ssp. nicotianae</i> .	

ABREVIATURAS

A	Diversidad alélica
D_{as}	Distancia de alelos compartidos
DGG	Diversidad genotípica global
DL	Desequilibrio de ligamiento
DNA	Acido desoxirribonucleico
EE.UU.	Estados Unidos
e^H	Diversidad de Shannon-Weaver
F_{is}	Coefficiente de endogamia o Índice de fijación
F_{st}	Índice de diferenciación genética
H_e	Heterocigosidad esperada
H_o	Heterocigosidad observada
H-W	Hardy-Weinberg
INRA	Instituto Nacional de Investigación Agronómica, Francia
INTA	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Chile
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
UV	Ultravioleta

1. RESUMEN

Las especies invasoras constituyen una de las más serias amenazas para la biodiversidad y la economía. Los áfidos (Hemiptera: Aphididae) son insectos fitófagos ubicuos que se reproducen por partenogénesis cíclica, facultativa u obligada, y que pueden constituir plagas agrícolas. *Myzus persicae* (Sulzer) es un áfido generalista, pero que sobre tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) ha desarrollado una raza altamente adaptada. Esta raza ha recibido recientemente el estatus de subespecie, *Myzus persicae ssp. nicotianae* (Blackman). En Chile fue descrita a fines de los noventa, siendo responsable de severos daños sobre cultivos de tabaco.

Con el fin de determinar el origen putativo de *Myzus persicae ssp. nicotianae* introducido en Chile, se caracterizó la diversidad genética de una población de Norteamérica y tres de Sudamérica y una Europea, utilizando 7 loci microsátélites. Una completa ausencia de variabilidad genética fue encontrada para Chile, con un único genotipo muy frecuente y ampliamente distribuido que también se observó en los otros países Americanos. Una baja diversidad genética y genotípica se observó en Argentina y Brasil, acompañada de un déficit de heterocigotos. La población de EE.UU. presentó una mayor diversidad genética, comparada con las obtenidas en las otras poblaciones de América. Totalmente opuesta fue la situación de Grecia que presentó una alta diversidad genética.

La correlación entre disminución de diversidad genética con la distancia geográfica entre poblaciones, sugiere una vía de introducción desde Norteamérica al sur, siguiendo un modelo “Stepping-stone” aplicado a poblaciones partenogénicas. Además, estos resultados apoyarían la hipótesis de “superclones” en poblaciones asexuales, caracterizados por una alta abundancia relativa y rápida colonización de nuevos hábitat.

1.1. SUMMARY

The invasive species constitute one of the most serious threats to biodiversity and economy. Aphids (Hemiptera: Aphididae) are ubiquitous phytophagous insects that reproduce by cyclical, facultative or obligate parthenogenesis, frequently constituting agricultural pests. *Myzus persicae* (Sulzer) is a generalist aphid but on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) it has developed a highly adapted race. Recently, this race received the status of subspecies *Myzus persicae* ssp. *nicotianae* (Blackman). In Chile the tobacco aphid was described in the late 1990s, being responsible for severe damage on tobacco cultures.

In order to determine the putative origin of *M. persicae nicotianae* introduced in Chile, the genetic variability in North and South American and European populations was characterized using seven microsatellites loci. A complete absence of genetic variability was found in Chile, with only one highly frequent and widely distributed genotype also detected in the other three American populations. Argentina and Brazil exhibited a low genetic diversity accompanied by a heterozygote deficit. The US population presented higher levels of genetic diversity in comparison to the other American populations. In contrast, the opposite situation was observed for the Greek population, which presented the highest levels of genetic diversity.

The correlation between the diminutions of genetic diversity with the geographic distance among populations, suggests an introduction route from North America to the south, following a model "Stepping-stone" applied to parthenogenesis populations. In addition, these results would support the hypothesis of "superclones" in asexual populations, characterized by a higher relative abundance and a faster colonization of new habitats.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. INVASIONES BIOLÓGICAS

Durante el último siglo, el hombre ha sido el responsable de una masiva redistribución de organismos, incluyendo plantas y animales. El desarrollo de la agricultura y el incremento del intercambio económico han sido los principales agentes causales de la destrucción de muchas barreras naturales que impedían el movimiento de especies y poblaciones de organismos (Kolar & Lodge, 2001). El negativo impacto de especies invasoras sobre especies nativas, comunidades y ecosistemas ha sido ampliamente reconocido por décadas (Lodge, 1993; Simberloff, 1996). De esta forma, las invasiones biológicas constituyen una de las más serias amenazas para la preservación de la biodiversidad (Everett, 2000), y representan uno de los componentes significativos del cambio global (Vitousek *et al.*, 1996). Además, en términos económicos, las especies introducidas son causantes de pérdidas por cifras del orden de miles de millones de dólares anuales (Pimentel *et al.*, 2000).

Las especies introducidas pueden representar oportunidades únicas de estudio de los procesos que conducen la evolución de las poblaciones biológicas. Las invasiones representan verdaderos experimentos naturales, en los cuales los procesos evolutivos ocurrirían más rápido que en sistemas nativos (Sakai *et al.*, 2001), pudiendo evaluarse la importancia relativa de los cuellos de botella genéticos, la deriva génica, la reducción del flujo génico y los efectos del aislamiento reproductivo sobre las dinámicas evolutivas de poblaciones introducidas.

Clásicamente, las invasiones son entendidas como sucesos impredecibles debido a que constarían de uno o unos pocos eventos precisos durante los cuales se genera una conectividad

temporal entre parte del área de origen con una nueva área favorable (Facon *et al.*, 2003). Si un evento fundador ocurre, la diversidad en el área invadida disminuirá sustancialmente respecto a lo encontrado en áreas de origen (Tsutsui *et al.*, 2000; Downie, 2002). En especies clonales (con reproducción asexual), esta reducción de variabilidad es drástica, ya que un solo clón podría invadir una extensa área (Amsellen *et al.*, 2000). Este éxito relativo de especies clonales en la colonización, se debe principalmente a su alta tasa de reproducción y a la ausencia de dificultades en la búsqueda de individuos para el apareamiento (Simon *et al.*, 1999).

La comparación de la variación genética de poblaciones recientemente establecidas con las de sus potenciales áreas de origen, podría ofrecer una valiosa información acerca de los procesos genéticos que ocurren durante una invasión biológica (Sakai, 2001). La identificación del origen geográfico de especies invasoras es un componente crucial de las invasiones biológicas. Tal conocimiento podría facilitar la reconstrucción de la historia evolutiva de una población (Villablanca *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 1999; Amsellem *et al.*, 2000). Sin embargo, las fuentes de introducción de especies a menudo, solo son conocidas en forma muy general (Downie, 2002).

2.2. MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDIAR INVASIONES BIOLÓGICAS

La pérdida de diversidad genética por cuello de botella poblacional durante una colonización, puede ser estudiada mediante marcadores moleculares. Estos corresponden a fragmentos de DNA situados en lugares específicos del genoma, que permiten revelar polimorfismo (variación). Los marcadores moleculares han probado ser útiles en la

identificación de fuentes genéticas de poblaciones, así como también en la caracterización de la estructura genética de las mismas (Davies *et al.*, 1999). Uno de los marcadores más ampliamente utilizados son los microsatélites, que corresponden a cortas secuencias de motivo simple repetidas una detrás de otra (en tándem), con unidades de iteración de entre 1 y 6 pares de bases repartidas a lo largo del genoma de la mayoría de los organismos (Tóth *et al.*, 2000). El estudio del polimorfismo de las repeticiones de las secuencias microsatelitales es de mucha utilidad, pues constituyen uno de los marcadores genéticos más variables (Ellegren, 2004). Se caracterizan por exhibir una alta heterocigocidad y por presentar múltiples alelos, lo que junto con su codominancia, los ha convertido en el marcador molecular de preferencia en la actualidad para estudios poblacionales (Jarne & Lagoda, 1996; Sunnucks, 2000; Ellegren, 2004). El polimorfismo microsatelital se origina por cambios en el número de repeticiones, causadas bien por el deslizamiento de la DNA polimerasa durante la replicación, o bien por la ocurrencia de entrecruzamientos desiguales durante la meiosis. Las regiones microsatelitales presentan una alta tasa de mutación, mucho mayor que la de regiones codificantes del genoma ($> 10^{-4}$ por generación), mutaciones caracterizadas por aumentos o disminuciones en una sola unidad de iteración (Schlötterer, 1998; Eisen, 1999; Goldstein & Schlotterer, 1999). Esta herramienta de la biología molecular, proporciona buena evidencia sobre niveles de diversidad genética dentro y entre poblaciones, así como también ha permitido estudiar la(s) fuente(s) de introducción de especies invasoras (Tsutsui *et al.*, 2000; Sakai, 2001).

2.3. LOS ÁFIDOS COMO MODELO DE ESTUDIO

Los áfidos (Hemiptera: Aphididae) son insectos fitófagos que frecuentemente constituyen importantes plagas agrícolas en el mundo. Los áfidos exhiben características de plaga debido al daño directo que produce sobre su planta hospedera a través de la ingestión del floema, a la acumulación de fumagina, hongo saprofito que se desarrolla sobre la mielcilla secretada por áfidos cuando se alimenta sobre sus plantas hospederas, así como también, por su capacidad para transmitir virus fitopatógenos, además de su alta tasa de reproducción (Minks & Harrewijn, 1987; Moran *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 2002). Los áfidos presentan una variedad de modos de reproducción, desde partenogénesis cíclica (alternancia de reproducción sexual y asexual) hasta partenogénesis obligada (Moran *et al.*, 1992; Simón *et al.*, 2002; 2003). En países con climas templados, caracterizados por inviernos poco severos, con una casi completa ausencia de nieve, como el valle central de Chile (Novoa *et al.*, 1989), las especies de áfidos introducidos se reproducen principalmente por partenogénesis obligada (Figueroa *et al.*, 2002; 2004; 2005; Fuentes-Contreras *et al.*, 2004).

2.4. ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS EN ÁFIDOS Y EL ÉXITO EN LA COLONIZACIÓN DE NUEVOS HÁBITAT

A pesar del doble costo asociado a la reproducción sexual, este es el modo largamente predominante entre los animales. Ventajas que compensarían este doble costo asociado al sexo serían (1) la generación de nuevas combinaciones alélicas que favorecerían las respuestas adaptativas frente a cambios ambientales y (2) la eliminación de recurrentes mutaciones deletéreas (Kondrashov, 1988; Maynard Smith, 1988; West *et al.*, 1999). Mientras hay un

consenso sobre los beneficios del sexo a largo plazo, no hay un acuerdo general en la explicación sobre la superioridad de la asexualidad en el corto plazo, probablemente debido a su mucha mayor capacidad para la reproducción (Maynard Smith, 1971). Sin embargo, a largo plazo, las poblaciones asexuales presentarían un deterioro en su desempeño debido a la acumulación de mutaciones deletéreas y la incapacidad de responder frente a cambios ambientales (Hurst & Peck, 1996).

Los áfidos normalmente se reproducen por partenogénesis cíclica, pero también muestran numerosas e irreversibles transiciones de partenogénesis cíclica a obligada dentro de una misma especie (Delmotte *et al.*, 2001). La comparación entre partenogénesis cíclica y obligada en áfidos es equivalente a comparar linajes sexuales y asexuales en organismos con ambos modos de reproducción (Simon *et al.*, 2003). Adicionalmente, la postura de huevos resistentes al frío en climas con inviernos severos, provee una ventaja ecológica que podría compensar los costos del sexo (Rispe *et al.*, 1998; Rispe & Pierre, 1998), pero esto no proveería de una explicación general para la mantención del sexo en áfidos (Simon *et al.*, 2003).

Sin embargo, se ha sugerido que los linajes predominantes y persistentes para diferentes especies de áfidos son aquellos con modalidad reproductiva asexual (Fenton *et al.*, 1998). Estos genotipos constituirían verdaderos “superclones”, como los informados para el áfido *Myzus persicae* en Australia (Vorbarguer *et al.*, 2003a), donde solo dos de los genotipos encontrados constituyeron más del 40% de la muestra. Del mismo modo, una situación similar se ha observado para el áfido de los cereales *Sitobion avenae* F., para el cual también se ha informado la presencia de superclones en poblaciones partenogénicas (Figueroa *et al.*, 2005). Este patrón sería además consistente con la hipótesis de los llamados “genotipos multi-

propósito” (Lynch, 1984), la que predice que estos genotipos debieran ser generalistas y mostrar poca varianza respecto de su desempeño sobre distintos hospederos y zonas geográficas.

En consecuencia, las extraordinarias características en cuanto al desempeño de los áfidos sobre diferentes hospederos y lugares geográficos, lo constituyen en un atractivo modelo para estudiar las propiedades genéticas que han permitido su exitosa invasión de nuevos ambientes.

2.5. EL CASO DE *Myzus persicae*

Entre las especies de áfidos destaca *Myzus persicae* (Sulzer), la más importante en daños a cultivos. Presumiblemente originario de Asia, actualmente presenta una distribución global. Este pulgón es capaz de atacar más de 40 familias vegetales, incluyendo cultivos tan diversos como remolacha, hortalizas (crucíferas, solanáceas y cucurbitáceas) y frutales (Van Emden *et al.*, 1969; Blackman & Eastop, 2000).

Myzus persicae presenta variados modos de reproducción. En climas más bien fríos, prefieren una reproducción por partenogénesis (apomixis) cíclica o modo holocíclico que involucra una alternancia de hospederos: en otoño, cuando disminuye la temperatura y el fotoperiodo, hembras partenogénéticas vivíparas producen ginóparas aladas y machos alados en un hospedero secundario, los que migran al duraznero (*Prunus persica L.*), su hospedero primario, donde ocurre el apareamiento, poniendo huevos de invierno resistentes al frío (van Emden *et al.*, 1969). Recíprocamente, en climas más templados, estos pulgones prefieren la partenogénesis obligada o modo anholocíclico, caracterizado por una reproducción

partenogenética permanente durante todo el año sobre hospederos secundarios (Moran, 1992; Rispe *et al.*, 1998; Simón *et al.*, 2002; 2003).

Aunque *M. persicae* es una especie altamente generalista, sobre tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) ha desarrollado poblaciones altamente adaptadas. Estas poblaciones especializadas en tabaco fueron previamente descritas como una especie hermana denominada *Myzus nicotianae* (Blackman) (Blackman., 1987), principalmente debido a diferencias morfológicas y ecológicas (preferencias). Sin embargo, estudios posteriores centrados en las características genéticas y bioquímicas de ambos grupos, no detectaron suficiente grado de divergencia para justificar el nivel de especie para *M. nicotianae* (Margaritopoulos *et al.*, 1998, Clements *et al.*, 2000 a,b). Se ha hipotetizado entonces, que *M. persicae nicotianae* sería un punto intermedio en la formación de una nueva especie de áfido que tendría el atributo de superar las defensas físicas y químicas del tabaco, rasgo del cual carecería la raza generalista *M. persicae persicae* (Margaritopoulos *et al.*, 2000). Siguiendo con esta línea de evidencias, idénticas secuencias de DNA para los mismos loci analizados entre ambos grupos, sugieren que estos dos grupos habrían divergido muy recientemente, y que se entrecruzarían en cierto grado (Field *et al.*, 1994; Clements *et al.*, 2000). Incluso, trabajos recientes han propuesto el estatus de subespecie (*Myzus persicae ssp. nicotianae*) para las poblaciones alimentadas sobre tabaco (Margaritopoulos *et al.*, 2003; Blackman & Eastop, 2005).

Myzus persicae ssp. nicotianae, solo ha sido descrita en Chile a partir de fines de los noventa (Fuentes–Contreras *et al.*, 2004), siendo responsable de graves daños sobre cultivos de tabaco en Chile Central. Se ha informado la existencia de un único clón (genotipo) (Fuentes–Contreras *et al.*, 2004), revelando una completa ausencia de variación genética para esta subespecie en Chile. En cuanto a sus características en otros lugares geográficos, esta especie

exhibe poblaciones con niveles variables de diversidad genética en diferentes países. Es así como se han observado altos niveles de diversidad genética en España (Martínez-Torres *et al.*, 1997), Australia (Wilson *et al.*, 2002) y Francia (Fenton *et al.*, 2003; Guillemaud *et al.*, 2003), mientras que solo un clón predominante fue informado en Escocia (Fenton *et al.*, 1998) y en Canadá (Al-Aboodi & French-Constant, 1995). Estos estudios han mencionado que la disponibilidad del hospedero primario, Duraznero (*Prunus persicae* L.), es un factor necesario para la reproducción sexual y para que se observen altos niveles de variación genética (Wilson *et al.*, 2002; Fenton *et al.*, 2003; Guillemaud *et al.*, 2003). Por ejemplo, *Myzus persicae* ssp. *nicotianae* en Grecia muestra una alta variabilidad genética y una alta heterocigosidad solo en aquellas áreas donde está presente su hospedero primario (Zitoudi *et al.*, 2001; Margaritopoulos *et al.*, 2002).

2.6. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

Con el objeto de determinar el origen putativo de las poblaciones chilenas de *Myzus persicae* ssp. *nicotianae*, se estudió y comparó la variabilidad genética y la diversidad genotípica entre poblaciones de distintos países de América y de Grecia, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites. Considerando que la mayoría de los áfidos plaga de Norte América han sido introducidos desde el Viejo Mundo, y que muchas de estas especies se han expandido a Sudamérica (Blackman & Eastop, 2000), este estudio permitirá aproximarse hacia la(s) posible(s) vía(s) de introducción hacia América en general, y a Chile en particular. Dos características genéticas de las poblaciones son evidencia de eventos fundadores: (1) la

pérdida de diversidad genética y (2) un aumento de la diferenciación genética entre poblaciones originarias respecto a poblaciones de más reciente establecimiento (Le Corre & Kremer, 1998).

En consecuencia, se hipotetiza que la vía de introducción del áfido *Myzus persicae nicotianae* hacia Chile habría ocurrido desde áreas con una mayor diversidad genética, siguiendo una ruta desde Europa hacia Norteamérica y luego Sudamérica. Esto se reflejará en (i) una pérdida de diversidad genética y en (ii) un aumento de la distancia genética a medida que aumenta la distancia geográfica, como consecuencia de que las poblaciones introducidas habrían sufrido sucesivos cuellos de botella durante la(s) invasión(es). De este modo, se podrá inferir la vía de introducción seguida por *Myzus persicae ssp. nicotianae* hasta su llegada a Chile. Esto se determinará mediante (1) la comparación de la identidad de los genotipos encontrados en Chile respecto a los encontrados en otros países, y (2) la comparación de las frecuencias genéticas (génicas y genotípicas) entre poblaciones de diferentes países.

2.7. HIPOTESIS DE TRABAJO

“*Myzus persicae ssp. nicotianae* (Blackman) introducido en Chile siguió una ruta de invasión desde Europa hacia Norteamérica y luego hacia Sudamérica, lo que se reflejará en (1) una pérdida de diversidad genética y (2) un aumento de la diferenciación genética, a medida que esta especie ha sido introducida en nuevos países sudamericanos, como consecuencia de sucesivos cuellos de botella poblacionales ocurridos durante las invasiones”

2.8. OBJETIVO GENERAL

- Determinar y comparar la diversidad genética y la identidad de los genotipos de *Myzus persicae ssp. nicotianae* en cuatro países de América y Grecia, para sugerir una vía de introducción hacia Chile.

2.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (a) Caracterizar la diversidad genética de *M. p. ssp. nicotianae* en cinco países ,usando marcadores moleculares microsatélites.
- (b) Comparar la diversidad genética y la identidad de los genotipos de *M. p. ssp. nicotianae* en los diferentes países analizados.
- (c) Determinar el posible origen de *M. p. ssp. nicotianae* introducido en Chile, de acuerdo con la diversidad genética y la diferenciación genética encontrada en los cinco países analizados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ÁFIDOS

Un total de 208 individuos fueron analizados, los que fueron obtenidos a partir de dos tipos de muestras i) individuos de *Myzus persicae ssp. nicotianae* recolectados directamente sobre tabaco en Chile y preservados en etanol 95% a -20°C y ii) muestras preservadas en etanol 95% a -20°C provenientes de distintas zonas geográficas.

En Chile, los áfidos fueron recolectados desde cultivos de tabaco, *Nicotiana tabacum L.* (Solanaceae) entre San Vicente y Chillán, a lo largo de un transecto latitudinal de 300 km., aproximadamente (Tabla 1), y almacenados en tubos con etanol 95%. Este rango geográfico, constituye sobre un 80% de la extensión de los cultivos de tabaco que son crecidos en Chile (ODEPA, 2002). Para limitar la posibilidad de muestrear individuos pertenecientes a un mismo clón, cada áfido individual fue colectado desde una planta hospedera separada por a lo menos 10 m de la siguiente.

Adicionalmente, se obtuvieron muestras de áfidos de diferentes zonas geográficas (Tabla1) con la colaboración de los Drs. Alex Wilson (University of Miami) y Clyde Sorenson (North Carolina State University) de diferentes localidades del Sudeste de EE.UU. (Carolina del Norte, Carolina del Sur y Virginia), Diana Ohashi (Estación Experimental Cerro Azul, INTA) de Argentina, Roni de Acevedo (Universal Leaf Tabacos Ltda.) de Brasil, así como también de los Drs. Jean-Christophe Simon (INRA-Rennes, Francia), Thomas Guillemaud (INRA-Sophia-Antipolis, Francia) y John Margaritopoulos (University of Thessaly, Grecia) que colaboraron con muestras de diferentes localidades de Grecia, respectivamente. Debido al bajo número de individuos para cada localidad muestreada, los individuos fueron agrupados y

tratados como una muestra representativa de cada país analizado. Consecuentemente, este estudio no trabajó con poblaciones, ocupándose el término población solo con fines descriptivos para referirse al total de individuos provenientes de cada país.

Tabla 1: Localidades muestreadas, número (n) de individuos colectados en cada país y sus localidades; coordenadas geograficas de cada localidad muestreada y número de genotipos obtenidos en los diferentes países y sus localidades, considerados en este estudio.

País/Localidad	n	Coordenadas	Nº Genotipos
Chile	40		1
Aitué	1	34°02`S/71°61`O	1
Alisas	2	34°16`S/71°65`O	1
Cerrillos	2	34°25`S/70°80`O	1
Higuelilillas	1	34°86`S/72°10`O	1
Hualañe	1	34°18`S/71°81`O	1
Huique	2	35°33`S/72°40`O	1
La Batalla	1	33°40`S/71°24`O	1
La isla	1	34°60`S/71°40`O	1
Los Aromos	1	35°33`S/71°13`O	1
Mercedes	3	35°17`S/71°17`O	1
Mesamávida	1	33°13`S/72°07`O	1
Mira río	1	35°25`S/72°18`O	1
Mancagua	1	35°20`S/72°02`O	1
Palquibudi	1	35°05`S/71°55`O	1
Panguilemo	1	35°36`S/71°58`O	1
Peralillo	2	35°16`S/72°16`O	1
Perejil	2	34°98`S/71°23`O	1
Platina Porvenir	1	33°59`S/70°70`O	1
Puntilla	2	33°48`S /70°53`O	1
San Enrique	1	34°55`S/71°56`O	1
San Gerardo Rio claro	1	35°28`S/71°26`O	1
San Guillermo	2	35°63`S/71°20`O	1
San Hernán	1	33°27`S/71°34`O	1
San Vicente	2	34°45`S/71°08`O	1
San Victor Alámos	2	34°50`S/71°15`O	1
Santa Cruz	2	34°63`S/71°36`O	1
Tierras Blancas	1	34°25`S/70°80`O	1
Argentina	20		2
Caa yarí. Bengelsdorff	4	27°75`S/57°61`O	2
Dos Arroyos	4	27°70`S/55°25`O	2
Dos Hermanas	12	33°16`S/58°90`O	2

País/Localidad	n	Coordenadas	Nº Genotipos
Brasil	24		2
Canguçu	8	31°40`S/52°68`O	2
Irineópolis	5	26°40`S/50°47`O	2
Santa Cruz do Sul	5	29°71`S/52°43`O	2
Venâncio Aires	6	29°60`S/52°18`O	2
EE.UU.	124		24
Berrion Co.	2	35°56`N/79°63`O	1
Campbell Co.	5	37°14`N/79°02`O	4
Chatham Co.	2	36°83`N/79°40`O	1
Columbus Co	4	35°25`N/82°20`O	4
Darlington Co.	4	35°30`N/79°37`O	2
Dillon Co.	4	34°42`N/79°37`O	2
Dinwiddie Co.	3	37°08`N/77°59`O	1
Edgecombe Co	4	35°56`N/81°86`O	2
Franklin Co.	5	36°68`N/76°92`O	5
Green Co.	1	37°13`N/78°31`O	1
Johnson Co.		33°82`N/79°45`O	
Johnston	3	33°83`N/81°80`O	1
Marion Co	3	36°83`N/81°52`O	1
Moore Co	2	34°83`N/81°99`O	1
Nc Bladen Co	2	34°54`N/78°79`O	2
NC Wake Co	3	35°98`N/78°51`O	2
Nottoway Co.	13	37°14`N/78°03`O	7
Pitt Co.	1	35°72`N/79°18`O	1
Transgénico	13	36°58`N/80°45`O	8
Wake Co.	7	37°57`N/76°43`O	4
Washington Co.	4	38°71`N/78°16`O	2
Willson Co.	3	37°40`N/77°87`O	2
Windsor CT	33	36°81`N/76°74`O	1
Grecia	52		15
Amfiklia, SC	10	36°37`N/22°34`E	2
Karditsa, C.	6	39°36`N/21°92`E	1
Katerini, C	10	40°27`N/22°50`E	3
Krya Vrisi, N	4	40°68`N/22°30`E	1
Meliki, N	16	40°51`N/22°39`E	9
Nauplio, CE.	6	37°56`N/22°80`E	4

3.2. ANÁLISIS CON MICROSATÉLITES

Con el fin de determinar y comparar (i) la identidad genotípica, (ii) la diversidad y (iii) la diferenciación genética entre poblaciones de diferentes países de América y Grecia, todos los individuos fueron analizados mediante la aplicación de 7 loci microsatélites (Myz 2; Myz 3; Myz9; Myz25; M35; M37 y M40), previamente descritos para *Myzus persicae* (Sloane *et al.*, 2001, Wilson *et al.*, 2002, 2004) (Tabla 2).

Para esto, se procedió a la extracción de DNA de cada individuo usando el método “Salting Out” descrito por Sunnucks & Hales (1996), resuspendiendo el DNA en 20 µl de agua ultrapura estéril. La calidad del DNA se determinó por electroforesis en geles de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. Cada locus microsatelital fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un volumen de 15 µl de reacción, incluyendo 0.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, USA), *buffer* 10x libre de Mg^{+2} , 2mM $MgCl_2$, 200 mM dNTPs, 10 pmol de cada primer (BiosChile- IGSA, Chile), y aproximadamente 50 ng de DNA de cada áfido. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 9700, usando los siguientes pasos: denaturación inicial de 3 min. a 94° C y 40 ciclos consistentes en denaturación por 40 s a 94° C, alineación por 45 s con una temperatura dependiendo del locus (Tabla 2) y elongación por 45 s a 72° C. Para el último ciclo, el tiempo de elongación fue extendido a 4 min. La confirmación de los productos de amplificación fue realizada a través del análisis en geles de agarosa 1.5% teñidos con bromuro de etidio, utilizando 7 µl de producto PCR por carril.

Para caracterizar los productos de PCR (alelos microsatelitales), estos fueron mezclados con buffer de carga 4 x (Sambrook *et al.*, 1989), desnaturalizados por 3 min. a 95° C, cargados en

un gel de poliacrilamida 6% urea 7M, y sometidos a una electroforesis en buffer de corrida TBE 0,5X a 1,2 kV. Terminada la electroforesis, el gel fue teñido con nitrato plata, para lo cual el gel fue fijado con etanol 10%, oxidado con ácido nítrico 1%, lavado con agua ultrapura e incubado por 20 min. en una solución de nitrato de plata (1g/l). Después de la incubación, el gel fue lavado y revelado en una solución de carbonato de sodio/formaldehído (Na_2CO_3 30g/l y 540 $\mu\text{l/l}$ de formaldehído 37 %). La reacción de revelado fue detenida con ácido acético 10 %, lavando el gel con agua y secándolo a temperatura ambiente toda la noche. El tamaño de los alelos para cada locus fue estimado usando como referencia un estándar de tamaño (en pares de bases) correspondiente a la secuenciación del vector pGEM-3Zf (+) (Promega, USA), cargado en cada gel (Fig.1). El tamaño de los alelos para cada locus microsatelital fue estandarizado de acuerdo con lo informado en la literatura (Sloane *et al.*, 2001, Wilson *et al.*, 2002, 2004), usando como referencia el DNA de *Myzus persicae* gentilmente aportado por la Dra. Alex C.C. Wilson .

Tabla 2: Características de los 7 loci microsatelitales empleados para el análisis de *Myzus persicae* (Sloane *et al.*, 2001, Wilson *et al.*, 2002, 2004). Para cada locus se indican los oligonucleótidos con sentido (F) y antisentido (R), el motivo de repetición, el rango de tamaño del producto PCR esperado, programa de PCR: a = 62, b = 61, c = 59, d = 57 y e = 55 y el N° de acceso a GenBank.

Locus	Secuencia partidores (5'-3')	Motivo de repetición	Rango tamaño(pb)	Programa PCR	N° acceso GenBank
Myz2	F: TGGCGAGAGAGAAAGACCTGC R:TCGGAAGACAGAGACATCGAGA	(GA) ₃₀ impura	177-207	PMP1	AY429659
Myz3	F: GGTGTCCTGCGTTATGATTATG R ATTCTTTTCCCGGCAGTTTAC	(GA) ₁₈	111-125	PMP1	AY429660
Myz9	F:AACCTCACCTCGTGGAGTTTCG R:CTTGGATGTGTGTGGGGTGC	(GA) ₅₃ impura	204-238	PMP1	AY429661
Myz25	F:AACCCATCTCACTCGTCAGCC R:GAATCTGGAGAGCGGTTAATGC	(AG) ₂₄	119-126	PMP1	AY429662
M35	F: GGCAATAAAGATTAGCGATG R:TGTGTGTATAGATAGGATTTGTG	(AT) ₉ ~(AC) ₂₂ impura	178-198	PMP1	AF233240
M37	F: GTGTGAGTAAGTCGTATTG R: TTGTATTATGTACCTGTGC	(AC) ₁₆	155-157	PMP1	AF233241
M40	F: ACACGCATACAAGAATAGGG R: AGAGGAGGCAGAGGTGAAAC	(AC) ₁₇	123-135	PMP1	AF233242

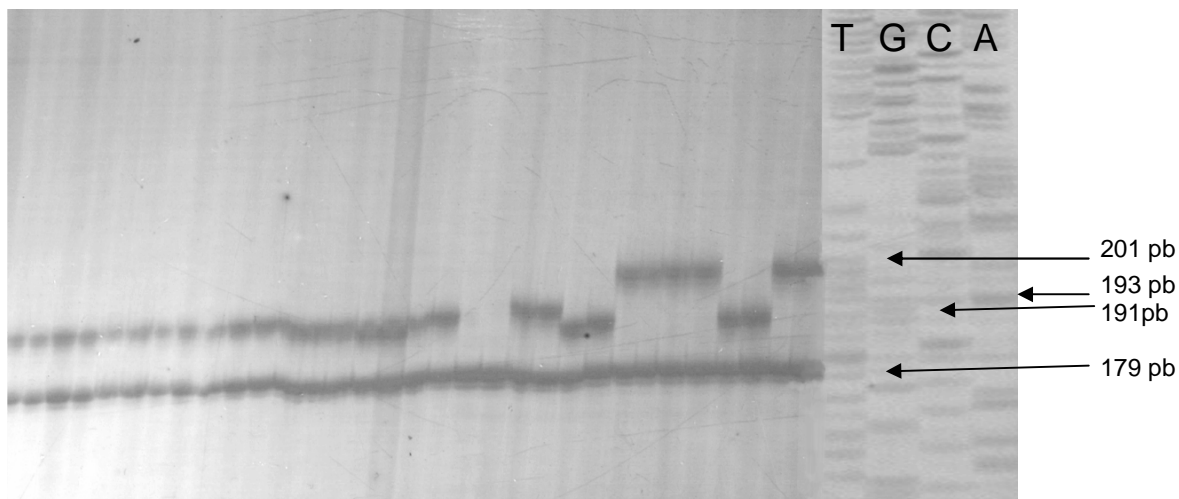


Figura 1: Gel de poliacrilamida 6% urea 7M, teñido con nitrato de plata, en el cual se aprecian los productos de amplificación del locus microsatelital Myz2 para *Myzus persicae nicotianae* con su respectivo tamaño en pares de bases (pb). A la derecha se aprecia el estándar, correspondiente a la secuenciación del vector pGEM-3Zf(+), (de izquierda a derecha T: ddTimina, G: ddGuanina, C: ddCitosina y A: ddAdenina). Los números a la derecha de las flechas indican el tamaño en pares de base (pb).

3.3 ANÁLISIS DE DATOS

El genotipo de cada individuo de *Myzus persicae ssp. nicotianae* para cada locus microsatélite amplificado se registró en una planilla Excel usando una nomenclatura de tres números correspondientes al tamaño en pares de bases de cada alelo. Los genotipos fueron individualizados mediante la combinación de todos los alelos de los 7 loci amplificados, de modo que se trabajó con genotipos multilocus (Tabla 3).

La diversidad genética fue determinada usando dos índices de acuerdo con Llewellyn *et al.* (2003) y con Figueroa *et al.* (2005). Primero, la diversidad genotípica global (DGG) fue calculada como G/N , donde G es el número de diferentes genotipos multilocus por población y N es el tamaño de dicha población. Segundo, se empleó el índice de diversidad de Shannon-Weaver, calculado como $H = -\sum_i p_i \log_e p_i$, donde p_i es la frecuencia relativa del i -ésimo genotipo (Shannon & Weaver, 1949). Este último algoritmo determina la diversidad genética con relación a la abundancia relativa de cada genotipo, lo que se puede expresar como e^H , obteniendo así un índice proporcional al número real de genotipos encontrados en cada población. Además, se calculó la diversidad alélica (A) y el número promedio de alelos por locus.

Los análisis de datos se llevaron a cabo mediante pruebas clásicas para genética de poblaciones. Sin embargo, debido a que la inclusión de copias clonales usualmente muestra fuertes distorsiones en las estimaciones genético poblacionales resultado de que los áfidos pueden exhibir diferentes modos de reproducción durante el año, se realizó un análisis particular utilizando solo una copia de cada genotipo multilocus, asumiendo que áfidos de un mismo genotipo multilocus representarían miembros de un mismo clón, un procedimiento

estándar en análisis genético poblacionales para poblaciones partenogenéticas (Sunnucks *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1999; Haack *et al.* 2000; Figueroa *et al.*, 2005; Halkett *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2006).

Las frecuencias alélicas y genotípicas, desviaciones del equilibrio de Hardy- Weinberg (HWE), desequilibrio de ligamiento y heterogeneidad genética, se calcularon mediante una prueba exacta de Fisher, usando la cadena de Markov (Guo & Thompson, 1992), un método eficaz para tamaños muestrales pequeños y gran número de alelos. Estas pruebas estaban contenidas en el programa GENEPOP versión 3.2^a (disponible en <http://genepop.curtin.edu.au>) (Raymond & Rousset, 1995a).

Los estadígrafos-F (Wright, 1965) fueron computados de acuerdo con Weir & Cockerhan (1984), en el programa GENEPOP versión 3.2^a. Aún cuando se realizó la remoción de copias clonales para evitar que las estimaciones de desviaciones del equilibrio de H-W distorsionaran las estimaciones de frecuencias alélicas y de diferenciación genética, todavía se pueden violar algunos supuestos de este equilibrio, así como también de los estadígrafos F, principalmente debido a la subestructuración de las muestras. Es así como, la interpretación de las desviaciones del equilibrio de H-W, se usan solo con fines descriptivos. De igual manera, los estadígrafos F se usan solo como una medida conveniente para mostrar la existencia de diferenciación entre poblaciones, y no para deducir sobre los procesos que dan cuenta de esa estructuración.

El estudio de las relaciones genéticas entre poblaciones fue realizado utilizando la distancia genética de alelos compartidos (D_{as} , Chakraborty & Jin, 1993), usando el programa POPULATION versión 1.2.01 (disponible en <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo>), con lo cual se construyó un árbol del vecino más cercano (Neighbour Joining Tree) que permite observar

gráficamente las relaciones de parentesco (similitud genética) entre distintas poblaciones usando el programa TREEVIEW versión 1.6.6. La detección de errores, durante la interpretación de alelos microsatelitales, se realizó usando el estimador de Brookfield (1996), entregando la frecuencia de alelos nulos, $r = (HE - HO)/(1 + HE)$ en una población, implementado en el programa MICRO-CHECKER versión 2.2.3 (disponible en <http://www.microchecker.hull.ac.uk>). Las significancias estadísticas fueron analizadas usando el método de Fisher (Oosterhout et al., 2004).

4. RESULTADOS

4.1. IDENTIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS MULTILOCUS

Como resultado del análisis con los 7 marcadores microsatélites, se encontró un total de 44 genotipos multilocus distribuidos en los 5 países estudiados (Tabla 3). De estos genotipos, 29 correspondieron a poblaciones Americanas. Tal como había sido informado previamente (Fuentes-Contreras *et al.*, 2004), se encontró un único genotipo multilocus predominante en Chile, mientras que en Argentina y Brasil se encontraron los mismos 2 genotipos, respectivamente, y 24 genotipos en EE.UU. Es interesante notar que el único genotipo chileno (Mn-CH-01), también está presente en Argentina (Mn-ARG-02), Brasil (Mn-BR-02), y EE.UU. (Mn-USA-24) donde también se lo observa en alta frecuencia (Fig 2). Sin embargo, este genotipo multilocus en EE.UU., solo fue encontrado en una localidad (Windsor Co.), donde todos los individuos colectados presentaron este genotipo. Por lo que su alta frecuencia (al agrupar todos los individuos por país) podría ser resultado de errores en el muestreo. Así como también, solo una fracción de sus alelos fueron observados en los otros genotipos multilocus presentes en EE.UU. Esto podría deberse a errores en el muestreo. Pero de igual forma podría significar una introducción independiente de este genotipo multilocus, seguido de una reproducción completamente partenogénica (modo anholocíclico) a EE.UU. En Grecia, en tanto, se encontraron 15 genotipos multilocus, de los cuales ninguno fue encontrado en poblaciones Americanas (Fig 2).

Tabla 3: Combinaciones alélicas en base al tamaño en pares de bases para 7 loci microsatélites de los genotipos multilocus encontrados en los 5 países estudiados. Se muestra además la frecuencia en que cada genotipo multilocus se encuentra en los diferentes países. El genotipo que es compartido por cuatro países aparece subrayado.

Genotipo	Locus Microsatélite							Frecuencia
	Myz2	Myz3	Myz9	Myz25	M35	M37	M40	
<u>Chile</u>								
Mn-CH-01	<u>191/193</u>	<u>125/125</u>	<u>214/218</u>	<u>123/123</u>	<u>203/203</u>	<u>155/157</u>	<u>128/130</u>	<u>1.0</u>
<u>Argentina</u>								
Mn-ARG-01	177/177	127/127	216/216	123/126	196/202	159/159	130/130	0.5
Mn-ARG-02	<u>191/193</u>	<u>125/125</u>	<u>214/218</u>	<u>123/123</u>	<u>203/203</u>	<u>155/157</u>	<u>128/130</u>	<u>0.5</u>
<u>Brasil</u>								
Mn-BR-01	177/177	127/127	216/216	123/126	196/202	159/159	130/130	0.54
Mn-BR-02	<u>191/193</u>	<u>125/125</u>	<u>214/218</u>	<u>123/123</u>	<u>203/203</u>	<u>155/157</u>	<u>128/130</u>	<u>0.46</u>
<u>EE.UU.</u>								
Mn-USA-01	193/201	119/119	210/212	123/123	202/202	159/159	138/142	0.146
Mn-USA-02	193/201	119/119	210/212	123/123	202/202	159/161	138/142	0.130
Mn-USA-03	179/191	119/127	196/212	123/123	180/180	159/159	130/130	0.098
Mn-USA-04	193/201	119/119	210/212	121/123	202/202	159/161	138/142	0.089
Mn-USA-05	193/201	119/119	210/212	121/123	202/202	159/159	138/142	0.057
Mn-USA-06	193/201	119/119	210/212	121/121	202/202	159/161	138/142	0.041
Mn-USA-07	179/191	119/127	196/210	123/123	180/180	159/165	130/130	0.016
Mn-USA-08	179/191	119/127	196/210	123/123	180/180	161/161	130/130	0.016
Mn-USA-09	179/191	119/127	196/210	123/123	180/180	159/159	130/130	0.016
Mn-USA-10	179/191	127/127	196/212	121/123	180/180	159/165	130/130	0.016
Mn-USA-11	193/201	119/119	196/210	123/123	202/202	159/161	138/142	0.008
Mn-USA-12	179/179	119/127	196/210	123/123	180/180	159/159	130/130	0.008
Mn-USA-13	193/201	119/127	210/212	123/123	202/202	159/161	138/142	0.008

Genotipo	Locus Microsatélite							Frecuencia
	Myz2	Myz3	Myz9	Myz25	M35	M37	M40	
Mn-USA-14	179/179	119/127	196/212	123/123	180/180	159/159	130/130	0.008
Mn-USA-15	193/201	119/119	196/212	123/123	180/180	159/161	138/142	0.008
Mn-USA-16	179/191	127/127	196/212	121/123	170/170	159/165	130/130	0.008
Mn-USA-17	193/201	119/119	196/210	123/123	180/180	159/159	138/142	0.008
Mn-USA-18	191/201	119/119	196/210	123/123	186/196	159/159	138/142	0.008
Mn-USA-19	179/191	119/127	210/212	123/123	180/180	159/159	130/130	0.008
Mn-USA-20	193/201	127/127	210/212	123/123	202/202	159/161	138/142	0.008
Mn-USA-21	179/179	127/127	210/212	123/123	180/180	159/159	130/130	0.008
Mn-USA-22	179/191	119/119	210/212	123/123	202/202	159/159	130/130	0.008
Mn-USA-23	193/201	127/127	210/212	123/123	180/180	159/159	138/142	0.008
<u>Mn-USA-24</u>	<u>191/193</u>	<u>125/125</u>	<u>214/218</u>	<u>123/123</u>	<u>203/203</u>	<u>155/157</u>	<u>128/130</u>	<u>0.268</u>
<u>Grecia</u>								
Mn-GR-01	179/191	119/127	196/204	123/123	180/198	159/167	123/123	0.269
Mn-GR-02	179/193	119/127	196/204	123/123	180/198	159/167	123/123	0.192
Mn-GR-03	179/189	125/133	196/216	123/123	178/206	157/165	123/123	0.115
Mn-GR-07	179/201	119/127	206/220	123/123	180/206	157/165	123/123	0.019
Mn-GR-08	179/179	115/125	196/206	123/123	178/186	159/159	119/121	0.038
Mn-GR-09	179/179	123/123	206/220	123/123	182/196	169/169	123/123	0.038
Mn-GR-10	179/189	115/115	206/216	123/123	180/196	159/159	123/123	0.038
Mn-GR-11	179/189	119/127	216/220	123/123	182/206	157/165	119/125	0.038
Mn-GR-12	179/193	117/127	196/204	123/123	180/198	159/167	123/123	0.038
Mn-GR-13	179/193	119/127	196/216	123/123	178/206	157/165	117/125	0.038
Mn-GR-14	179/193	123/123	196/206	123/123	178/206	155/167	119/121	0.038
Mn-GR-15	179/193	123/123	196/220	123/123	178/186	163/163	123/123	0.038
Mn-GR-16	179/193	125/133	196/204	123/123	180/198	159/167	117/125	0.038
Mn-GR-17	179/201	121/123	196/212	119/123	186/186	155/167	117/123	0.038
Mn-GR-18	179/201	121/123	196/212	119/123	186/186	157/165	117/123	0.019

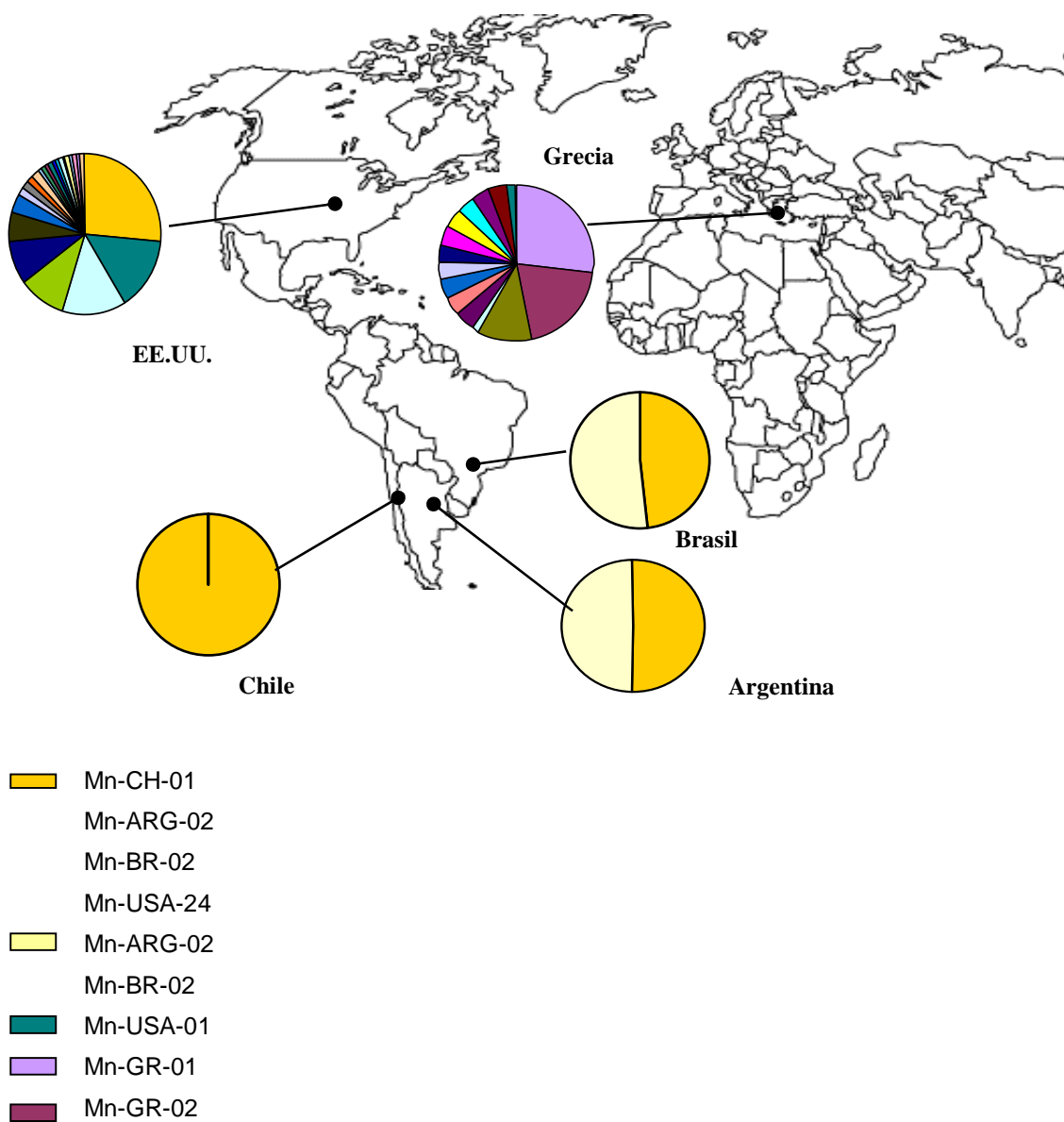


Figura 2: Distribución y frecuencias de los genotipos de *Myzus persicae nicotianae* entre los cinco países estudiados. Cada gráfico circular representa un país analizado, indicando la frecuencia relativa de cada genotipo multilocus. Cada color en los gráficos indica un genotipo multilocus distinto. La leyenda muestra los 2 genotipos más representativos presentes en cada país.

4.2. DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES

La diversidad genética, considerando el índice DGG, arrojó una completa ausencia de diversidad genética para la población de Chile ($DGG = 0.025$) y una muy baja diversidad genética Argentina ($DGG = 0.1$) y Brasil ($DGG = 0.083$). EE.UU. ($DGG = 0.194$) aunque mostró una mayor diversidad que poblaciones de Sudamérica, sigue siendo menor comparada con la más alta diversidad genética mostrada por la población de Grecia ($DGG = 0.294$). Igualmente, el índice de diversidad de Shannon-Weaver arrojó una baja diversidad genética para las poblaciones de Chile ($e^H = 1.0$), Argentina ($e^H = 2.0$) y Brasil ($e^H = 2.0$), diferente a lo observado para EE.UU. ($e^H = 11.2$) y Grecia ($e^H = 10.2$), que mostraron una mayor diversidad genética comparado con la obtenido en las otras poblaciones (Tabla. 4).

Asimismo, la diversidad alélica (A) también fue baja para la muestra Chilena ($A = 1.52$) comparada comparado con lo observado para las poblaciones de Argentina y Brasil, que presentan la misma diversidad alélica ($A = 2.57$). EE.UU. ($A = 4.29$), mostró una mayor diversidad alélica que las otras poblaciones Americanas. Mientras que Grecia arrojó la mayor diversidad alélica ($A = 5.71$) (Tabla. 4). Contrario a lo observado con los índices de diversidad analizados, el índice de Shannon- Weaver, arrojó una mayor diversidad para EE.UU. y menor para Grecia, lo que se debería a que este índice analiza el número de genotipos en base a su frecuencia relativa, sin incluir el tamaño de la muestra.

Se encontraron frecuentes desviaciones con respecto a lo esperado por el equilibrio genético de Hardy - Weinberg en Argentina, Brasil y EE.UU. En estas poblaciones se observan valores-P positivos de F_{is} multilocus y significativos para los valores-P de déficit de heterocigotos (Tabla 4), lo que indicaría que las desviaciones del equilibrio de H-W que

resultarían de un déficit de heterocigotos. Los valores arrojados para Chile no pueden ser interpretados debido a que presenta solo un genotipo multilocus. Totalmente opuesta es la situación de Grecia que mostró valores negativos de F_{is} , evidenciando un ligero exceso de heterocigotos, pero no significativo para ninguno de los valores-P de déficit y exceso de heterocigotos (Tabla 4). Es así como, la población de Grecia se encontraría en equilibrio según lo predicho por H-W. Una prueba para desequilibrio de ligamiento (DL) para la población de EE.UU. arrojó significativo DL para 11 de 21 pares de loci; entre *.Myz2 /Myz3*, *Myz9*, *M35*, *M37* y *M40*; *M35/Myz3*, *Myz9*, *M37* y *M40*; *M37/M40* y *Myz9/M40*. Igualmente, la población de Grecia presentó 6 de 21 pares de loci significativo DL, entre el locus *Myz9/ M35*, *M37* y *M40*; *Myz25/ Myz3* y *M40*; *M35/M37* (Tabla 4). Las poblaciones de Chile, Argentina y Brasil, no fueron analizadas debido a la baja disponibilidad de datos. Adicionalmente, el análisis de estimación de alelos nulos, arrojó que podrían estar presentes alelos nulos en el locus *M35* para la población de EE.UU. y en el locus *Myz3* para las poblaciones de Argentina y Brasil. Grecia no mostró evidencia de alelos nulos en sus loci (Tabla 5). Este análisis no se pudo realizar a muestras de Chile debido a la baja disponibilidad de genotipos después de la remoción de copias clonales, solo un genotipo multilocus.

Tabla 4: Índices de diversidad genética de las poblaciones, en base a los 7 loci microsatélites analizados; N: número de individuos; G: número de genotipos multilocus; Ho: heterocigosidad observada; DL: pares de loci en significativo disequilibrio de ligamiento ($P < 0.05$); NS= no significativo ($P > 0.05$); *: significativo ($P < 0.01$).

Análisis / Población	Chile	Argentina	Brasil	EE. UU.	Grecia
N	40	20	24	124	52
G	1	2	2	24	15
DGG	0.025	0.1	0.08	0.19	0.29
e^H	1.0	2.0	1.99	11.2	10.2
Nº total de alelos	11	19	19	31	39
A	1.57	2.57	2.57	4.29	5.71
Ho	-	0.429	0.429	0.476	0.708
P deficit	-	*	*	*	NS
P exceso	-	NS	NS	NS	NS
Fis multilocus	-	0.5	0.5	0.155	-0.007
DL	-	-	-	11/21	6/21

Tabla 5: Frecuencias esperadas de alelos nulos calculadas usando el segundo estimador de Brookfield (1996) implementado en el programa MICROCHECKER (* = $P < 0.05$).

Locus	Argentina	Brasil	EE.UU.	Grecia
Myz2	0.077	0.09	0	0
Myz3	0.333*	0.332*	0.12	0.05
Myz9	0.077	0.09	0	0
Myz25	0	0	0.09	0
M35	0.077	0.062	0.35*	0
M37	0.077	0.099	0.03	0.05
M40	0	0	0.08	0.08

4.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES

El análisis de la distribución de la diversidad genética entre las distintas poblaciones (países), se realizó mediante el índice de diferenciación genética (F_{st}), que explica los cambios en la heterocigosidad debido a la subdivisión poblacional y deriva génica, estimando la diferenciación genética existente entre las poblaciones. Los valores de F_{st} van entre el rango de 0 a 1, donde el primero, significaría frecuencias alélicas idénticas entre poblaciones, representando ninguna diferenciación genética entre ellas y el segundo, resultaría de una diferenciación al máximo de las frecuencias génicas entre poblaciones, indicando fijación de alelos alternativos en las poblaciones (Hartl & Clark, 1997). Los resultados arrojan una no diferenciación entre las poblaciones de Chile, Argentina y Brasil (F_{st} multilocus no significativamente distinto de cero) (Tabla 6). En cambio, en la población de EE.UU. se observa una moderada diferenciación respecto de las otras poblaciones Sudamericanas estudiadas: Argentina ($P < 0.001$), Brasil ($P < 0.001$) y una alta diferenciación con Chile ($F_{st} = 0.343$, $P < 0.0001$). Igualmente la población de Grecia mostró una marcada diferenciación genética, presentando valores significativos de F_{st} ($P < 0.0001$) al comparar con todas las poblaciones de Sudamérica y EE.UU.

Tabla 6: Diferenciación genética entre las poblaciones de *Myzus persicae ssp. nicotianae* (F_{st}) (Triangulo inferior) y significancias estadísticas (triangulo superior), HS: altamente significativo.

Población	Chile	Argentina	Brasil	EE.UU.	Grecia
Chile	-	1.00	1.00	<0.0001	<0.0001
Argentina	0.0000	-	1.00	<0.001	<0.0001
Brasil	0.0000	-0.600	-	<0.001	<0.0001
EE.UU.	0.343	0.144	0.144	-	<0.0001
Grecia	0.283	0.162	0.162	0.191	-

4.4. RELACIONES ENTRE LAS POBLACIONES

Las relaciones de parentesco genético entre las distintas poblaciones fueron analizadas por medio de la Distancia de Alelos Compartidos (D_{as}), que se basa en la agrupación de individuos de acuerdo a su parecido, por el hecho de compartir una mayor o menor cantidad de alelos entre genotipos, es de gran ayuda al momento de establecer o asignar parentesco entre individuos, especialmente cuando se desconoce la información genealógica (Bowcock *et al.*, 1994).

En nuestros resultados, se observa un bajo grado de diferenciación entre las poblaciones de Chile con Argentina ($D_{as} = 0.262$) y Brasil ($D_{as} = 0.331$) y una alta diferenciación con la población de EE.UU. ($D_{as} = 0.440$), y menores con las poblaciones de Argentina ($D_{as} = 0.13$) y Brasil ($D_{as} = 0.13$). Entre las poblaciones de Argentina y Brasil no se observó diferenciación ($D_{as} = 0$). Grecia mostró un alto grado de diferenciación con todas las otras poblaciones en estudio, arrojando con Chile ($D_{as} = 0.717$), Argentina ($D_{as} = 0.635$), Brasil ($D_{as} = 0.640$) y EE.UU. ($D_{as} = 0.487$). (Tabla 7). Se construyó un árbol del vecino más cercano (Neighbour Joining Tree) basado en la distancia de alelos compartidos (D_{as}) (Fig. 3). El árbol representa las relaciones de cercanía de las diferentes poblaciones mostrando que las distancias genéticas se incrementan desde Sudamérica hacia Norteamérica y Europa. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por los F_{ST} , para todas las poblaciones.

Tabla 7: Distancia genética D_{as} (Distancia de Alelos Compartidos de acuerdo con Jin & Chakraborty, (1993)), entre las poblaciones de *Myzus persicae ssp. nicotianae*.

Población	Chile	Argentina	Brasil	EE.UU.	Grecia
Chile	-				
Argentina	0.2621	-			
Brasil	0.3114	0	-		
EE.UU.	0.4404	0.3593	0.3766	-	
Grecia	0.7176	0.6355	0.6404	0.4871	-

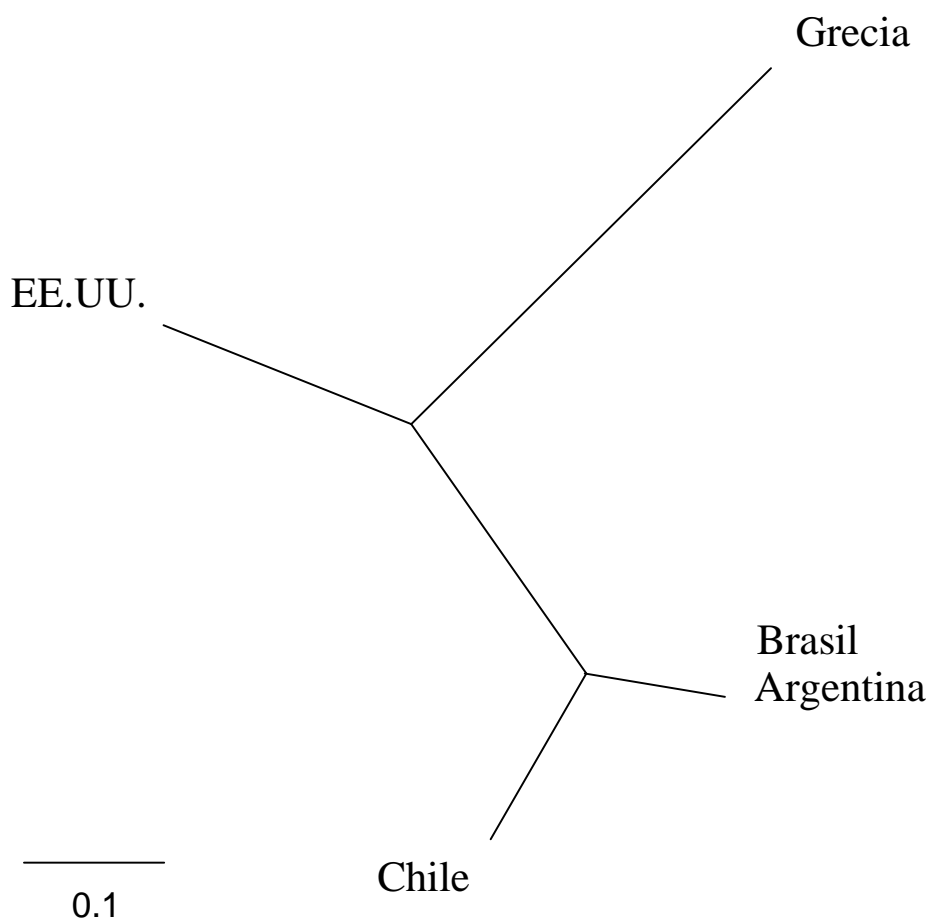


Figura 3: Árbol del vecino más cercano (Neighbour-joining tree) construido con la Distancia de alelos compartidos calculada con 7 loci microsatélites. Se muestran las relaciones de parentesco entre las poblaciones de *Myzus persicae ssp. nicotianae*.

5. DISCUSIÓN

5.1. DIVERSIDAD GENÉTICA EN LAS POBLACIONES

Una completa ausencia de variabilidad genética revelada por los marcadores microsatélites, fue encontrada para la población de Chile y una baja diversidad genética en las otras poblaciones de Sudamérica; Argentina, Brasil y una mayor diversidad genética en EE.UU., esto acompañado de un déficit de heterocigotos. Estudios previos en otras especies de áfidos como *Sitobion avenae*, han observado que por el contrario, la heterocigosidad aumenta a medida que disminuye la sexualidad (Sunnucks *et al.*, 1997; Simón *et al.*, 1999; Figueroa *et al.*, 2005), así como también para *Myzus persicae* (Vorburger *et al.*, 2003). Sin embargo, Wilson *et al.*, (2002), informó que poblaciones sexuales de *Myzus persicae* en Australia, no presentaban desviaciones al equilibrio de H-W., sugiriéndose que esto podría no representar un general fenómeno. Congruentemente, Margoritopoulos *et al.*, (2007) informó que poblaciones anholocíclicas de *Myzus persicae* en Grecia, presentaron una mayor deficiencia de heterocigotos que poblaciones holocíclicas. Varias explicaciones podrían responder a este exceso de homocigotos, tales como presencia de alelos nulos, efecto Wahlund, endogamia y selección. Primero, por una alta consanguinidad entre los individuos que forman parte de una población. Sin embargo, el modo de reproducción que se favorece bajo condiciones climáticas templadas es la partenogénesis (Simon *et al.*, 1999). De hecho, el Valle central de Chile presenta un clima caracterizado por inviernos templados con la casi completa ausencia de nieve (Novoa *et al.*, 1989). Segundo, la presencia de alelos nulos podría explicar el exceso de homocigosis. Se habla de alelos nulos cuando estos no pueden ser amplificados por PCR,

debido principalmente a una mutación en las secuencias de alineación del partidador. Uno de los alelos no amplifica y por lo tanto el individuo es designado como homocigoto para el otro alelo (Dawson *et al.*, 1997). Pruebas usando el software Microchecker sugieren la presencia de alelos nulos para un solo locus en las poblaciones de Argentina, Brasil y EE.UU. Es así como la presencia de alelos nulos podría explicar el déficit de heterocigotos para la población de EE.UU. ya que esta población presenta un bajo valor positivo de Fis, pero solo explicaría en parte el déficit de heterocigotos para las poblaciones de Argentina y Brasil, ya que presentan altos valores positivos de Fis multilocus. Tercero, pero la homocigosis puede ser explicada por selección. El ciclo de vida de estos áfidos así como su desempeño biológico, podrían estar asociados con altos niveles de homocigosidad. Genotipos preferentemente homocigotos podrían presentarse en mayor frecuencia debido a determinadas características de su ciclo de vida, como ha sido propuesto por Simon *et al.*, (1999). Sin embargo, se debe tener cautela, ya que la homocigosidad observada corresponde a loci neutros o casi neutros (microsatélites), lo que no necesariamente significará que loci codificantes (con impacto en el fenotipo) también se encuentren en homocigosis. Así como también, los efectos del azar no pueden ser descartados. Dado que esta especie habría sido introducida hace unos pocos años, su actual estatus genético en estos tres países de Sudamérica podría ser consecuencia de un fuerte cuello de botella (disminución del número de individuos) resultado de un efecto fundador (pérdida azarosa de individuos), seguido de reproducción asexual (genotipos anholociclicos). Por último, un exceso de homocigotos es esperado, por un efecto Wahlung, debido a la subestructuración de las muestras, es decir, muestras de diferentes poblaciones agrupadas como una sola población representativa de cada país analizado.

La completa ausencia de diversidad genética, en Chile, presentando solo un genotipo multilocus, también presente en Argentina y Brasil, y la baja diversidad genética en Argentina y Brasil, presentando los mismos 2 genotipos multilocus, sugiere un modo de reproducción predominantemente asexual en estas poblaciones, como también se ha propuesto para otras especies de áfidos (Simon *et al.*, 1999; Papura *et al.*, 2003; Figueroa *et al.*, 2005; Halckett *et al.*, 2006). El sudeste de EE.UU. presenta una mayor diversidad genética que los países de Sudamérica, pero menor que la diversidad genética encontrada en Grecia y un alto desequilibrio de ligamiento, así como también 3 genotipos multilocus representan más del 50 % de la muestra. Estos resultados sugirieron una reproducción predominantemente asexual, sin descartar eventos de reproducción sexual. En concordancia se ha sugerido para poblaciones de *Myzus persicae nicotianae* en EE.UU., una reproducción predominantemente partenogénica durante todo el año (modo anholocíclico) (Clements *et al.*, 2000). En tanto Grecia, contrario a lo observado en América, presenta una alta diversidad genética, presentandose en equilibrio de H-W. y un menor desequilibrio de ligamiento que EE.UU., pero al igual que EE.UU., 3 genotipos representan más del 50% de la muestra. Estos resultados sugieren una mayor ocurrencia de eventos de reproducción sexual, en comparación con los otros países analizados. Sin embargo, no se puede descartar que puedan presentarse clones (genotipos) y/o poblaciones con reproducción asexual durante todo el año (modo anholocíclico), como ya lo informó Zitoudi *et al.*, (2001) en Grecia, quien observó una alta diversidad genética usando RAPD-PCR. Más recientemente, Margaritopoulos *et al.*, (2007), analizó poblaciones de *Myzus persicae nicotianae* en Grecia, usando los mismos 7 loci microsatélites usados en este estudio, encontrando una alta diversidad alelica (A) en un rango de 4.2 a 5.6 respectivamente, congruente a lo encontrado en este estudio, y donde más del 60% de los individuos sobre

tabaco se reproducían por partenogénesis cíclica. Wilson *et al.* (2002), informó una diversidad alélica de 5.2 para poblaciones partenogénicas cíclicas de *Myzus persicae* sobre su hospedero primario (duraznero). Estos estudios han correlacionado la distribución geográfica de modos de reproducción con factores ambientales, en donde la partenogénesis obligada es menos frecuente en inviernos severos, debido a que estos no producen huevos resistentes al frío, mientras que partenogénesis cíclica está limitada por la disponibilidad del hospedero primario, duraznero, donde realiza reproducción sexual (Wilson *et al.*, 2002; Fenton *et al.*, 2003; Guillemaud *et al.*, 2003; Vorburguer *et al.*, 2003).

Así también, otras especies de áfidos como *Sitobion avenae*, en Francia presentó una alta diversidad genética y genotípica (Simón *et al.*, 1999), congruente a lo encontrado en Grecia. En general, países Europeos que presentan climas mediterráneos, se han caracterizado por presentar de moderada a alta diversidad genética y genotípica, presentando toda la gama de estrategias reproductivas, con un alto porcentaje de poblaciones holocíclicas. Por el contrario, países que presentan climas severos, caracterizados por temperaturas de hasta -10°C , por ejemplo Rumania, se ha informado una alta diversidad genética, ($A= 8.8$), mayor a las informadas en otros países Europeos con climas mediterráneos (Papura *et al.*, 2003).

5.2. POTENCIAL ORIGEN DE *Myzus persicae ssp. nicotianae* EN CHILE.

En general, se ha observado que hay dos consecuencias genéticas sobre las poblaciones que invaden una nueva región geográfica: (i) pérdida de diversidad genética, e (ii) incremento de las distancias genéticas entre poblaciones recién establecidas con respecto a las poblaciones en el área de origen (Le Corre & Kremer, 1998). Estudios que han comparado

poblaciones en su rango nativo e introducido han observado una disminución de los niveles de diversidad genética en el rango introducido (Stone & Sunnucks, 1993; Tsutsui *et al.*, 2000). Como lo informado por Downie (2002), para filoxera de la vid (*Daktulosphaira vitifoliae*), que en su rango nativo (Norte América) presento una mayor diversidad genética que en su rango introducido, Asimismo se han realizado estudios en peces, como lo informado por Lindholm *et al.*, (2005) para guppy (*Poecilia reticulata*), que en su área introducida Australia presenta una reducida diversidad genética comparada con áreas de origen. Otro ejemplo lo informo Grapputto *et al.*, (2005), para el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineat*), donde Europa, su rango introducido, contenía solo una fracción de la variabilidad genética observada en su rango nativo, EE.UU. Estudios previos en áfidos, han comparado poblaciones de *Sitobion avenae* de Chile y Francia, mostrando una reducción 34% de la diversidad alelica en Chile en comparación con la población Europea, observando que eventos fundadores reducen drásticamente la diversidad genética en poblaciones introducidas (Figuroa *et al.*, 2005).

Estos resultados se ajustan a lo esperado como consecuencia de una introducción reciente desde Norte América. La disminución de la diversidad genética, como muestra la figura 2 donde se representa gráficamente la disminución de la diversidad genotípica desde Norteamérica hacia Sudamérica, acompañada de un aumento en la diferenciación genética y distancia genética, como muestra la figura 3, entre las poblaciones Americanas, respondería a sucesivos efectos fundadores desde Norteamérica hacia Sudamérica. La completa ausencia de diversidad genotípica en Chile, sugiere además que el o los eventos fundadores sería(n) de muy reciente ocurrencia, lo que coincide con los antecedentes previos que informan la presencia de esta especie solo desde fines de los años noventa (Fuentes-Contreras *et al.*, 2004). El modelo

poblacional que mejor se ajusta a estas observaciones es el modelo de estructura poblacional de “Stepping-stone” (Kimura & Weiss, 1964), el que predice que la dispersión es más probable que ocurra entre subpoblaciones adyacentes, que en subpoblaciones más distantes geográficamente, presentando una disminución de la diversidad genética y un incremento de las distancias genéticas al aumentar la distancia geográfica.

Los sucesivos eventos fundadores en la invasión de *Myzus persicae nicotianae* desde Norteamérica hacia Sudamérica. Sería resultado de la estrecha relación entre áfidos y prácticas agrícolas. Es así como especies que mantienen una estrecha asociación con el hombre, presentan una mayor probabilidad de invadir nuevos ambientes (Elton, 1958), principalmente al verse incrementada la posibilidad de ser transportadas deliberada o inadvertidamente durante el intercambio comercial (Crooks & Suarez, 2006). Áfidos viajarían como verdaderos “polizones” durante el transporte comercial, esto sumado a su alta capacidad de dispersión por vuelos a largas distancias ayudados por la columna de aire y/o por movimientos a cortas distancias (vuelos de reconocimiento) (Ioxdale *et al.*, 1993). Así como también, a su alta tasa de reproducción, han conferido a los áfidos el estatus de plaga, presentando un alto éxito en el transporte, establecimiento y expansión en nuevas áreas.

Adicionalmente, considerando que la mayoría de los áfidos que constituyen plagas en Norte América han introducido desde el Viejo Mundo (Blackman & Eastop, 2000), estos resultados sugieren una introducción de *Myzus persicae nicotianae* a Norteamérica posiblemente desde poblaciones con una mayor diversidad genética como la encontrada en Grecia, pero la comparación de poblaciones de Norte América con un mayor número de poblaciones de países Europeos, podría entregar más información sobre la introducción de esta subespecie a América.

5.3 PREDOMINANCIA DE UN GENOTIPO EN AMÉRICA Y LA HIPÓTESIS DEL SUPERCLÓN

Las invasiones biológicas son rápidos eventos evolutivos en donde las poblaciones frecuentemente sufren los efectos fundadores durante la colonización, seguido por una rápida expansión poblacional (Sakai *et al.*, 2001). El término “especie invasora” usualmente se refiere a una especie introducida que tiene un impacto negativo sobre la biodiversidad, actividades económicas y/o sobre la salud humana. La rápida expansión de especies exóticas ha sido sobre todo investigado desde un punto de vista ecológico, mientras que los aspectos evolutivos de las invasiones han sido sustancialmente inexplorados (Lee *et al.*, 2002).

Una paradoja existe en biología de invasiones: ¿Cómo organismos que sufren de un cuello de botella poblacional, el que típicamente se traduce en una fuerte disminución de la diversidad genética, un bajo potencial evolutivo y un bajo desempeño reproductivo, pueden convertirse en especies persistentes y adaptadas a nuevas condiciones ambientales? (Kolbe *et al.*, 2004, Frankham *et al.*, 2002). Potenciales soluciones para entender esta paradoja son aportadas por los organismos asexuales o que pueden realizar auto-fertilización. Estos se caracterizan por poseer altas tasas reproductivas y/o teniendo altas tasas de migración que permitan la ocurrencia de repetidas introducciones, sorteando de esta forma la baja diversidad genética y la consanguinidad (Frankham *et al.*, 2002). Existen muchos ejemplos de especies introducidas que son persistentes y que en algunos casos se desarrollan rápidamente. Aunque las reducciones de diversidad genética son típicamente consideradas perjudiciales, se conocen ejemplos en que la pérdida de diversidad genética han mostrado ser ventajosas sobre el potencial invasor. Tal es el caso de la hormiga Argentina (*Linepithema humile*), para la cual la

pérdida de diversidad genética, siguiente a la invasión hacia América del Norte ha resultado en una reducción de la agresión intraespecífica llevando a la formación de “Supercolonias”, clave para el éxito ecológico (Tsutsui *et al.*, 2000). Este ejemplo sugiere que algunas especies tendrían una cierta habilidad para evadir y/o reducir los efectos de la pérdida de variación genética asociada con cuellos de botella durante una introducción (Huey *et al.*, 2000). Así, un cuello de botella poblacional no necesariamente frenará la evolución en las poblaciones (Frankham *et al.*, 2002).

Gracias al desarrollo de marcadores genéticos de alta resolución para estudios en poblaciones de áfidos, se han informado genotipos predominantes y persistentes, ampliamente distribuidos en espacio y tiempo, presentando modo de reproducción asexual (Sunnucks *et al.*, 1996; Fenton *et al.*, 1998; Fuller *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999; Haack *et al.*, 2000; Figueroa *et al.*, 2002; Llewellyn *et al.*, 2003; Figueroa *et al.*, 2005). Estos genotipos, por una selección clonal, promoverían la emergencia de “Superclones” (Llewellyn *et al.*, 2003, Vorburguer *et al.*, 2003), que se caracterizan por una extensa distribución geográfica y alto éxito ecológico (Vorburger *et al.*, 2003; Figueroa *et al.*, 2005).

Los presentes datos revelan la existencia de un único clón predominante en Chile, que está también presente en otros dos países de Sudamérica, Argentina y Brasil, así como también en EE.UU. Esto representaría evidencia de un genotipo altamente exitoso, muy frecuente y ampliamente distribuido a través de las poblaciones de *Myzus persicae ssp. nicotianae* en América, presentando características de un “Superclón”. Como lo informara Vorburguer *et al.*, (2003a) para *Myzus persicae* en Australia, dos genotipos predominantes y ampliamente distribuidos constituyeron más del 40% de la muestra. Esta situación no es inusual en áfidos. Para el pulgón de los cereales *Sitobion avenae*, también se ha sugerido la existencia de

“Superclones”, observándose que 3 genotipos constituyen más del 80% de las poblaciones de áfidos sobre cereales en Chile, y que fueron encontrados sobre diferentes plantas hospederas y zonas agroclimáticas (Figueroa *et al.*, 2005). De este modo, repetidos hallazgos indican que linajes asexuales predominantes son característicos en muchas poblaciones de áfidos.

El “secreto del éxito” de estas especies invasoras, como el caso de *Myzus persicae nicotianae*, se debería a que en su rango nativo, estas especies podrían exhibir toda la gama de estrategias reproductivas incluyendo, partenogénesis cíclica (alternancia de varias generaciones partenogénicas con una única generación sexual, o modo holocíclico) hasta la partenogénesis obligada (partenogénesis permanente de hembras, o modo anholocíclico) (Moran, 1992; Simon *et al.*, 2002). Pero en una nueva área geográfica, los áfidos favorecerían la reproducción por partenogénesis obligada o al menos funcional (i.e. reproduciéndose asexualmente cuando las condiciones climáticas y de fotoperíodo se lo permitan) (Simon *et al.*, 2002). Lo anterior, junto a la alta capacidad de dispersión de los áfidos, ya sea por vuelos directos o como consecuencia de intercambios comerciales, permitiría que los genotipos asexuales sean los mejores colonizadores. Estos no tendrían problemas de encontrar a un conoespecífico para aparearse, ni de encontrar al hospedero primario para reproducirse sexualmente, en el caso de especies con hospederos secundarios (Wilson *et al.*, 2003), simplificando su estrategia reproductiva.

5.4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren una vía de introducción a Chile del áfido *Myzus persicae nicotianae*, desde Norteamérica hacia el Sudamérica, con una pérdida de diversidad genética y aumento de las distancias genéticas entre poblaciones.

El modelo poblacional que mejor se ajusta a estas observaciones, sería el modelo “Stepping-stone”, que predice una pérdida de diversidad genética y un incremento de la diferenciación genética a medida que aumenta la distancia geográfica.

Además, la presencia de un genotipo ampliamente distribuido entre poblaciones y que se encuentra en una alta frecuencia, apoyaría la hipótesis de la existencia de “Superclones”, la que predice genotipos con un amplio rango de distribución y un alto desempeño biológico.

5.5. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos enfatizan en la exploración de características adaptativas, para entender el rol de la evolución en el éxito de especies invasoras como *Myzus persicae ssp. nicotianae*, esto solo podría ser posible con una comparación de poblaciones en su rango nativo y poblaciones introducidas. Tal información nos proporcionaría perspectivas de las características ecológicas claves del éxito en la invasión.

6. REFERENCIAS

- Al-aboodi. A. and French-Constant. R.H. (1995). RAPD PCR confirms absence of genetic variation between insecticide resistant variants of the peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Great Lakes Ent., 28, 127-133.
- Amsellen. L., Noyer. J.L., Le Bourgeois. T., Hossaert-Mckey. M. (2000) Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Mol. Ecol., 9, 443-455.
- Clements. K.M., Sorenson. C.E., Wiegmann. B.M., Neese. P.A., Roe. R.M. (2000) Genetic, biochemical, and behavioral uniformity among populations of *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. Entomol. Exper. Applic., 95, 269–281.
- Blackman, R.L. (1987) Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae), and a key to New World *Myzus* (Nectarosiphon) species. Bull. Entomol. Res., 77, 713-730.
- Blackman, R.L. and Eastop, V.F. (2000) Aphids on the World's Crops. 2^a ed. John Wiley & Sons, London, 466 pp.

- Blackman. R.L. and Eastop. V.F. (2005) Some new synonyms in Aphididae (Hemiptera: Sternorrhyncha). *Zootaxa*, 1089, 1–36.
- Bowcock. A. M., Ruiz-Linares. A., Tomfohrde. J., Minch. E., Kidd. J. R., Cavalli- Sforza. L. L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368, 455-457.
- Chakraborty. R. and Jin. L. (1993) A unified approach to the study of hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. En: *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ, Birkhauser, Basel, Switzerland. pp. 153-175.
- Chamberlin, F. S. (1958) History and status of the green peach aphid as a pest of tobacco in the United States. U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. 1175.
- Clements, K.M, Wiegmann, B.M, Sorenson, C.E, Smith, C.F, Neese, P.A. & Roe, R.M. (2000a) Genetic variation in the *Myzus persicae* complex (Homoptera: Aphididae): evidence for a single species. *Ann. Entomol. Soc. America.*, 93, 31–46.
- Clements, K.M, Sorenson, C.E, Wiegmann, B.M, Neese, P.A. & Roe, R.M. (2000b) Genetic, biochemical and behavioral uniformity among populations of *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. *Entomol. Experimentalis et Applicata*, 95, 269–281.

- Davies. N., Villablanca. F.X., Roderick. G.K. (1999) Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *Trends Ecol. Evol.*, 14, 17-21.
- Dawson. R. J. G., Gibbs. H.L., Hobson. K.A., Yezerinac. S.M.(1997) Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* the yellow warbler, and their use in population studies. *Heredity*, 79, 506-514.
- De Jong. JK. (1929) Enkele resultaten von het onderzoek naar de biologie von de tabaksluis *Myzus persicae* Sulzer. *Bulletin Van Het Deli Proefstation Te Medan*, 28, 1–36.
- Delmotte. F., Leterme. N., Bonhomme. J., Rispe. C., Simon. J.C. (2001) Multiple routes to asexuality in an aphid species. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B.* 268, 2291–2299.
- Downie. D.A. (2002) Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Mol. Ecol.*, 11, 2013-2026.
- Eisen. J.A. (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability. En: Goldstein D.B. y Schlötterer C. (Eds.) *Microsatellites, Evolution and Applications*: 34-48. Oxford University Press, Oxford.

- Ellegren. H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Rev. Genet.*, 5, 435-445
- Everett. R.A. (2000) Patterns and pathways of biological invasions. *Trends Ecol. Evol.*, 15,177-178.
- Facon. B., Pointier. J.P., Glaubrecht. M., Poux. C., Jarne. P., David. P. (2003) A molecular phylogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic Thiarid Snail. *Mol. Ecol.*, 12, 3027-3039.
- Fenton. B., Woodford J.A.T, Malloch. G. (1998) Analysis of clonal diversity of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in Scotland, UK and evidence for the existence of a predominant clone. *Mol. Ecol.*, 7, 1475-1487.
- Fenton. B., Malloch. G., Navajas. M., Hillier. J., Birch. A.N.E. (2003) Clonal composition of the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) in France and Scotland: comparative analysis with IGS fingerprinting and microsatellite markers. *Ann. Applied Biology.*, 142, 255-267.
- Field, L.M., Javed, N., Stribley, M.F. & Devonshire, A.L. (1994) The peach-potato aphid *Myzus persicae* and the tobacco aphid *Myzus nicotianae* have the same esterase-based mechanisms of insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 3, 143–148.

Figueroa. C.C., Loayza-Muro. R., Niemeyer. H.M. (2002) Temporal variation of RAPD-PCR phenotype composition of the grain aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) on wheat: the role of hydroxamic acids. *Bull. Entomol. Res.*, 92, 25-33.

Figueroa. C.C., Simon. J.C., Le Gallic. J.F., Prunier-Leterme. N., Briones. L.M., Dedryver. C.A. (2004) Effect of host defence chemicals on clonal distribution and performance of different genotypes of the cereal aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). *J. Chem. Ecol.*, 30, 2515-2525.

Figueroa. C.C., Simon. J.C., Le Gallic. J.F., Prunier-Leterme. N., Briones. L.M., Dedryver. C.A., Niemeyer. H.M. (2005). Genetic structure and clonal diversity of an introduced pest in Chile, the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Heredity*, 95. 24-33.

Fonseca. D.M., Dennis. A., La Pointe., Fleischer. R.C. (2000) Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. *Mol. Ecol.*, 9, 1803-1814.

Frankham. R. (2005) Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity.*, 94, 385.
Published online.

Fuentes-Contreras. E., Figueroa. C.C., Reyes. M., Briones. L.M., Niemeyer. H.M. (2004) Genetic diversity and insecticide resistance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

populations from tobacco in Chile: Evidence for the existence of a single predominant clone. *Bull. Entomol. Res.*, 94, 11-18.

Fuller. S.J., Chavigny. P., Lapchin. L., Vanlerberghe-Masutti. F. (1999) Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid, *Aphis gossypii* Glover in southern France. *Mol. Ecol.*, 8, 1867–1877.

Guo S.W. & Thompson E.A. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-372.

Grapputo. A., Boman. S., Lindstrom. L., Lyytinen. A., Mappes. J. (2005) The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Mol. Ecol.*, 14, 4207-4219.

Guillemaud. T., Mieuze. L., Simon. J.C. (2003). Spatial and temporal genetic variability in French populations of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Heredity.*, 91, 143-152.

Hart, D. L. and Clark. A.G.(1997) "Principles of Population Genetics". 3^a ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland.

Halkett. F., Kindlmann. P., Plantegenest. M., Sunnucks. P., Simon. J.C., (2006) Temporal differentiation and spatial coexistence of sexual and facultative asexual lineages of an aphid species at mating sites. *J Evol. Biol.*, 19, 809-815.

- Haack. L., Simon. J.C., Gauthier. J.P., Plantegenest. M., Dedryver. C.A. (2000) Evidence for predominant clones in a cyclically parthenogenetic organism provided by combined demographic and genetic analyses. *Mol. Ecol.*, 9, 2055–2066.
- Hurst. L.D.& Peck. J.R. (1996) Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. *Trends Ecol. Evol.*, 11: 45–52
- Huey, R.B. et al. (2000) Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. *Science*, 287, 308–309.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, 11, 424-429.
- Kimura .M and Weiss. W.H. (1964) The stepping-stone model of genetic structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49, 561–576.
- Kolar. C. and Lodge. D.M. (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol. Evol.*, 16, 199-204.
- Kolbe. J.J., Glor. R.E., Schettino L.R., Lara. A.CH., Larson. A., Losos. J.B. (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature.*, 431, 177-181.

- Kondrashov. A.S. (1988) Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*, 336, 435–440.
- Lindholm. A.K., Breden. F., Alexander. H.J., Chan. W.K., Thakurta. S.G., Brooks. R. (2005) Invasion success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia. *Mol. Ecol.*, 14, 3671-3682.
- Le Corre. V. and Kremer. A. (1998) Cumulative effects of founding events during colonization on genetic diversity and differentiation in an island and stepping-stone model. *J. Evol. Biol.*, 11, 495-512.
- Lee. C. E. (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecol. Evol.*, 17, 386-391.
- Lodge. D.M. (1993) Biological invasions: lessons for ecology. *Trends. Ecol. Evol.*, 8, 133-137.
- Llewellyn. K.S., Loxdale. H.D., Harrington. R., Brookes. C.P., Clark. S.J., Sunnucks. P. (2003) Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites. *Mol Ecol.*, 12, 21–34.
- Lynch. M. (1984) Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *Q. Rev. Biol.*, 59, 257-290.

Loxdale. H.D., Hardie. J., Halbert. S., Footitt. Royal., Kidd. N.A.C., Carter. C.I. (1993) The relative importance of short and long-range movement of flying aphids. *Biol. Rev.*, **68**, 291–311.

ODEPA (2002) <http://www.odepa.gob.cl/> accessed 15/September/2002.

Papura. D., Simon. J.C., Halkett. F., Delmotte. F., Le Galli. J.F., Dedryver. C.A. (2003) Predominance of sexual reproduction in Romanian populations of the aphid *Sitobion avenae* inferred from phenotypic and genetic structure. *Heredity*, **90**, 397–404.

Pimentel. D., Lach. L., Zuniga. R., Morrison. D. (2000) Environmental and economic cost of nonindigenous species in the United States. *Biosci. Rep.*, **50**: 53-65.

Pouqueville. F-CHL. (1820–21) *Voyage Dans la Grèce Comprenant la Description Ancienne et Moderne de l'Épire*. Paris: F. Didot

Margaritopoulos. J.T., Zissis. M., Tsitsipis J.A. (1998) Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Homoptera: Aphididae) by random amplified polymorphic DNA chain reaction technique. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **91**, 321-330.

Margaritopoulos. J.T., Tsitsipis. J.A., Goudoudaki. S., Blackman. R.L. (2002) Life cycle variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in Greece. *Bull. Entomol. Res.*, **92**, 309-319.

- Margaritopoulos. J.T., Tsitsipis. J.A., Zintzaras. E., Blackman. R.L. (2000) Host-correlated morphological variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations in Greece. *Bull. Entomol. Res.*, 90, 233–244.
- Margaritopoulos. J.T., Blackman. R.L., Tsitsipis. J.A., Sannino. L. (2003) Coexistence of different host-adapted forms of *Myzus persicae* in the region of Caserta in South Italy. *Bull. Entomol. Res.*, 93, 131–135.
- Margaritopoulos. J.T., Tsourapas. C., Tzortzi. M., Kanavaki. O.M., Tsitsipis. J.A. (2005) Host selection by winged colonisers within the *Myzus persicae* group: a contribution towards understanding host specialization. *Ecol. Entomol.*, 30, 406-418.
- Martinez-Torres. D., Carrio. R., Latorre. A., Simon. J.C., Hermoso. A., Moya. A. (1997) Assessing the nucleotide diversity of three aphid species by RAPD. *J. Evol. Biol.*, 10, 459-477.
- Maynard Smith. J. (1971) What use is sex?. *J. Theor. Biol.*, 30, 319–335.
- Maynard Smith J. (1986) Contemplating life without sex. *Nature*, 324, 300–301
- Minks. A.K. and Harrewijn. P. (1987) *Aphids: their biology, natural enemies and control*. Elsevier. Amsterdam, 450 pp.

Moran. N.A. (1992) The evolution of aphid life cycles. *Ann. Rev. Entomol.*, 37, 321-348.

Novoa. R., Villaseca. S., del Canto. P., Rouanet. J.L., Sierra. C., del Pozo. A. (1989) Mapa agroclimático de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA): Santiago.

Raymond. M. and Rousset. F. (1995a) Genepop, a population genetics software for exact test and ecumenicism. *Heredity*, 86, 248-249.

Raymond M, Rousset F (1995a) genepop (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86, 248-249.

Rispe. C. & Pierre. J.S. (1998) Coexistence between cyclical parthenogens, obligate parthenogens, and intermediates in a fluctuating environment. *J. Theor. Biol.*, 195, 97-110.

Rispe. C., Pierre. J.S., Simon. J-C, Gouyon. P.H. (1998) Models of sexual and asexual coexistence in aphids based on constraints. *J. Evol. Biol.*, 11: 685-701.

Rousset. F., Raymond. M. (1995) Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, 140, 1412-1419.

Shannon. C.E., Weaver. W. (1949) *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL. pp. 117

- Sakai. A.K., Allendorf. F.W., Holt. J.S., Lodge. D.M., Molofsky. J., KA. (2001) The population biology of invasive species. *Ann. Rev. Ecol. System.*, 32, 305-332.
- Sambrook. J., Fritsch. E.F., Maniatis. T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Schlötterer. C. (1998) Microsatellites. En: Hoelzel, R.A. (Ed.) *Molecular Genetic Analysis of Populations: A practical approach*: 237-261. 2^a ed. Oxford University Press.
- Simberloff. D. (1996) Impacts of introduced species in the United States. *Consequences: Natural Implications of Environment Change.*, 2, 13-22.
- Simon. J.C., Baumann. S., Sunnucks. P., Hebert. P.D.N., Pierre. J.S., Le Gallic. J.F. (1999) Reproductive mode and population genetic structure of the cereal aphid *Sitobion avenae* studied using phenotypic and microsatellite markers. *Mol Ecol.*, 8, 531-545.
- Simon. J.C., Rispe. C., Sunnucks. P. (2002) Ecology and evolution of sex in aphid. *Trends. Ecol. Evol.*, 17, 34-39.
- Simon. J.C., Delmotte. F., Rispe. C., Crease. T. (2003) Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biol. J. Linn. Soc.*, 79, 151-163.

- Sloane. M.A., Sunnucks. P., Wilson. A.C.C., 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. Res.*, 77: 251-260.
- Stone. G.N., Sunnucks. P. (1993) Genetic consequences of an invasion through a patchy environment - the cynipid gallwasp *Andricus quercuscalicis* (Hymenoptera: Cynipidae). *Mol. Ecol.*, 2, 251-268.
- Sunnucks. P., Hales. D.F. (1996) Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Biol. Evol.*, 13, 510-524.
- Sunnucks. P., De Barro. P.J., Lushai. G., Maclean. N.D., Hales. D.F. (1997) Genetic structure of an aphid studied using microsatellites: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages and host specialization. *Mol. Ecol.* 6, 1059-1073.
- Sunnucks. P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends. Ecol. Evol.*, 15, 199-203.
- Tsutsui. N.D., Suarez. A.V., Holway. D.A., Case. T.J. (2000) Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 5948-5953.

- Tóth. G., Gáspári. Z., Jurka. J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.*, 10, 967-981.
- Van Emden. H.F., Eastop. V.F., Hughes. R.D., Way. M.J. (1969) The ecology of *Myzus persicae*. *Ann. Rev. Entomol.*, 14, 197-270.
- Van Oosterhout. C., Hutchinson. W.F., Wills. D.P.M., Shipley. P. (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol.*, 4, 535-538.
- Villablanca. F.X., Roderick. G.K., Palumbi. S.R. (1998) Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Mol. Ecol.*, 7, 351–365.
- Vitousek. P.M., D’Antonio. C.M., Loope. L.L., Westbrooks. R. (1996) Biological invasions as global environmental change. *American Science.*, 84, 218–28.
- Vorburger. C., Lancaster. M., Sunnucks. P. (2003a) Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae*, and the predominance of two “superclones” in Victoria Australia. *Mol. Ecol.*, 12, 3493-3504.
- Weir. B.S. (1990) Intraspecific differentiation. In: Hillis DM, Moritz C (eds) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates: Sunderland MA. pp 373-410.

- Weir. B.S., Cockerham. C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.*, 38, 1358-1370.
- West. S.A., Lively. C.M., Read. A.F. (1999) A pluralist approach to sex and recombination. *J. Evol. Biol.*, 12, 1003–1012.
- Wright. S. (1965) The interpretation of populations structure by F-statistic with special regard to system of mating. *Evolution*, 19, 395-420.
- Wilson. A.C.C., Sunnucks. P., Blackman. R.L., Hales. D.F. (2002) Microsatellite variation in cyclically parthenogenetic population 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., Sunnucks. P. (2004) Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application. *Mol. Ecol. Notes.*, 4, 104-109.
- Zitoudi. K., Margaritopoulos. J.T., Mamalis. Z., Tsitsipis. J.A. (2001) Genetic variation in *Myzus persicae* populations associated with host-plant and life cycle category. *Entomol. Exper. Applic.*, 99, 303-311.

7. ANEXO
Listado de reactivos

REACTIVO	MARCA
Aceite mineral	Promega
Acido acético 90%	TCL
Archilamida: Bis Archilamida 19:1	TCL
Agarosa	GibcoBRL
Acido nitrico	TCL
Alcohol Etílico	J.T. Backer
Azul de Bromofenol	Sigma
Bind silane	Sigma
Bromuro de Etidio	Sigma
Buffer TAE 50X	TCL
Buffer TBE 10X	TCL
Carbonato de Sodio	Riedel
Cloruro de Magnesio	Sigma
Cloruro de Sodio	Sigma
dNTP set PCR grade 100mM	Invitrogen
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Invitrogen
EDTA Sal Disódica:2H ₂ O	Sigma
Formaldehído 37%	TCL
Formamida desionizada	TCL

REACTIVO	MARCA
Fragmentos λ DNA/ <i>Hind</i> III	Invitrogen
Glicerol	Sigma
Hidróxido de Sodio	Vetec
Ladder DNA 100 bp	Invitrogen
Nitrato de Plata	TCL
Persulfato de amonio	Sigma
pGEM – 3ZF (+)	Promega
Proteínasa K	Sigma
Sigmacote	Sigma
TEMED	TCL
Trizma Base	Sigma
Urea	Vetec
Xileno Cianol	Sigma