

UTILIZACIÓN DE MICROSATÉLITES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA POLILLA DE LA MANZANA *Cydia pomonella* L. (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) EN CHILE CENTRAL

Utilization of microsatellites to determine genetic variability of the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) in Central Chile

Juan L. Espinoza¹, Eduardo Fuentes-Contreras^{1*}, Wilson Barros¹ y Claudio Ramírez²

ABSTRACT

Codling moth (*Cydia pomonella* L.) is the main pest of pip fruits worldwide. Despite its economic importance, little is known about the genetic structure and patterns of movement at local and regional scale, important aspects for establishing a control strategy for this pest. An analysis of genetic variability on six populations of *C. pomonella* using microsatellite was performed in the two major apple (*Malus domestica* Borkh.) growing regions of Central Chile. In spite of geographic distances between some populations (aprox. 180 km), there was little genetic differentiation among populations ($F_{ST}=0.0-0.00097$ and $G_{ST}=0.005-0.127$), without isolation by distance, and high levels of gene flow ($Nm \approx 250$). High frequencies of null alleles were found over all *loci* across populations ($Na = 0.292$) which seem to explain the significant heterozygote deficiencies found. Approximately 98% of the variance was found within individuals and very little at the other hierarchical levels. The high levels of genetic diversity and gene flow detected seem to indicate that the codling moth populations studied in both regions have an almost continuous distribution.

Key words: gene flow, population structure, biotechnology.

RESUMEN

La polilla de la manzana (*Cydia pomonella* L.) es la plaga más importante de los frutales pomáceos en el mundo. A pesar de su gran importancia económica, poco se sabe acerca de su estructura genética y patrones de movimiento a escala local y regional, aspectos importantes para establecer una estrategia de control de esta plaga. Mediante la utilización de microsatélites se realizó un análisis de la variabilidad genética de seis poblaciones de la polilla de la manzana en las dos principales regiones productoras de manzanas (*Malus domestica* Borkh.) en Chile Central. A pesar de las distancias geográficas entre algunas poblaciones (aprox. 180 km), se encontraron bajos coeficientes de diferenciación genética entre poblaciones ($F_{ST}=0,0-0,00097$ y $G_{ST}=0,005-0,127$), sin presencia de aislamiento por distancia, y con altos niveles de flujo génico ($Nm \approx 250$). Se encontraron altas frecuencias de alelos nulos ($Na = 0,292$) para todos los *loci*, a través de las poblaciones analizadas, lo que explicaría el significativo déficit de heterocigotos encontrado. Aproximadamente un 98% de la variabilidad genética encontrada corresponde a una variación intraindividual, atribuyéndose prácticamente nada a los demás niveles jerárquicos. La alta diversidad genética y los altos niveles de flujo génico parecen indicar que las poblaciones estudiadas de la polilla de la manzana en ambas regiones estudiadas están distribuidas formando casi un continuo.

Palabras clave: flujo génico, estructura poblacional, biotecnología.

¹ Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Casilla 747, Talca, Chile.

E-mail: efuentes@utalca.cl *Autor para correspondencia.

² Universidad de Talca, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Casilla 747, Talca, Chile.

Recibido: 20 de julio de 2006. Aceptado: 26 de octubre de 2006.

INTRODUCCIÓN

La principal plaga de los frutales pomáceos a nivel mundial es la polilla de la manzana (*Cydia pomonella* L.), la cual es también la plaga más importante del manejo fitosanitario del manzano (*Malus domestica* Borkh.) en Chile (Klein y Waterhouse, 2000). Esta plaga probablemente fue introducida hacia fines del 1800, estando actualmente distribuida desde la Región de Tarapacá a la Región de Los Lagos. Las poblaciones de *C. pomonella* más significativas desde el punto de vista económico, se ubican entre las regiones del Libertador General Bernardo O'Higgins y del Maule (aprox. 33°40' a 35°50' lat. Sur), las cuales concentran más del 80% de la superficie productora de manzanas a nivel nacional (Klein y Waterhouse, 2000).

El control tradicional de esta plaga con insecticidas neurotóxicos está siendo reemplazado progresivamente por programas de manejo integrado de plagas (MIP), los cuales incluyen insecticidas más selectivos y el uso de feromonas sexuales en programas de manejo de áreas extensas (Dorn *et al.*, 1999; Calkins y Faust, 2003). Estas estrategias de control requieren información más detallada sobre la estructura y dinámica de las poblaciones de la polilla de la manzana, en particular sobre la dispersión y migración de la plaga tanto a nivel del huerto y su entorno como a nivel regional. Indirectamente es posible obtener esta información en forma eficiente a partir de la estimación cuantitativa de la variabilidad genética de las poblaciones de *C. pomonella* mediante la utilización de marcadores moleculares (Timm *et al.*, 2006). En esta línea se han realizado estudios con isoenzimas en poblaciones de *C. pomonella* de Francia y Suiza, los cuales no encontraron diferencias significativas entre poblaciones de diversos orígenes geográficos y plantas hospederas (Buès y Toubon, 1992; Buès *et al.*, 1995). Por el contrario, Timm *et al.* (2006) compararon poblaciones de *C. pomonella* de Sudáfrica mediante Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs), encontrando diferenciación significativa entre poblaciones de diferentes localidades geográficas independientemente de la planta hospedera.

Para el caso de Chile no existen antecedentes sobre la estructura y dinámica de las poblaciones de *C. pomonella* desde un punto de vista genético, aunque existen datos sobre resistencia incipiente a

algunos insecticidas que sugieren que pueden existir altos niveles de flujo génico entre huertos con y sin aplicación de estos agroquímicos (Reyes *et al.*, 2004; Fuentes-Contreras *et al.*, 2007). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la variabilidad genética y frecuencias genotípicas de poblaciones de *C. pomonella* provenientes de seis huertos de manzano de Chile Central, mediante la utilización de marcadores moleculares de tipo microsatélite desarrollados recientemente para esta plaga (Franck *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005). En particular, determinar si existe diferenciación entre poblaciones provenientes de las diferentes localidades, y si ésta se correlaciona con la distancia geográfica entre localidades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Marcadores moleculares. Los marcadores microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSRs) son regiones del genoma en las que una secuencia corta, 2-6 pares de bases, se repite un cierto número de veces. Cada *locus* microsatélite tiene alelos con distinto número de repeticiones, lo cual se evidencia en bandas de distinto tamaño luego de su amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos marcadores se heredan de manera codominante, permitiendo diferenciar bandas en individuos homocigotos y heterocigotos (Zhang, 2004). Los microsatélites presentan altas tasas de mutación, lo que permite diferenciar individuos estrechamente emparentados (Zhang, 2004). Esta alta variabilidad genética es muy útil para describir la estructura y flujo génico en poblaciones de insectos.

Los siguientes marcadores microsatélites específicos para *C. pomonella* se eligieron por su alto nivel de polimorfismo: *Cp1.63*, *Cp2.39*, *Cp2.P*, *Cp3.169*, *Cp1.179*, *Cp3.56*, *Cp3.180* y *Cp3.K*, cuyas secuencias y características principales fueron detalladas por Franck *et al.* (2005).

Localidades y material biológico. Mediante la instalación de trampas de cartón corrugado durante marzo del 2005, se recolectaron entre 15 y 40 larvas diapausantes de *C. pomonella* en cada localidad (185 individuos en total). Estas larvas se separaron según el sexo y preservaron en etanol 95% a 4 °C hasta que se realizó la extracción del ADN. Las localidades incluidas en el estudio fueron: Graneros 1 (34°03' lat. Sur, 70°39' long. Oeste) y Graneros 2 (34°04' lat. Sur, 70°43' long. Oeste) en la Región

del Libertador General Bernardo O'Higgins; Los Niches (35°02' lat. Sur, 71°11' long. Oeste), Molina (35°06' lat. Sur, 71°16' long. Oeste), Penciahue (35°23' lat. Sur, 71°48' long. Oeste) y Colín (35°28' lat. Sur, 71°44' long. Oeste) en la Región del Maule.

Extracción del ADN. El ADN se extrajo desde las cabezas de las larvas según el protocolo de "salting out" (Sunnucks y Hales, 1996), moliendo el tejido con buffer de extracción TNES (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, SDS 0,5%) e incubando en Proteinasa K (10 mg mL⁻¹) (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil) por toda la noche a 37 °C. Las proteínas se precipitaron por adición de NaCl 5 M y subsecuentes centrifugaciones, recuperando de esa manera el sobrenadante. El ADN presente en este sobrenadante se precipitó con etanol en distintas concentraciones, además de centrifugaciones y frío. Finalmente, el ADN se secó en estufa (37 °C) y se resuspendió en 50 µL de agua ultra pura estéril. Para mejorar la pureza del ADN en algunas situaciones se utilizó el protocolo del Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad Life Science, Hercules, California, USA), realizando sólo los pasos finales de purificación del ADN ya extraído, resuspendiendo finalmente las muestras en 50 µL y almacenando hasta su uso a -20 °C.

Amplificación del ADN. Las reacciones de PCR para los partidores específicos de *C. pomonella* se prepararon de acuerdo con Franck *et al.* (2005) en volúmenes de reacción de 10 µL, conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 50 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada partidor, 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil) y 2 µL de ADN extraído. Las amplificaciones se realizaron usando un termociclador (MJ Research PTC-200, Waltham, Massachusetts, USA) con las siguientes condiciones de amplificación: un paso de desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos consistentes de 30 s a 94 °C, 40 s a temperatura de "annealing" específica de 55 °C para los partidores *Cp3.169* y *Cp3.K*, y de 61 °C para los partidores *Cp1.63*, *Cp2.39*, *Cp2.P*, *Cp1.179*, *Cp3.56* y *Cp3.180* y 40 s a 72 °C, además de un paso de extensión final de 3 min a 72 °C.

Los productos de PCR se confirmaron en un gel de Agarosa-TBE 1X al 2,0%, cargando 2 µL de la reacción, previa adición de colorante, y comparándolo con un marcador de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil). Las amplificacio-

nes exitosas se resolvieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6%, los que se visualizaron por tinción con nitrato de plata de acuerdo al protocolo del kit Silver Sequence (Promega Biosciences, Madison, Wisconsin, USA), y los tamaños de cada banda se registraron manualmente contra un marcador pGEM®-3Zf(+) Vector (Promega Biosciences, Madison, Wisconsin, USA), previamente analizado en el laboratorio y cargado en el mismo gel.

Análisis estadístico. Con el programa MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) se revisaron posibles corrimientos (stuttering) en el tamaño de bandas, amplificación predominante de alelos pequeños (dropout), ausencia de bandas en el gel (alelos nulos), y eventuales errores tipográficos. Posteriormente, los estadísticos básicos como el número promedio de alelos por *locus* (a), riqueza alélica efectiva por *locus* y por población (r), y diversidad génica de Nei (H) se obtuvieron de las frecuencias alélicas con el programa FSTAT v.2.9.3 (Goudet, 2001). Estimadores de heterocigocidad de Nei, tales como el índice de fijación (F_{IS}), heterocigosis media esperada total (H_T), heterocigosis media esperada por población (H_S) y coeficiente de diferenciación génica (G_{ST}) (Nei, 1973), también se calcularon para cada *locus* polimórfico usando el programa FSTAT v.2.9.3. La frecuencia de alelos nulos (N_a) para cada población y *locus* se estimó mediante el programa MICRO-CHECKER v.2.2.3, utilizando el método de Chakraborty *et al.* (1992).

Un análisis jerárquico de varianza molecular (AMO-VA) basado sobre 1.023 permutaciones, entregó los componentes de varianza sobre la base del coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (F_{ST}), coeficiente de endogamia de poblaciones (F_{IS}) y coeficiente de endogamia total (F_{IT}) (Excoffier *et al.*, 1992). La prueba de diferenciación de poblaciones contra la hipótesis nula de uniformidad genética se corrigió por el método secuencial de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1995) basada en 1.000 permutaciones de genotipos multilocus entre pares de poblaciones utilizando el programa ARLEQUIN v.2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

Se calcularon estimaciones del número de migrantes por generación (Nm) entre pares de localidades usando el algoritmo de Wright [$(1-F_{ST}) (4 F_{ST})^{-1}$] (Hartl, 2000). Los valores de F_{ST} y distancia geográfica (km) entre pares de poblaciones se correlacionaron a fin de evaluar el grado de aislamiento por

distancia. Para ello se realizó un análisis de regresión simple, obteniendo de esta forma el coeficiente de correlación de Pearson (r) mediante el programa SPSS v.10.0 (SPSS, 1999). Finalmente, la asociación entre matrices de distancia genética [$F_{ST} (1 - F_{ST})^{-1}$] y distancia geográfica (km) entre pares de poblaciones se evaluó con la Prueba de Mantel, utilizando 1.000 permutaciones aleatorias con el programa XLSTAT v.7.5.2 (XLSTAT, 2007).

RESULTADOS

Los ocho *loci* de microsatélites seleccionados presentaron un total de 210 alelos en los 185 individuos de *C. pomonella* examinados. Estos *loci* microsatélite permitieron diferenciar 185 genotipos multilocus, correspondientes a cada uno de los individuos

analizados. El *locus Cp3.169* presentó la mayor riqueza alélica (r) (6,53), mientras el *locus Cp3.180* presentó el menor valor de esta variable (1,82) (Cuadro 1).

Tres de las seis poblaciones analizadas presentaron todos sus *loci* polimórficos, mientras Graneros 1 presentó el *locus Cp3.180* monomórfico, y Graneros 2 y Penciahue presentaron el *locus Cp2.P* monomórfico (Cuadros 1 y 2). La riqueza alélica (r) de cada población fluctuó de 3,36 para Penciahue a 4,37 para Los Niches (Cuadro 2). Por otro lado, sobre la base de la diversidad génica promedio de Nei (H), la población de Molina fue la más diversa, seguida por las poblaciones de Los Niches, Colín, Graneros 2, Graneros 1 y finalmente Penciahue (Cuadro 2).

Cuadro 1. Número de alelos, rango de tamaño y riqueza alélica para ocho microsatélites polimórficos aislados de polilla de la manzana, *Cydia pomonella*, colectadas en seis localidades en Chile Central.

Table 1. Number of alleles, size range and allelic richness for eight polymorphic microsatellites isolated from codling moth, *Cydia pomonella*, collected in six localities of Central Chile.

| <i>Locus</i> | Colín | Molina | Penciahue | Los Niches | Graneros 1 | Graneros 2 | Rango (pb) | Riqueza alélica (r) |
|-------------------|-------|--------|-----------|------------|------------|------------|------------|-------------------------|
| <i>Cp1.63</i> | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 135-163 | 2,76 |
| <i>Cp2.39</i> | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 211-241 | 4,34 |
| <i>Cp2.P</i> | 3 | 4 | 1 | 4 | 3 | 1 | 156-164 | 2,33 |
| <i>Cp3.169</i> | 7 | 8 | 5 | 11 | 7 | 8 | 196-238 | 6,53 |
| <i>Cp1.179</i> | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 3 | 216-234 | 4,18 |
| <i>Cp3.56</i> | 5 | 4 | 4 | 8 | 4 | 7 | 180-222 | 4,36 |
| <i>Cp3.180</i> | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 203-209 | 1,82 |
| <i>Cp3.K</i> | 6 | 5 | 5 | 6 | 5 | 5 | 150-198 | 4,88 |
| Número individuos | 32 | 39 | 32 | 40 | 27 | 15 | | |

pb = pares de bases.

Cuadro 2. Estadísticos de diversidad génica multi-*locus* para seis poblaciones de polilla de la manzana, *Cydia pomonella*, estimados por el pool genético de ocho marcadores microsatélites polimórficos.

Table 2. Multi-*locus* gene diversity statistics for six populations of codling moth, *Cydia pomonella*, estimated by the genotype gene pool of eight polymorphic microsatellite markers.

| Población | N | a | r | H | Nº <i>loci</i> polimórficos (%) | F_{IS} | Na |
|------------|-----|------|------|---------------|---------------------------------|----------|-------|
| Colín | 32 | 4,62 | 4,11 | 0,562 (0,226) | 8 (100) | 0,072 | 0,263 |
| Molina | 39 | 4,50 | 4,08 | 0,593 (0,205) | 8 (100) | 0,155 | 0,290 |
| Penciahue | 32 | 3,63 | 3,36 | 0,490 (0,284) | 7 (87,5) | 0,211 | 0,235 |
| Los Niches | 40 | 5,38 | 4,37 | 0,568 (0,247) | 8 (100) | 0,197 | 0,311 |
| Graneros 1 | 27 | 4,00 | 3,60 | 0,516 (0,281) | 7 (87,5) | 0,152 | 0,443 |
| Graneros 2 | 15 | 4,13 | 3,84 | 0,523 (0,320) | 7 (87,5) | 0,304 | 0,275 |

N : número de individuos analizados; a : media del número de alelos por *locus*; r : media del número efectivo de alelos por *locus* (riqueza alélica); H : diversidad génica de Nei. (Valores entre paréntesis son la desviación estándar); F_{IS} : coeficiente de endogamia o estimador multilocus de la desviación de las expectativas Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones; Na : proporción de alelos nulos.

Las desviaciones de las frecuencias genotípicas desde las esperadas según el equilibrio de Hardy-Weimberg (H-W) para cada población, fueron medidas por el índice de fijación (F_{IS}). El valor de F_{IS} más alto fue de 0,304 en la población de Graneros 2 y el menor en Colín con 0,072 (Cuadro 2). Los alelos nulos se encontraron en una frecuencia relativamente alta ($N_a = 0,443$ a $0,235$) (Cuadro 2), lo que probablemente está asociado a la deficiencia de heterocigotos encontrada.

La distribución de parámetros de diversidad genética para cada *locus* se presenta en el Cuadro 3. La diversidad genética total (H_T) varió desde 0,131 en el caso del *locus* *Cp3.180* a 0,844 en el caso del *locus* *Cp3.169*, mientras la diversidad genética dentro de la población (H_S) para estos mismos *locus* varió desde 0,130 a 0,820. La mayoría de los marcadores microsatélites exhibieron niveles pronunciados de diferenciación haplotípica en el área geográfica muestreada, como lo revelan los valores del coeficiente de diferenciación genética G_{ST} (Cuadro 3). El valor G_{ST} promedio de 0,05 indicó que sólo un 5% del total de la diversidad genética detectada fue explicado por las diferencias entre poblaciones. Un análisis de todas las poblaciones y *loci* resultó en un valor F_{IS} de 0,389, significativamente diferente de cero ($P \leq 0,001$), es decir con una deficiencia de heterocigotos en las poblaciones analizadas. Cuando los *loci* fueron analizados de manera individual, todos resultaron con valores F_{IS} positivos, siendo los ocho *loci* significativamente diferentes de cero, es decir con una deficiencia de heterocigotos en las

poblaciones analizadas. Sin embargo, nuevamente la alta frecuencia de alelos nulos ($N_a = 0,593$ a $0,158$) en seis de los ocho *loci* analizados probablemente esté relacionada con la deficiencia de heterocigotos observada (Cuadro 3).

En el AMOVA se encontró que todas las pruebas de diferenciación para los diferentes niveles jerárquicos fueron significativas, no detectándose diferencias estadísticas dentro y entre las diferentes poblaciones de polilla de la manzana (Cuadro 4). La mayor parte de la varianza fue encontrada dentro de los individuos (97,87%, $F_{IS} = 0,02137$, $P < 0,001$), luego entre individuos dentro de poblaciones (2,14%, $F_{IT} = 0,02133$, $P < 0,001$) y finalmente casi totalmente ausente entre poblaciones (-0,01%, $F_{ST} = -0,00005$, $P < 0,001$). No se encontró aislamiento por distancia, ya que la regresión simple entre F_{ST} y distancia geográfica (km) resultó no significativa ($r = 0,007$, $P > 0,05$). Del mismo modo, la prueba de Mantel indicó que no hay correlación significativa entre las matrices de divergencia genética y distancia geográfica entre pares de poblaciones ($r = 0,010$, $P > 0,05$).

El Cuadro 5 muestra el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (F_{ST}) y la distancia geográfica calculada entre pares para las seis poblaciones de *C. pomonella* en Chile Central. Para las muestras de poblaciones examinadas, los valores más altos de diferenciación genética sobre el pool genético de haplotipos fue indicado entre las poblaciones de Pencahue y Los Niches ($F_{ST} = 0,00097$),

Cuadro 3. Estadísticos de diversidad génica para cada *locus* dentro de seis poblaciones de *Cydia pomonella* estimados por ocho marcadores microsatélites (SSRs) polimórficos.

Table 3. Single-*locus* gene diversity statistics within six populations of *Cydia pomonella* estimated by using eight polymorphic microsatellite markers (SSRs).

| <i>Locus</i> | H_T | H_S | G_{ST} | F_{IS} | N_a |
|----------------|-------|-------|----------|-----------|-------|
| <i>Cp1.63</i> | 0,433 | 0,431 | 0,005 | 0,611 *** | 0,275 |
| <i>Cp2.39</i> | 0,742 | 0,705 | 0,050 | 0,189 *** | 0,162 |
| <i>Cp2.P</i> | 0,282 | 0,263 | 0,069 | 0,629 *** | 0,593 |
| <i>Cp3.169</i> | 0,844 | 0,820 | 0,029 | 0,120 *** | 0,158 |
| <i>Cp1.179</i> | 0,821 | 0,717 | 0,127 | 0,555 *** | 0,303 |
| <i>Cp3.56</i> | 0,558 | 0,543 | 0,027 | 0,255 *** | 0,264 |
| <i>Cp3.180</i> | 0,131 | 0,130 | 0,010 | 0,675 *** | 0 |
| <i>Cp3.K</i> | 0,746 | 0,724 | 0,029 | 0,078 * | 0 |
| Media | 0,570 | 0,542 | 0,050 | 0,389 *** | 0,292 |

* $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$.

H_T : diversidad genética total; H_S : diversidad genética intrapoblacional; G_{ST} : coeficiente de diferenciación génica; F_{IS} : coeficiente de endogamia o desviación de frecuencias genotípicas desde las expectativas Hardy-Weinberg; N_a : proporción de alelos nulos para todas las poblaciones.

**Cuadro 4. Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) de la variación genética de *Cydia pomonella*.
Table 4. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) of the genetic variation of *Cydia pomonella*.**

| Fuente de variación | gl | Suma de cuadrados | Componentes de varianza | Porcentaje de variación | Índice de fijación |
|--|-----|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Entre poblaciones | 5 | 2,545 | -0,00003 | -0,01 | F_{ST} : -0,00005 *** |
| Entre individuos dentro de poblaciones | 179 | 91,390 | 0,01068 | 2,14 | F_{IT} : 0,02133 *** |
| Dentro de individuos | 185 | 90,500 | 0,48919 | 97,87 | F_{IS} : 0,02137 *** |
| Total | 369 | 184,435 | 0,49985 | | |

gl: grados de libertad.

F_{ST} : coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; F_{IS} : coeficiente de endogamia dentro de poblaciones; F_{IT} : coeficiente de endogamia total.

Cuadro 5. Diferenciación genética entre poblaciones (F_{ST}) (debajo de la diagonal) y distancia geográfica entre pares de poblaciones (km) (sobre la diagonal) de *Cydia pomonella*. Pruebas significativas para los valores F_{ST} entre pares de poblaciones fue conducido para 1.000 permutaciones de los datos al azar. El nivel de significancia fue ajustado por el método secuencial de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1995).

Table 5. Genetic differentiation between populations (F_{ST}) of *Cydia pomonella* (below diagonal) and geographic distance among population pairs (km) (above diagonal). Significant tests for population pairwise F_{ST} -values were conducted by 1.000 random permutations of data. The significance level was adjusted by the sequential Bonferroni method (Sokal and Rohlf, 1995).

| Población | Colín | Molina | Pencahue | Los Niches | Graneros 1 | Graneros 2 |
|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------|
| Colín | - | 58 | 11 | 69 | 181 | 185 |
| Molina | 0,00058 (NS) | - | 58 | 11 | 125 | 129 |
| Pencahue | 0,00050 (NS) | 0,00083 * | - | 69 | 177 | 182 |
| Los Niches | -0,00006 (NS) | 0,00065 (NS) | 0,00097 * | - | 116 | 119 |
| Graneros 1 | 0,00025 (NS) | -0,00014 (NS) | -0,00008 (NS) | 0,00001 (NS) | - | 5 |
| Graneros 2 | 0,00025 (NS) | 0,00034 (NS) | 0,0005 (NS) | -0,00035 (NS) | -0,00124 (NS) | - |

(NS): no significativo; * $P \leq 0,05$.

entre las cuales se obtuvieron valores significativos a un intervalo de confianza del 95%. Lo mismo ocurrió entre las poblaciones de Pencahue y Molina, con un valor de $F_{ST} = 0,00083$. En las seis poblaciones estudiadas se encontró que existen bajos niveles de diferenciación genética, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre todos los pares de poblaciones, a excepción de las comparaciones entre Pencahue y Los Niches y entre Pencahue y Molina (Cuadro 5).

DISCUSIÓN

Usando marcadores moleculares microsatélite se encontró que el principal componente de la diversidad genética de *C. pomonella* de las localidades estudiadas corresponde a variación intraindividual (98%), mientras que una contribución mucho menor corresponde a variación entre individuos dentro de una población (2%), y prácticamente nada a variación entre poblaciones. Se encontró escasa

diferenciación genética entre las poblaciones de *C. pomonella* estudiadas, con valores de F_{ST} bajos a pesar de las distancias geográficas entre algunos sitios de colección (aprox. 185 km). Un alto flujo génico puede estar relacionado con la falta de diferenciación entre las distintas poblaciones evaluadas, ya que el número mínimo estimado de migrantes entre poblaciones por generación (Nm) sería de aproximadamente 250 individuos. También se encontró una significativa deficiencia de heterocigotos, la cual probablemente está relacionada con la alta frecuencia de los alelos nulos que subestiman esta variable. Al utilizar microsatélites, la presencia de alelos nulos se debe generalmente a mutaciones en las secuencias que flanquean la región microsatélite, las cuales sirven como sitio de unión a los partidores diseñados para producir la amplificación por PCR. De esta forma, un genotipo heterocigoto puede ser registrado erróneamente como un individuo homocigoto al no amplificar uno de sus dos alelos (Pemberton *et al.*, 1995). Estudios con mi-

crostatélites en otras especies de lepidópteros plaga (Bogdanowicz *et al.*, 1997; Endersby *et al.*, 2006) o con problemas de conservación biológica (Harper *et al.*, 2003; Keyghobadi *et al.*, 2005) han relacionado la deficiencia de heterocigotos con la presencia de alelos nulos más que con la posibilidad de altos niveles de endogamia, selección en contra de los heterocigotos, apareamiento selectivo o efectos asociados a la diferenciación entre poblaciones.

Estudios realizados en poblaciones de *C. pomonella* de diferentes regiones productoras de manzanas de Francia, no detectaron estructuración poblacional significativa debido a un elevado flujo génico entre localidades y plantas hospederas como manzano, pera (*Pyrus communis* L.), membrillo (*Cydonia oblonga* Mill.) y nogal (*Juglans regia* L.) (Buès y Toubon, 1992; Buès *et al.*, 1995). En un estudio más reciente, Timm *et al.* (2006) compararon poblaciones de *C. pomonella* de Sudáfrica, encontrando diferenciación significativa entre poblaciones de diferentes regiones geográficas, pero no entre diferentes frutales hospederos. Las diferencias entre estos estudios podrían estar relacionadas con el tipo de marcadores moleculares utilizados (isoenzimas en Francia y AFLPs en Sudáfrica), pero aparentemente las principales diferencias estarían en la distribución de las zonas productoras de manzanas en Sudáfrica, las cuales están más aisladas entre sí que en el caso de Francia (Timm *et al.*, 2006). También es importante destacar que en el caso de Sudáfrica no hay frutales hospederos silvestres o domésticos sin control de la plaga, lo cual sí ocurre en Francia y en general en Europa mediterránea (Timm *et al.*, 2006). Los resultados del presente estudio indican que existe alto flujo génico y ausencia de estructura poblacional entre huertos de manzano de las Regiones de O'Higgins y Maule, en una situación más parecida a la de Francia que a la de Sudáfrica. Estos antecedentes concuerdan con estudios realizados que muestran niveles incipientes de resistencia a insecticidas en *C. pomonella* provenientes de huertos con y sin aplicación de estos productos en las Regiones de O'Higgins y Maule (Reyes *et al.* 2004; Fuentes-Contreras *et al.*, 2007), los que sugieren una alta tasa de migración entre huertos independientemente de su tipo de manejo agronómico.

En general, *C. pomonella* es considerada como una plaga sedentaria, aunque la capacidad de vuelo de los adultos es altamente variable, aproximadamente el 10% de los individuos presenta conducta de

realizar vuelos de largo alcance (Schumacher *et al.*, 1997). Esta conducta es dependiente del ritmo circadiano, sexo, edad y estado de apareamiento de los individuos (Schumacher *et al.*, 1997; Keil *et al.*, 2001). Los genotipos migrantes de ambos sexos en general tienden a presentar menor tamaño corporal, fecundidad y longevidad, lo que estaría indicando que existe un costo significativo en términos de adecuación biológica asociado a este atributo migratorio, que contribuye a mantener un relativo sedentarismo en la población (Gu *et al.*, 2006). Sin embargo, el flujo génico de esta especie no se explica solamente por la capacidad de vuelo autónomo. En particular, el transporte de frutos, plantas desde viveros y el movimiento de "bins" de madera entre plantas de procesamiento de frutas, son factores que pueden aumentar significativamente la mezcla de poblaciones de *C. pomonella* entre huertos y/o localidades distantes (Higbee *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

En las seis poblaciones estudiadas la mayor cantidad de variabilidad genética fue encontrada a nivel intraindividual (aproximadamente 98%), sin presentar patrones de polimorfismo que puedan ser atribuidos a alguna población en particular. No se encontró aislamiento genético por distancia, ya que sólo existen diferencias significativas entre la población de Péncahue con las de Los Niches y Molina, las cuales están ubicadas en la Región del Maule, y distancias geográficas mayores las separan de las poblaciones de la Región de O'Higgins. La alta diversidad alélica y los altos niveles de flujo génico indican que las poblaciones estudiadas de la polilla de la manzana distribuidas en las Regiones de O'Higgins y del Maule están formando casi un continuo.

RECONOCIMIENTOS

El financiamiento del presente estudio fue obtenido del proyecto FONDECYT 1040673, así como del proyecto de cooperación internacional 7040042, que permitió la visita del Dr. Benoît Sauphanor, del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Avignon, Francia. Financiamiento parcial también fue obtenido del Proyecto Anillos en Ciencia y Tecnología (ACT) 38 del Programa Bicentenario en Ciencia y Tecnología (PBCT). Agradecemos el apoyo técnico de laboratorio de Cecilia Navia y Cecilia Cordero.

LITERATURA CITADA

- Bogdanowicz, S.M., V.C. Mastro, D.C. Prasher, and R.G. Harrison. 1997. Microsatellite DNA variation among Asian and North American gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90:768-775.
- Buès, R., et J.F. Toubon. 1992. Polymorphisme enzymatique dans différentes populations de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Oecol.* 13:583-591.
- Buès, R., J.F. Toubon, et H.S. Poitout. 1995. Variabilité écophysologique et enzymatique de *Cydia pomonella* L. en fonction de l'origine géographique et de la plante hôte. *Agronomie* 15:221-231.
- Calkins, C.O., and R.J. Faust. 2003. Overview of areawide programs and the program for suppression of codling moth in the western USA directed by the United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. *Pest Manage. Sci.* 59:601-604.
- Chakraborty, R., M. De Andrade, S.P. Daiger, and B. Budowle. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Ann. Hum. Genet.* 56:45-47.
- Dorn, S., P. Schumacher, C. Abivardi, and R. Meyhöfer. 1999. Global and regional pest insects and their antagonists in orchards: spatial dynamics. *Agric. Ecosyst. Environ.* 73:111-118.
- Endersby, N.M., S.W. McKechnie, P.M. Ridland, and A.R. Weeks. 2006. Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Mol. Ecol.* 15:107-118.
- Excoffier, L., P.E. Smouse, and J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491
- Fuentes-Contreras, E., M. Reyes, W. Barros and B. Sauphanor. 2007. Evaluation of azinphosmethyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *J. Econ. Entomol.* 100:551-556.
- Franck, P., F. Guérin, A. Loiseau, and B. Sauphanor. 2005. Isolation and characterization of microsatellite *loci* in the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Mol. Ecol. Notes* 5:99-102.
- Goudet, J. 2001. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> Accessed 15 March 2006.
- Gu, H.N., J. Hughes, and S. Dorn. 2006. Trade-off between mobility and fitness in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Ecol. Entomol.* 31:68-74.
- Harper, G.L., N. MacLean, and D. Goulson. 2003. Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Mol. Ecol.* 12:3349-3357.
- Hartl, D.L. 2000. A primer of population genetics. 180 p. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Higbee, B.S., C.O. Calkins, and C.A. Temple. 2001. Overwintering of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) larvae in apple harvest bins and subsequent moth emergence. *J. Econ. Entomol.* 94:1511-1517.
- Keil, S., H.N. Gu, and S. Dorn. 2001. Response of *Cydia pomonella* to selection on mobility: laboratory evaluation and field verification. *Ecol. Entomol.* 26:495-501.
- Keyghobadi, N., J. Roland, and C. Strobeck. 2005. Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. *Mol. Ecol.* 14:1897-1909.
- Koch, C., and D.F. Waterhouse. 2000. Distribution and importance of arthropods associated with agriculture and forestry in Chile. ACIAR Monographs N° 68. 234 p. Available at [http://www.aciar.gov.au/web.nsf/att/JFRN-6BN973/\\$file/mn68.pdf](http://www.aciar.gov.au/web.nsf/att/JFRN-6BN973/$file/mn68.pdf) Accessed 1 March 2007.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70:3321-3323.
- Pemberton, J., J. Slate, D. Bancroft, and J. Barrett. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite *loci*: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4:249-252.
- Reyes M., J. Bouvier, T. Boivin, C. Muñoz, E. Fuentes-Contreras y B. Sauphanor. 2004. Susceptibilidad a insecticidas y actividad enzimática de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) provenientes de tres huertos de manzano de la Región del Maule, Chile. *Agric. Téc. (Chile)* 64:229-237.
- Schneider, S., D. Roessli, and L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN, Version 2.0: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland. Available at: <http://anthro.unige.ch/arlequin/software/> Accessed 10 March 2006.
- Schumacher, P., A. Weyeneth, D.C. Weber, and S. Dorn. 1997. Long flights in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) measured by a flight mill: influence of sex, mated status and age. *Physiol. Entomol.* 22:149-160.

- Sokal, R.R., and F.J. Rohlf. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd ed. 887 pp. W.H. Freeman, New York, USA.
- SPSS. 1999. SPSS version 10.0. SigmaStat Users's Guide. 368 p. SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA.
- Sunnucks, P., and D.F. Hales. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). Mol. Biol. Evol. 13:510-524.
- Timm, A.E., H. Geertsema, and L. Warnich. 2006. Gene flow among *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) geographic and host populations in South Africa. J. Econ. Entomol. 99:341-348.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills, and P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol. Notes 4:535-538.
- XLSTAT. 2007. Tutorial XLSTAT version 7.5. Available at <http://www.xlstat.com> Accessed 1 March 2007.
- Zhang, D-X. 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. Trends Ecol. Evol. 19:507-509.
- Zhou, Y.H., H.N. Gu, and S. Dorn. 2005. Primer note: Isolation of microsatellite *loci* in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Mol. Ecol. Notes 5:226-227.