

# Uso del código de barras para identificar posibles biotipos del perforador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae), una importante plaga de frutas solanáceas Andinas

Héctor J. Salazar<sup>1</sup>, Harold Suárez-Barón<sup>1</sup>, Gerardo Gallego Sánchez<sup>1</sup>, Ana Elizabeth Díaz<sup>2</sup> y Joe Tohme<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Proyecto Agrobiodiversidad y Biotecnología, Centro internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Valle del Cauca.  
<sup>2</sup>Corporación Colombiana de Investigación Agropecuario (CORPOICA), Centro de Investigación La Selva, Rionegro, Antioquia.

h.g.suarez@cgiar.org

## INTRODUCCIÓN

La herramienta del código de barras de ADN funciona como un sistema de identificación de especies a partir del análisis de la secuencia del gen *Citocromo oxidasa I* (COI), representado en un segmento estándar del genoma (~ 650 pares de bases). *Neoleucinodes elegantalis* es un insecto de origen neotropical, ampliamente distribuido en centro y sur América. Esta especie es considerada una de las plagas más importantes para la producción de frutas de la familia Solanácea. *N. elegantalis* posee un amplio rango de adaptación altitudinal (0-2600 msnm), considerable diversidad y especificidad de enemigos naturales, variabilidad en términos de hábitos de ovoposición y pupación, una amplia gama de solanáceas silvestres hospederas y un marcado comportamiento de atracción diferencial a la feromona sexual *Neoelegantol*. El objetivo del presente trabajo es evaluar la herramienta del código de barras de ADN en el estudio de poblaciones de *Neoleucinodes elegantalis*, provenientes de solanáceas cultivadas y silvestres de Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

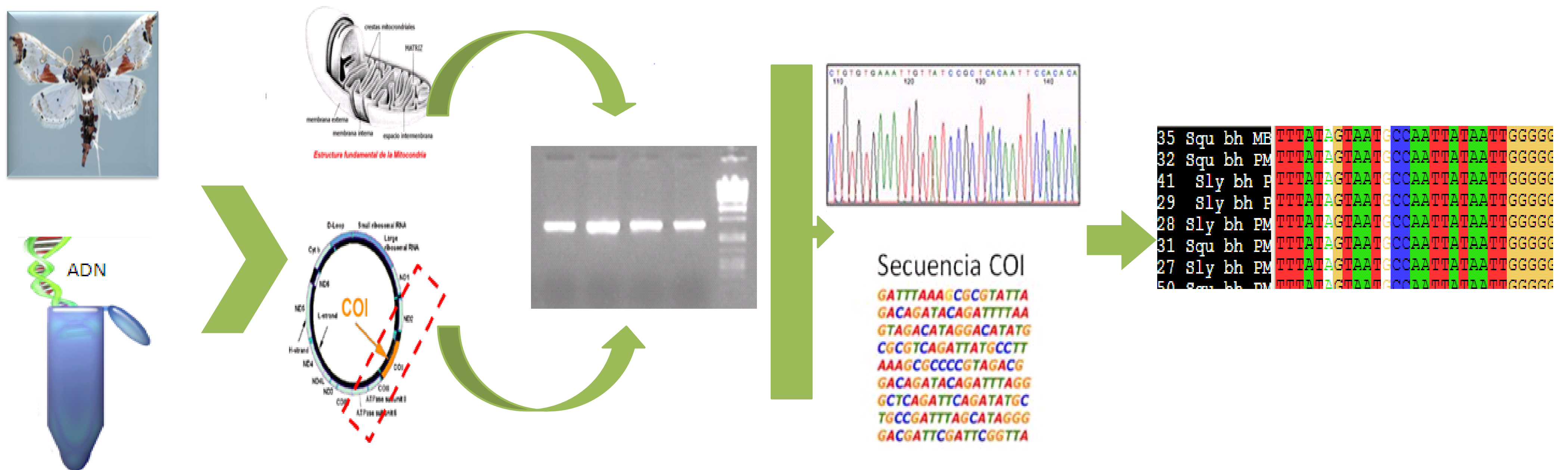
- Extracción de ADN a un total de 94 muestras siguiendo la metodología propuesta por Gilbertson *et al.* (1991).
- Amplificación mediante PCR de la región mitocondrial del gen COI, regiones flanqueadas con los cebadores COI-F (5' GGTCACAAATCATAAAGATATTGG-3') / COI-R (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3').

- Purificación y secuenciación de los productos de PCR a través de un secuenciador automático ABI Prism 377 (Perkin Elmer/ Applied Biosystem)

- Ensamblaje de secuencias utilizando el software Sequencher 4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

- Uso de programas Bioinformáticos para el alineamiento y verificación de las secuencias, la composición de nucleótidos de cada espécimen, estimación de la divergencia evolutiva y distancias genéticas el patrón de sustitución entre transversiones y transiciones.

- Análisis gráfico para determinar la composición y heterogeneidad de nucleótidos entre las secuencias consenso, obtenidas para cada uno de los biotipos generados y la determinación distribución geográfica de cada muestra, utilizando el programa ArcGIS - ArcMap (ESRI, 1999-2008, basado en SIG (Sistemas de Información Geográfica).



## RESULTADOS

### Composición y divergencias de las secuencias COI

Las secuencias mostraron una divergencia variable, con una distancia promedio entre los individuos de 0.38%, con un valor mínimo de 0.1% y 1.9% como porcentaje de mayor divergencia (Tabla 2). El número de sustituciones a nivel de nucleótidos para cada grupo varío entre 1 y 13 nucleótidos en las comparaciones intraespecíficas, para el caso de las comparaciones interespecíficas las sustituciones entre *N. elegantalis* y *N. silvaniae* (n. sp.) oscilaron entre 24 y 37.

Tabla 2. Estimación de la divergencia entre grupos. El número de sustituciones se muestra sobre la diagonal. Los grupos (1, 2, 3 y 4) corresponden a *Neoleucinodes elegantalis*.

<i>N. silvaniae</i>	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	
<i>N. silvaniae</i>	-	37	24	36	36
Grupo 1	0.109	-	13	2	1
Grupo 2	0.121	0.019	-	13	12
Grupo 3	0.112	0.005	0.005	-	1
Grupo 4	0.110	0.003	0.005	0.001	-

El análisis de NJ de agrupamiento sugirió un patrón respecto al tipo de zona de vida de Holdridge (Holdridge, 1947) para los grupos 2, 3 y 4, sin embargo los niveles de agrupación no revelaron un patrón por el tipo de planta solanácea utilizada (Figura 2).

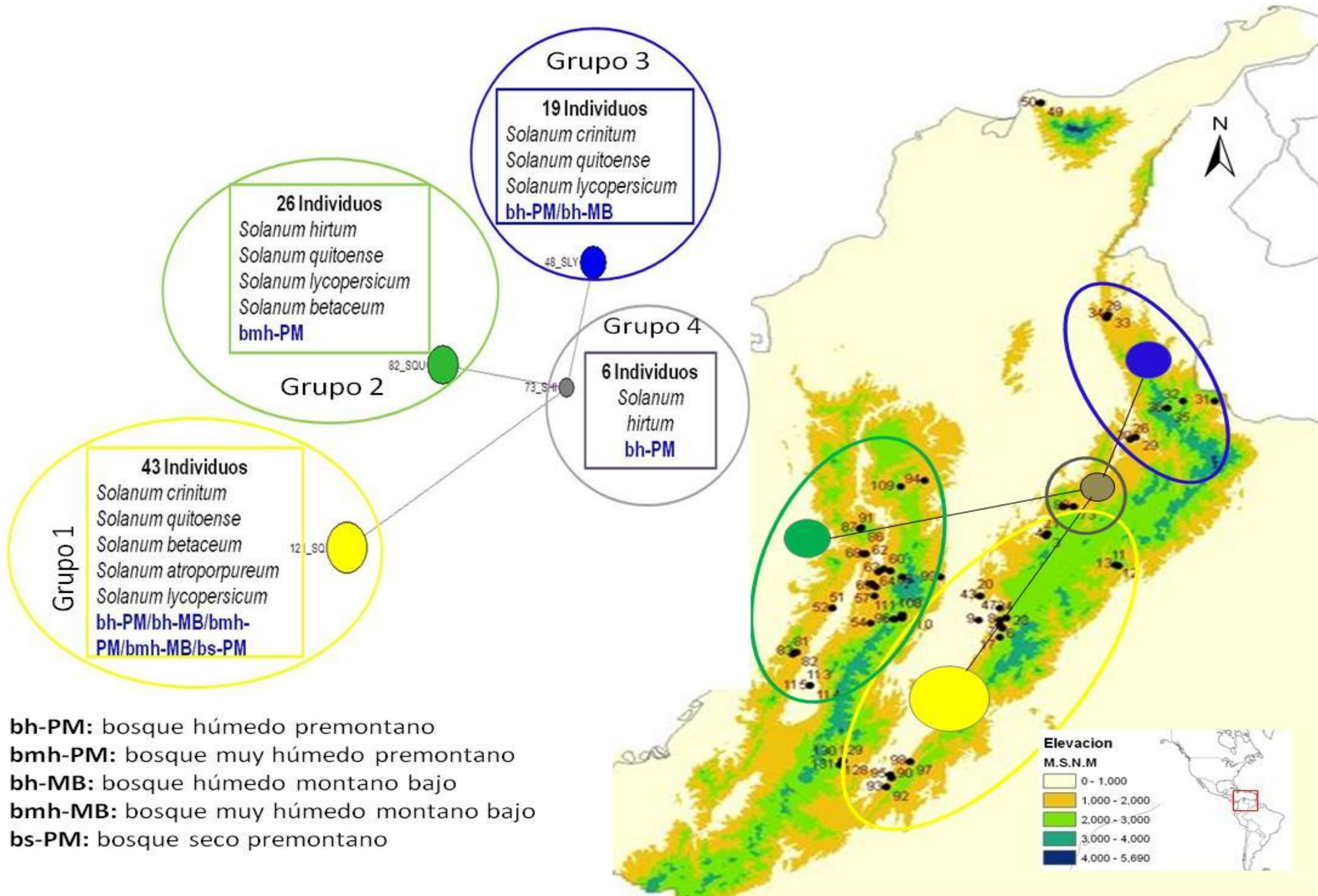
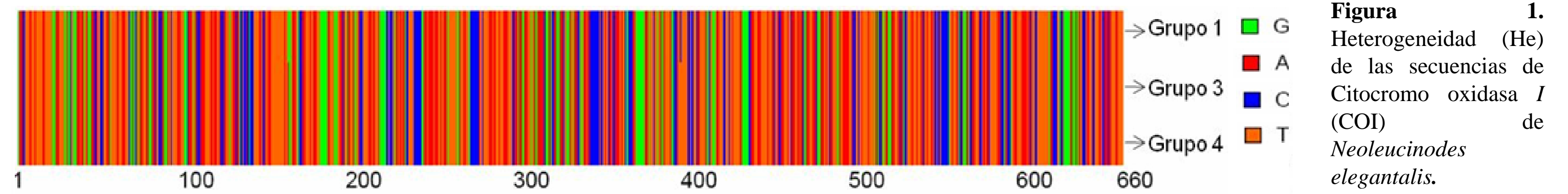


Figura 2. distribución geográfica de las muestras y correlación de la organización espacial de los cuatro grupos encontrados a partir del análisis de GIS (Sistemas de Información Geográfica).

El análisis de composición y heterogeneidad dentro de las secuencias de COI permitió establecer la variabilidad a nivel inter e intraespecífico logrando establecer una divergencia significativa entre individuos pertenecientes a la especie *N. elegantalis*, identificando los sitios puntuales de dicha diferenciación.



Mediante el árbol de NJ se establecieron cuatro agrupamientos básicos, correspondientes a los posibles biotipos propuestos, en el caso de las muestras de *N. elegantalis* (< 0.5%) a nivel interespecífico, con una clara excepción para el grupo 2, el cual agrupó 26 individuos, representando un 28% del total de muestras evaluadas, esta agrupación mostró divergencias que oscilaron entre 1.9% y 2.6% con respecto de los otros grupos del árbol de NJ. (Figura 3).

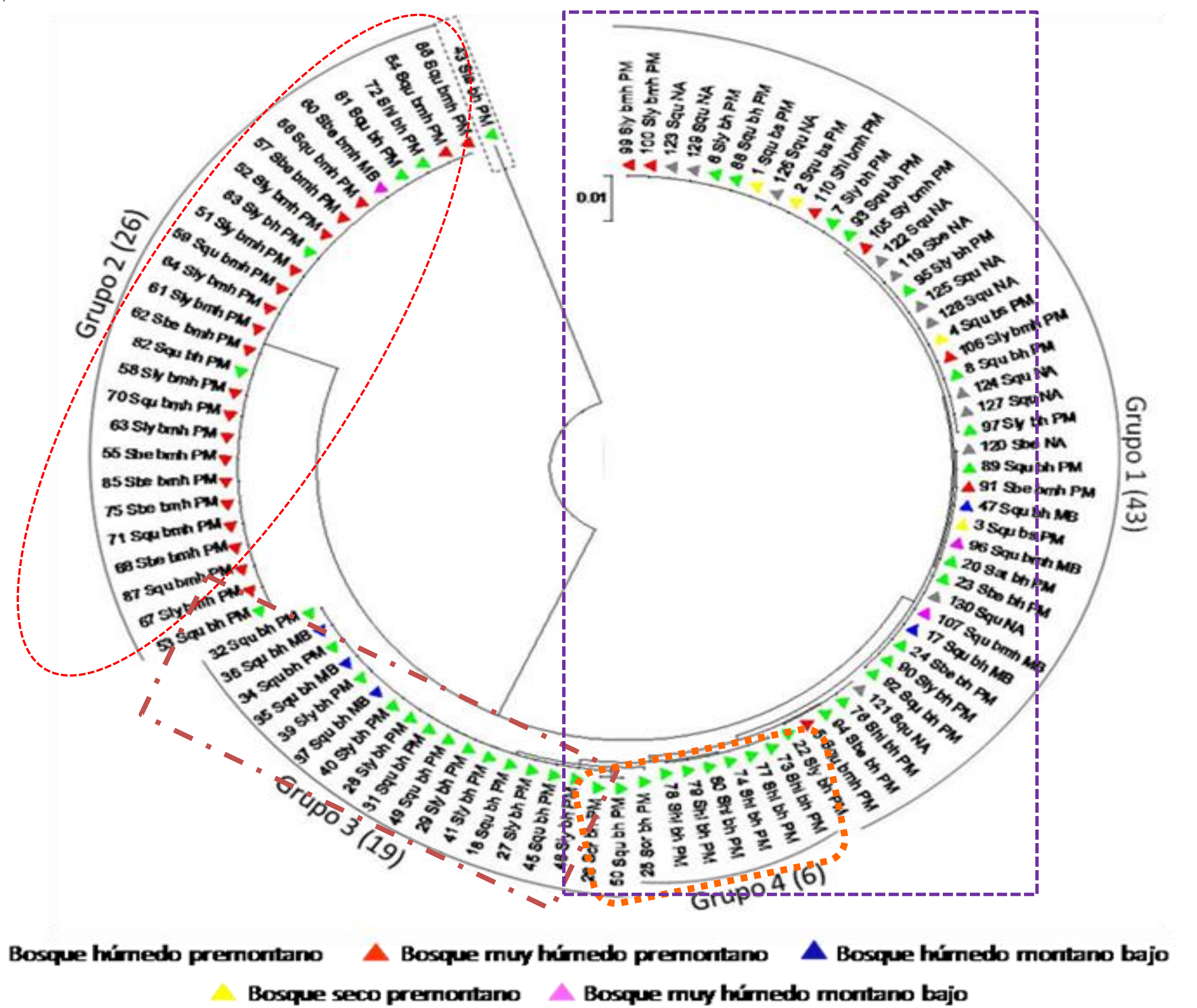


Figura 3. Análisis de Neighbor-Joining (NJ), tipo de planta hospedera, Sh: *Solanum hirtum*; Scr: *S. crinitum*; Squ: *S. quitense*; Sbe: *S. betaceum*; Sla: *S. lanceifolium*; Sly: *S. lycopersicum*; Sat: *S. atropurpureum*.

## DISCUSION

El análisis de correlación de Heterogeneidad y distribución geográfica de las secuencias COI evaluadas (Figura 2), reveló información que sugiere una hipótesis para explicar la diferenciación observada en el grupo 2, compuesto por 26 individuos que se encuentran sin excepción ubicados en el costado occidental de la cordillera central, más específicamente en el área centro-occidental de la región Andina Colombiana. Ubicación que los separa geográficamente del resto de poblaciones de *Neoleucinodes* (de los grupos 1, 3 y 4), ubicados a lo largo de la cordillera oriental, es probable que el aislamiento geográfico no tenga efecto en la distribución de los individuos, sin embargo circunstancias relacionadas con la distribución de este grupo de individuos y la presencia de cultivo de solanáceas en la región Andina y la aplicación desmedida de diversos agroquímicos (Cifuentes *et al.* 1987) podrían generar este resultado. Para la distribución y agrupamiento de los individuos no se encontró ninguna correlación entre los agrupamientos de individuos y el tipo de planta solanácea hospedera, aspecto que sugiere que una limitada especialización de los posibles grupos aquí reportados en relación a un cultivo específico de solanácea. Es de Anotar que existe una marcada relación entre el tipo de zona de vida y la agregación de individuos con la misma secuencia COI, principalmente en el caso de las poblaciones ubicadas a lo largo de la cordillera central (grupo 2) y en el norte de la cordillera oriental (grupos 3 y 4).

## CONCLUSIONES

- Con este trabajo se logra una primera aproximación al análisis genético de *N. elegantalis*, especie para la cual no existen secuencias de ADN reportadas en las bases de datos y tampoco estudios que incluyan algún tipo de caracterización molecular.
- El código de barras de ADN mostró una buena sensibilidad en la detección de posibles biotipos de *N. elegantalis*, dicho resultado sugiere de manera preliminar la presencia de al menos 4 grupos geográficos diferentes, los cuales podrían estar definidos por el gradiente de humedad específico para las zonas de vida de clima templado (bh-PM/bmh-PM), por barreras naturales y en una gran medida por la intervención a trópica. El haplotipo 2, correspondiente a individuos encontrados en la zona de vida de bh-PM, podría sugerir un proceso de especiación o al menos de manera preliminar una especie incipiente. Mediante la implementación de esta metodología se logró confirmar a nivel molecular la existencia de una nueva especie de *Neoleucinodes* (*N. silvaniae*), reportada por Díaz y Solís (2007), empleando caracteres morfológicos.

## BIBLIOGRAFIA

DIAZ, A. E.; SOLIS, M. A. 2007. A New species and species distribution records of *Neoleucinodes* (Lepidoptera: Crambidae:Spilomelinae) from Colombia feeding on *Solanum* sp. Proceedings of the Entomological Society of Washington. 109 (4):897-908.  
 HOLDRIDGE, L. R. 1947. Determination of World Plant Formations from Simple Climatic Data. Science Vol. 105 No. 2727: 367-368.  
 HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DE WAARD, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. B. 270, 313-321.

## AGRADECIMIENTOS

A el Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria FONTAGRO por su aporte económico para el desarrollo de este trabajo.