



Instituto Colombiano para el Desarrollo de la
Ciencia y la Tecnología
"Francisco José de Caldas"



Centro de Investigación
de la Caña de Azúcar
de Colombia

Informe final joven investigador
Convenio Colciencias-Cenicaña

**Caracterización morfológica y molecular de especies de *Diatraea* spp.
(Lepidoptera: Crambidae)**

Autor:

Patricia Cadena Goyes

Bióloga

Tutores:

Fernando Ángel Sánchez, Ph.D

Luis Antonio Gómez Laverde, Ph.D

Santiago de Cali, Febrero de 2008

INTRODUCCIÓN

Los insectos plaga que afectan la caña de azúcar son diversos y numerosos (Box 1953, citado por Lange et al. 2004) y salvo algunas especies que son cosmopolitas, presentan una distribución geográfica limitada y han pasado de otras gramíneas a alimentarse de la caña de azúcar. Dentro de este grupo se encuentran algunas especies de barrenadores del género *Diatraea* (Lepidoptera: Crambidae), que son plagas de importancia económica para el cultivo de caña de azúcar en el nuevo mundo (Lange et al. 2004). En el valle geográfico del río Cauca, se han registrado tres especies de barrenadores: *Diatraea saccharalis*, *Diatraea indigenella* (Box, 1956) y *Blastobasis graminea* (Lepidoptera: Coleophoridae) (Zenner, 1965). Hacia el norte se observa una mayor abundancia de *D. saccharalis* disminuyendo hacia el sur, mientras que *D. indigenella* presenta un comportamiento opuesto siendo más abundante hacia el sur del valle geográfico. En el caso de *B. graminea*, se registró su presencia a lo largo de la zona de estudio, aunque siendo su abundancia inferior en relación con las otras dos especies de barrenadores (Obando 2007).

Para la diferenciación de las especies de barrenadores se recurre principalmente a caracteres morfológicos externos. Linares y Bastidas (1996) realizaron una descripción de varias especies a partir de morfología externa y de la genitalia de las especies de *Diatraea* que se encuentran en Venezuela y Brasil, (*D. saccharalis*, *D. busckella*, *D. rosa*, *D. impersonatella* y *D. centrella*). El registro taxonómico más completo que existe sobre el grupo y enfatizando en genitalia interna es el realizado por Bleszynski (1969).

La gran divergencia en la morfología de la genitalia entre las especies es la regla en insectos, y en la mayoría de los grupos; los taxónomos usan la genitalia (especialmente la genitalia del macho) para la determinación de las especies y su clasificación (Schilthuizen 2003). En 1927 Dyar y Heinrich revisaron el género y reconocieron 56 especies utilizando principalmente la genitalia del macho. El uso

de la genitalia interna es reconocido por su valor para separar algunas especies (Peairs y Saunders 1980).

Las evaluaciones de la situación de *Diatraea* spp. en el valle geográfico del río Cauca realizadas en los años 2005 y 2006, han permitido establecer niveles de intensidad de infestación (I.I), detectando los más altos hacia el sur y centro del valle geográfico, principalmente, y el resto del valle con niveles de intensidad de infestación mucho más reducidos (Gómez y Cadena 2007; Vargas et al. 2005). De acuerdo con esto, se han planteado diferentes alternativas para explicar el comportamiento de la plaga en la zona de estudio. Una de ellas se basa en la posible existencia de diferentes razas o biotipos de *Diatraea* spp. que sean más agresivos o sobre los cuales los parasitoides no ejerzan suficiente control. Para evaluar esta hipótesis es necesario estudiar la estructura genética de la plaga, a partir de la cual, evaluando los genotipos de los diferentes individuos, se puede predecir fluctuaciones poblacionales y entender el comportamiento migratorio y el flujo de genes. La estructura genética es entendida como la distribución de la variación genética de una especie, como resultado de la migración, selección, mutación, la deriva genética y otros factores relacionados (Roderick 1996).

EL ADN mitocondrial ha sido usado en estudios de estructura de poblaciones y flujo de genes, hibridación, biogeografía y en el establecimiento de relaciones filogenéticas y en estudios evolutivos. Ha sido bastante estudiado ya que puede ser fácilmente extraído, debido a la gran cantidad de copias que existen en una célula (Avisé et al. 1987, citado por Hoy 1994), a su pequeño tamaño, a la tasa relativamente rápida de cambio evolutivo, y a su herencia maternal, que permiten evaluar la historia evolutiva de poblaciones y la evolución entre grupos bastante relacionados (Gray 1989, Lansman et al. 1981, Simon et al 1991, citados por Hoy 1994). Aunque la mayoría de iniciadores para ADN mitocondrial fueron diseñados para ciertos insectos, debido al alto nivel de conservación de estos, pueden ser utilizados para diferentes grupos taxonómicos (Simon et al. 1994).

El análisis del ADN mitocondrial es más poderoso que otro tipo de marcadores como por ejemplo alozimas, por revelar la estructura de poblaciones, y ha sido usado para numerosos estudios de poblaciones (Avice et al. 1987, citado por Hoy 1994). Las regiones del ADN mitocondrial, citocromo oxidasa I (COI) y citocromo oxidasa II (COII), son útiles para medir la variación genética en diversos grupos de insectos (Szalanski & Owens 2003; Lewter et al. 2006).

El entendimiento de la estructura genética de poblaciones de los insectos plaga hace posible predecir los incrementos y decrementos en el tamaño poblacional así como tener un mayor conocimiento de las migraciones entre las poblaciones (Roderick 1996). Es importante el uso de otros marcadores moleculares que acompañen la información obtenida por el ADN mitocondrial, que permitan conocer el comportamiento tanto de machos como hembras, y una comparación de datos específicos del sexo que otorgue un método para evaluar las diferencias en el comportamiento de ambos sexos; esto, teniendo en cuenta la naturaleza matrilineal del ADN mitocondrial (Feder et al. 1994)

Otras regiones del ADN bastante usadas en estudios moleculares como una herramienta adicional a la caracterización morfológica, son la región 18S, y las regiones ITS1 (Internal Transcribed Spacer) e ITS2 del ADN ribosomal, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, con iniciadores que amplifican estas regiones y son útiles en el trabajo de diferenciación molecular (Vidigal et al. 2002). Estas regiones pueden variar entre individuos de una misma población pudiendo ser útiles en la evaluación de la estructura geográfica (Roderick 1996). Sin embargo, debido al alto polimorfismo intraespecífico y a los patrones complejos, que se producen con estas metodologías, se puede ver restringido su uso, dependiendo de la variabilidad genética propia del grupo de estudio (Vidigal et al. 2002).

El objetivo de este trabajo es evaluar diferentes poblaciones de especies de *Diatraea* spp. usando ADN mitocondrial y emplear caracteres de genitalia interna

para así determinar la diversidad y estructura genética de las poblaciones a través de la distribución geográfica de los haplotipos (o alelos, definidos como la forma única de un gen que difieren en al menos un nucleótido). Principalmente, se busca explicar el comportamiento evidenciado en las diferentes intensidades de infestación (I.I) registradas a lo largo del valle geográfico del río Cauca.

Materiales y Métodos

Colecta y cría de poblaciones de *Diatraea* spp.

Teniendo como referencia las evaluaciones de *Diatraea* spp. realizadas en los años 2005 y 2006, se hicieron recolecciones manuales de larvas a lo largo del valle geográfico del río Cauca entre enero y marzo de 2007 (tabla 1); se tubo en cuenta tanto la intensidad de infestación (I.I) registrada en las evaluaciones como la ubicación de los puntos de colecta, de tal forma que se obtuviera un muestreo representativo de la zona (Fig. 1).

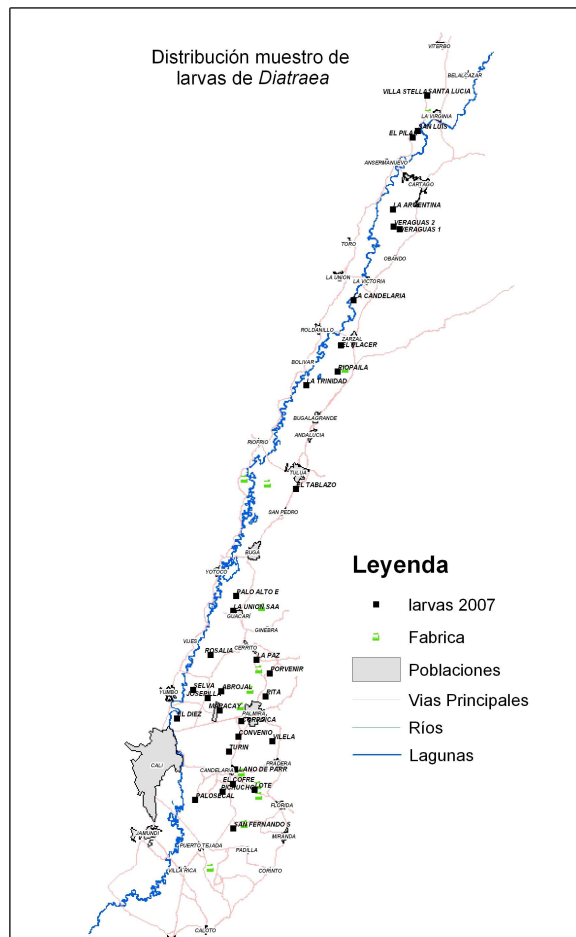


Figura 1. Distribución de colectas de larvas de *Diatraea* spp. y *Blastobasis graminea* a lo largo del valle geográfico del río Cauca, realizadas en el año 2007.

Se muestrearon 32 puntos colectando poblaciones de *Diatraea saccharalis*, *Diatraea indigenella* y *Blastobasis graminea* y se obtuvieron 2 poblaciones más; una de *Diatraea busckella* del Ingenio Sicarare (César) y otra de las especies *Diatraea saccharalis* y *Diatraea crambidoides* procedentes de Guatemala (Centro América) (Tabla 1).

Se criaron los especímenes colectados hasta el estado de adulto (salvo los provenientes del Ingenio Sicarare y Guatemala, los cuales estaban conservados en alcohol al 95%) ya que se necesitaba recuperar la genitalia para la identificación de las especies.

Tabla 1. Puntos muestreados y número de individuos evaluados de *Diatraea* spp. y *B. graminea* a lo largo del valle geográfico del río Cauca.

UBICACIÓN*	PUNTO DE MUESTREO (HACIENDA)	ESPECIE (NÚMERO DE INDIVIDUOS)					TOTAL
		<i>D. indigenella</i>	<i>D. saccharalis</i>	<i>B. graminea</i>	<i>D. busckella</i>	<i>D. crambidoides</i>	
SUR	Sn. Fernando	2					2
SUR	Palosecal	1	1				2
SUR	Plchucho	2	1				3
SUR	Cenicaña (L5)	1	3				4
SUR	Cenicaña (L12)		1				1
SUR	Cenicaña (L18)		2				2
SUR	Cofre	1					1
SUR	Llano de Párraga	1	1	1			3
SUR	Turín	1	1	2			4
SUR	Vilela	2	1				3
SUR	Convenio	1	3	1			5
CENTRO	Corpoica		4				4
CENTRO	El Diez	1	2				3
CENTRO	Josepilla	1	3				4
CENTRO	La Rita	4	1				5
CENTRO	Selva	1	4				5
CENTRO	Abrojal	1	2				3
CENTRO	La Paz	4	3				7
CENTRO	Rosalía		3				3
CENTRO	U. Saavedra	1	2				3
CENTRO	Palo Alto Escobar	2	3	1			6
NORTE	Tablazo	2	1				3
NORTE	La Trinidad		3				3
NORTE	Riopaila		3				3
NORTE	El Placer		3				3
NORTE	Candelaria		1				1
NORTE	Veraguas		2				2
NORTE	La Argentina		3				3
NORTE	San Luis		4				4
NORTE	Villa Stella		2				2
NORTE	Santa Lucía		4				4
NORTE	El Pilar		1				1
Sicarare					2		2
Guatemala			3			1	4
TOTAL	34	29	71	5	2	1	108

*Ubicación a lo largo del valle geográfico del río Cauca

Determinación de las especies a partir de caracteres morfológicos

Se realizó una diferenciación a partir de caracteres de la morfología externa, inicialmente en el estado de larva, seguido por la utilización de ciertos caracteres en el estado de pupa descritos por Pastrana (1991). Antes de las pruebas moleculares, se verificó la diferenciación de las especies, usando las ilustraciones de las estructuras de genitalia interna de machos y hembras disponibles en la literatura (Bleszynski 1969)

El método de extracción de genitalia utilizado es el empleado por la doctora Ana Elizabeth Díaz de Corpoica Palmira. La porción de tejido se colocó en KOH (10%) en baño María por 2 horas sin dejar hervir. Después se lavó con bastante agua destilada, se limpio despejando toda la grasa y se tiñó con dos gotas de chlorazol black E (Sigma) (5%) dejándolo un minuto. Se lavó con alcohol al 15% y se disectó. Las genitalias se conservaron en viales con glicerina.

Análisis morfométrico

El análisis morfométrico se llevó a cabo utilizando diferentes medidas sobre la genitalia del macho y la genitalia de la hembra. Se midieron 5 caracteres de cada sexo (Tabla 2).

La información generada de los caracteres cuantitativos seleccionados se evaluó, mediante una ANOVA de un factor, utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows versión 10.06.

Tabla 2. Variables utilizadas para diferenciar las especies y poblaciones de *Diatraea* spp. utilizadas en el estudio.

Sexo	Carácter
(1) Macho	Longitud entre el vinculatum y el tégumen
(2) Macho	Longitud del uncus
(3) Macho	Longitud de la valva mas el vinculatum
(4) Macho	Longitud de valva a valva en vista ventral
(5) Macho	Longitud desde el ápice de la valva hasta el vinculatum en vista ventral
(6) Hembra	Longitud del apófisis anterior superior
(7) Hembra	Longitud del apófisis anterior inferior
(8) Hembra	Longitud del apófisis posterior superior
(9) Hembra	Longitud del apófisis posterior inferior
(10) Hembra	Longitud de las papilas anales

Análisis molecular

Extracción de ADN

Se utilizó el tórax y parte del abdomen. Se siguió el método de extracción de Cheung *et al.* (1993), y se modificó de acuerdo con el tamaño del insecto. El tejido se maceró en 400µl de tampón de extracción frío, y se adicionaron 100 µl de solución Sarcosyl 5%. La suspensión se incubó por una hora en un baño maría a una temperatura de 65°C, invirtiéndose cada 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por seis minutos a 20°C. Se pasó el sobrenadante a otro tubo y se le adicionó 168.75 µl de acetato de amonio 10M y 300 µl de isopropanol frío, invirtiéndose varias veces y dejándolo a -20°C por dos horas, para precipitar el ADN. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos a 20°C, se descartó el sobrenadante dejando el botón (ADN) y se lavó con 300µl de etanol 70% (-20°C), invirtiendo el tubo varias veces, teniendo cuidado de no desprender el precipitado. Se dejó secar por 20 minutos a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporó y se resuspendió en tampón TE. Finalmente se agregó a cada muestra ribonucleasa A (40 mg/ml (concentración final)) y se incubó a 37°C por 20 minutos. El ADN se conservó a -20°C hasta su utilización.

Cuantificación de ADN

Se utilizó el ADN del bacteriófago lambda (500 ng/μl) para estimar las concentraciones de ADN. Con este ADN de concentración inicial conocida se preparó una solución a una concentración final de 10 ng/μl y se prepararon patrones de 10, 50 y 100 ng/μl para comparar las muestras.

Evaluación de iniciadores de ADN ribosomal y ADN mitocondrial

Se evaluaron varias combinaciones de iniciadores que amplifican diferentes regiones de ADN ribosomal, así como iniciadores que amplifican un fragmento del gen II que codifica para la Citocromo Oxidasa y para la subunidad 16S del ADN mitocondrial (Tabla 3).

Tabla 3. Combinaciones de iniciadores de ADN mitocondrial y ribosomal evaluadas.

ADN mitocondrial	ADN ribosomal
A-298 – BtLYS A-298 (5'ATT GGA CAT CAA TGA TAT TGA 3') BtLYS (5'GTT TAA GAG ACC AGT ACT TG 3')	ITS1 - ITS2
16ScbF - 16ScbR	ITS1 - ITS4
	ITS3 - ITS4
	ITS3 - ITS4
	NS7 – NS8
	NS3 – NS4
	ML1 – ML6
	ML5 – ML8
	ML3 – ML4
	D2a – D2b

Condiciones de la PCR

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se llevó a cabo utilizando un volumen total de 12,5 μl, 20 ng de ADN, Tampón 1X, dNTPs 0.2 mM, Iniciador A

0.5 μ M, Iniciador B 0.5 μ M, BSA 0.1 μ g, Taq polimerasa 1U, ajustado a 12.5 μ l con H₂O. Las condiciones para realizar la amplificación del ADN fueron diferentes teniendo en cuenta la región del ADN a amplificar (ribosomal y mitocondrial) (tabla 4).

Tabla 4. Condiciones utilizadas en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para los diferentes fragmentos de ADN.

ADN RIBOSOMAL			ADN MITOCONDRIAL (COII)			ADN MITOCONDRIAL (16S)		
PASO	Temperatura (°C)	Tiempo	PASO	Temperatura (°C)	Tiempo	PASO	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos	1	94	1 minuto	1	94	2 minutos
2	94	30 segundos	2	94	30 segundos	2	92	45 segundos
3	57	1 minuto y 30 segundos	3	50	1 minuto	3	50	1 minuto
4	72	30 segundos	4	72	1 minuto	4	72	1 minuto y 30 segundos
5	39 veces desde el paso 2		5	34 veces desde el paso 2		5	39 veces desde el paso	
6	72	10 minutos	6	72	1 minuto	6	72	2 minutos
7	final		7	final		7	final	

Electroforesis

Los amplificados y las posteriores digestiones de ADN mitocondrial y ribosomal, utilizando diferentes enzimas de restricción, fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.8% (utilizando un voltaje de 100V en tampón TAE 1X), preparados en tampón TBE 0.5X (Tris-ácido bórico 0.045M; EDTA 0.001M), usando Bromuro de Etidio (0.4 μ g/ml para la tinción) (Sambrook et al. 1989). La longitud de los productos de amplificación se estimó por comparación con un marcador Lambda (λ) digerido con la enzima *Pst*I. Las electroforesis se realizaron en una cámara para electroforesis horizontal Marca Gibco BRL, modelo Horizon 20-25.

PCR-RFLP

En la evaluación de genotipos se realizaron digestiones para establecer diferencias entre las poblaciones. Con el producto obtenido a partir del ADN

mitocondrial utilizando los iniciadores que amplifican un fragmento del gen II que codifica para la Citocromo Oxidasa y para la subunidad 16S se realizaron digestiones empleando diferentes enzimas de restricción (6 μ l de producto de PCR más 4U de enzima, en una reacción total de 15 μ l). También se evaluaron algunas combinaciones de amplificadores de ADN ribosomal digeridos con las enzimas.

Secuenciación

Se secuenció un parte del gen II de la citocromo oxidasa de 108 especimenes. La secuenciación del ADN se llevo a cabo usando un secuenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems). El alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas se efectuó con el programa CLUSTALW 1.6 del programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4 (Tamura et al. 2007).

Distancia genética y flujo de genes

El índice de diferenciación genética de Wright (F_{ST}), la tasa efectiva de migración (Nm) y demás estimados se realizaron usando el programa de análisis de polimorfismos de ADN DnaSp versión 4.20 (Rozas et al. 2003)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de las especies a partir de caracteres morfológicos

Para el estudio de la genitalia de las especies de *Diatraea* y *Blastobasis graminea* se hizo una revisión literaria en busca de descripciones (Sallam & Allsopp 2003; Linares & Bastidas 1996; Pastrana 1991; Bleszynski 1969), siendo la más completa aquella elaborada por Bleszynski 1969 y a partir de la cual se diferenciaron todas las especies del estudio (Fig 2 y 3). En el tabla 5 se presentan descripciones sobre las estructuras estudiadas y se incluye una clave dicotómica que utiliza los caracteres más útiles para determinar las especies de estudio.

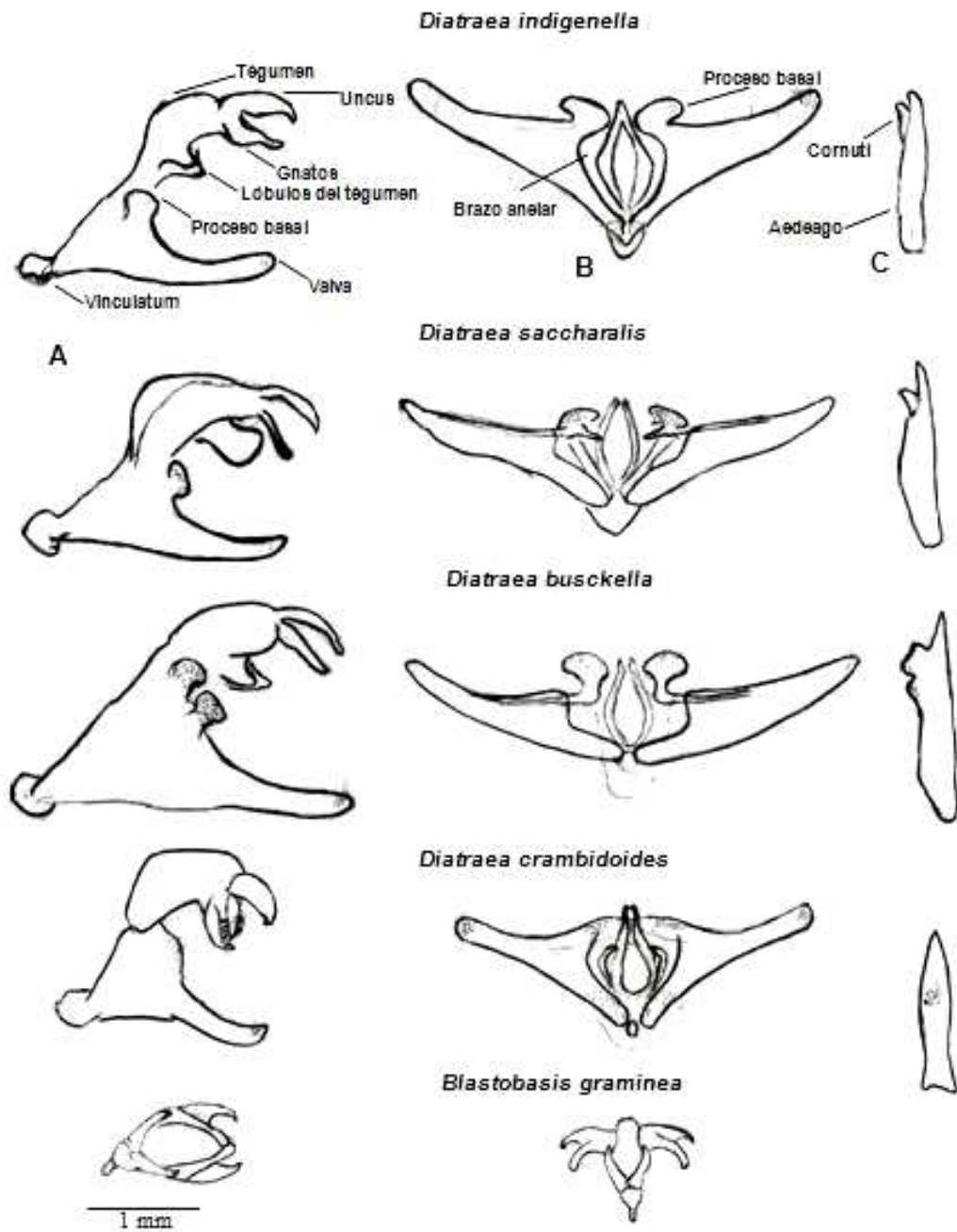


Figura 2. Estructuras de la genitalia interna de machos de especies del género *Diatraea* y *Blastobasis graminea*. **A.** Genitalia en vista dorsal. **B.** Genitalia en vista ventral. **C.** Aedeago.

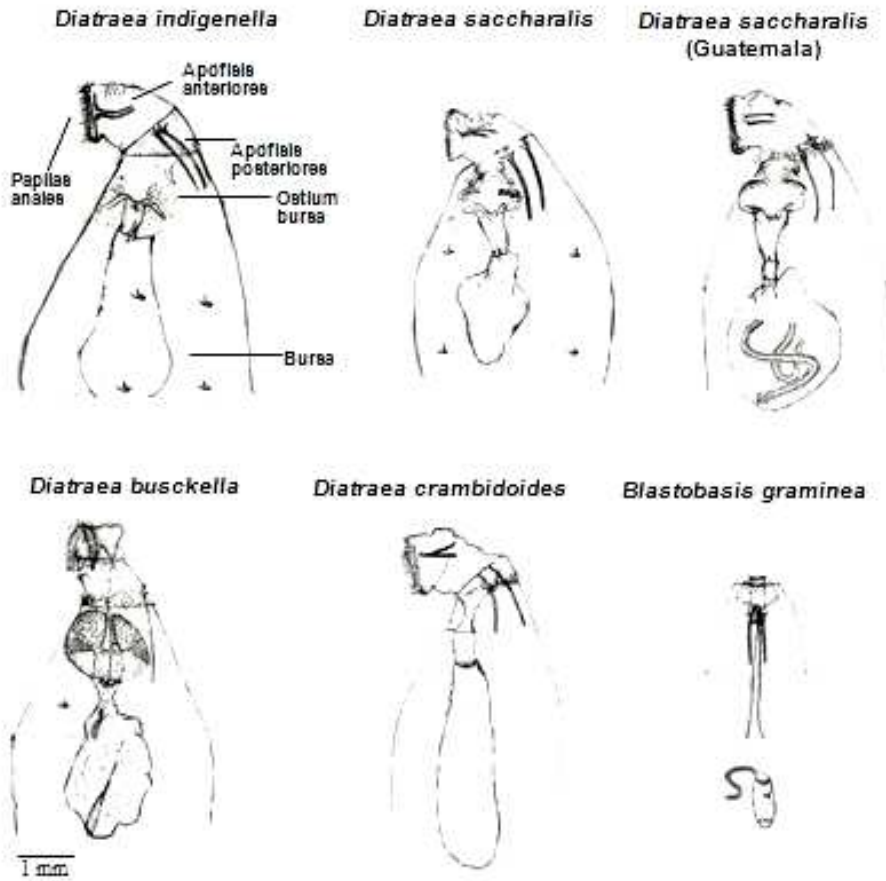


Figura 3. Estructuras de la genitalia interna de hembras de especies del género *Diatraea* y *Blastobasis graminea*.

Tabla 5. Descripciones de caracteres de la genitalia de macho y hembras de *Diatraea* spp. y *Blastobasis graminea*.

<i>D. indigenella</i>		<i>D. saccharalis</i>		<i>D. busckella</i>		<i>D. crambidoides</i>		<i>Blastobasis graminea</i>	
MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA
-Lóbulos del tégumen de forma ahusada o en punta, estrechos. -Proceso basal de la valva redondeado recubierto en la parte Terminal con espinas -Gnatos con espinas en gran parte de la superficie interna	-Ostium ligeramente esclerotizado -Bursa en forma de pera	-Lóbulos del tégumen redondeados -Tégumen grande, ampliamente redondeado -Uncus más amplio que el gnatos -Aedeago recto con proyección en forma de dedo	-Bursa en forma de corazón -Bursa de <i>D. saccharalis</i> proveniente de Guatemala diferente; mucho más anchas y redoda, en forma de globo	-Uncus y gnatos similares a los de <i>D. saccharalis</i> -proceso basal de la valva es más redondeado que el de <i>D. saccharalis</i> , y con espinas mas pronunciadas -Aedeago con cornuti de forma plegada	-Ostium bastante esclerotizado y amplio -Bursa de forma desigual, plegada	-Uncus y gnatos amplio, este último bastante curvado y con espinas -No se presentan proceso costal ni lóbulo del tégumen -Aedeago sin cornuti	-Áreas que rodean el ostium no están muy esclerotizadas -Bursa bastante larga y estrecha	-Vinculatum en forma de dedo -Brazos laterales amplios y divididos	-Apófisis posteriores bastante largos -Apófisis anteriores de la mitad de la longitud de los posteriores -Bursa de forma alargada con pliegues; hacia la mitad pliegue con estructura en forma de gancho

**Clave morfológica para la diferenciación de cuatro especies del género
Diatraea (Lepidoptera: Crambidae), en la zona de muestreo**

1. Aedeago con cornuti y genitalia con proceso basal 2
1' Ausencia de cornuti en el aedeago y proceso basal en la genitalia
..... ***D. crambidoides***
2. Tégumen amplio con respecto al uncus y gnatos 3
2' Tégumen estrecho con respecto al uncus y gnatos; lóbulos del tégumen en
forma ahusada o en punta; vinculatum alargado ***D. indigenella***
3. Lóbulos del tégumen bastante redondeados y alargados; tégumen amplio,
vinculatum agudo
..... ***D. saccharalis***
- 3' Tégumen estrecho con lóbulos de forma aguda en el ápice; vinculatum de
forma redonda ***D. busckella***

Análisis morfométrico

Los datos de las medidas tomadas se evaluaron después de conformar grupos de acuerdo con la ubicación del punto de colecta; se dividió en norte centro y sur a lo largo del valle geográfico del río Cauca y se evaluó la hipótesis que se pone a prueba en la ANOVA de un factor, exponiendo que la medias poblacionales son iguales. La hipótesis de igualdad de medias es rechazada si el nivel confianza es menor que 0,05. Al comparar las diferentes medias de los datos generados sobre las genitalias de hembras para cada una de las especies no se encontraron diferencias significativas para rechazar la hipótesis. Cuando se comparan las especies se presenta una diferenciación significativa entre las mismas con dos caracteres de la genitalia (Tabla 6). Con las medias generadas con los caracteres de la genitalia de machos, para *Diatraea saccharalis* se observaron dos que permiten una diferenciación según la ubicación (Tabla 7).

Tabla 6. Comparación interespecífica del promedio de medias de mediciones de la genitalia de machos para las especies de *Diatraea* spp.

ESPECIE	VARIABLE				
	1	2	3	4	5
<i>D. indigenella</i>	2.593a	0.730a	2.417a	3.621a	1.665a
<i>D. saccharalis</i>	2.473b	0.742a	2.359a	3.387b	1.591a
<i>D. busckella</i> *	3.15	0.812	2.962	4	1.95

*Solo se contaba con un espécimen

Promedios seguidos por la misma letra no se diferencian estadísticamente (p: 0,05)

1: Longitud entre el vinculum y el tégumen

2: Longitud del uncus

3: Longitud de la valva mas el vinculum

4: Longitud de valva a valva en vista ventral

5: Longitud desde el ápice de la valva hasta el vinculum en vista ventral

Tabla 7. Comparación intraespecífica del promedio de medias de mediciones de la genitalia de machos de acuerdo con la ubicación.

ESPECIE	UBICACIÓN	VARIABLE				
		1	2	3	4	5
<i>D. indigenella</i>	CENTRO	2.608a	0.749a	2.421a	3.650a	1.649a
	SUR	2.576a	0.710a	2.413a	3.590a	1.683a
<i>D. saccharalis</i>	NORTE	2.531a	0.753a	2.402a	3.544a	1.606ab
	CENTRO	2.417a	0.725a	2.303a	3.201b	1.499a
	SUR	2.463a	0.748a	2.372a	3.406ab	1.691b
	GUATEMALA*	2.562	0.712	2.250	3.425	1.175
<i>D. busckella</i>	SICARARE*	3.15	0.812	2.962	4	1.95

*Solo se contaba con un espécimen

Promedios seguidos por la misma letra no se diferencian estadísticamente (p: 0,05)

1: Longitud entre el vinculum y el tégumen

2: Longitud del uncus

3: Longitud de la valva mas el vinculum

4: Longitud de valva a valva en vista ventral

5: Longitud desde el ápice de la valva hasta el vinculum en vista ventral

Evaluación de iniciadores de ADN ribosomal y ADN mitocondrial

Se evaluaron y seleccionaron diferentes combinaciones de iniciadores ribosomales y mitocondriales de acuerdo con la definición e intensidad de las bandas amplificadas. Las combinaciones de iniciadores de ADN ribosomal no eran reproducibles por lo cual, no fueron útiles en la caracterización de las especies. Las combinaciones de iniciadores que amplifican dos regiones del ADN mitocondrial (Citocromo oxidasa, 16S) presentaron bandas, aunque monomorfas, bien definidas, lo que permitió evaluar diferentes enzimas de restricción. Se evaluaron 17 enzimas de restricción con una muestra de las poblaciones colectadas, para encontrar polimorfismo que permitieran tanto diferenciar las especies como las poblaciones. Al igual que en el caso de las amplificaciones, se seleccionaron las enzimas de restricción que mostraran,

primero, digestión sobre el amplificado y segundo, una buena definición de las bandas obtenidas (Tabla 8).

Tabla 8. Enzimas de restricción utilizadas para digerir diferentes fragmentos de ADN mitocondrial.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN	CITOCROMO OXIDASA II (COII)	SUBUNIDAD 16S
<i>Dra</i> I	d	d
<i>Hae</i> III	nd	nd
<i>Msp</i> I	nd	nd
<i>Kpn</i> I	nd	nd
<i>Pst</i> I	nd	nd
<i>Hinf</i> I	d	nd
<i>Hind</i> III	nd	nd
<i>Bam</i> HI	nd	nd
<i>Xba</i> I	nd	nd
<i>Mse</i> I	d	nd
<i>Cla</i> I	nd	nd
<i>Pvu</i> I	nd	nd
<i>Eco</i> RI	nd	nd
<i>Taq</i> I	d	d
<i>Apo</i> I	d	d
SAU3A	nd	nd
<i>Sma</i> I	nd	nd

d: Digirió

nd: No digirió

De las enzimas que mostraron digestión se seleccionaron tres para ser evaluadas en todas las poblaciones de *Diatraea* spp. (*Taq* I, *Dra* I y *Mse* I). Al amplificar una región del gen II de la citocromo oxidasa y posteriormente digerir con la enzima *Dra* I se pueden diferenciar todas las especies (Fig 2). Al utilizar la enzima *Taq* I, se presentan polimorfismos entre hembras y machos de *Diatraea indigenella* (Fig 3).

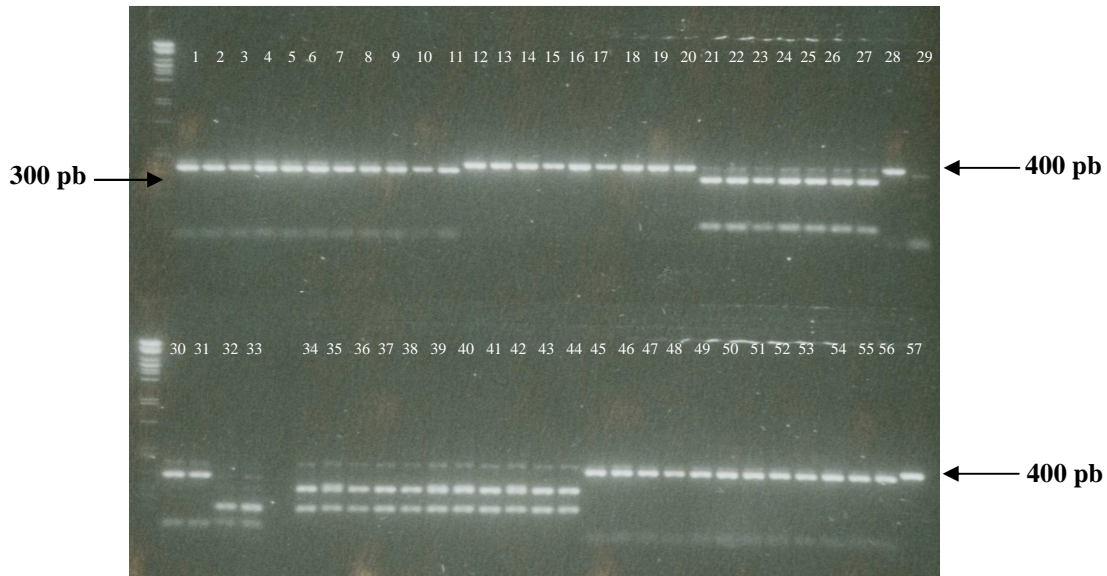


Figura 2. Digestión con *Dra* I de la amplificación generada por los iniciadores A-298 y B-tLYS, que amplifican un fragmento del gen II que codifica para la citocromo oxidasa. 1-11: *D. saccharalis*; 12-20: *D. busckella*; 21-27 y 30-31: *B. graminea*; 32-33: *D. crambidoides*; 34-44: *Diatraea indigenella*; 45-56: *D. saccharalis*; 28 y 57: banda sin digerir; 29: blanco. Gel de agarosa al 1.8%.

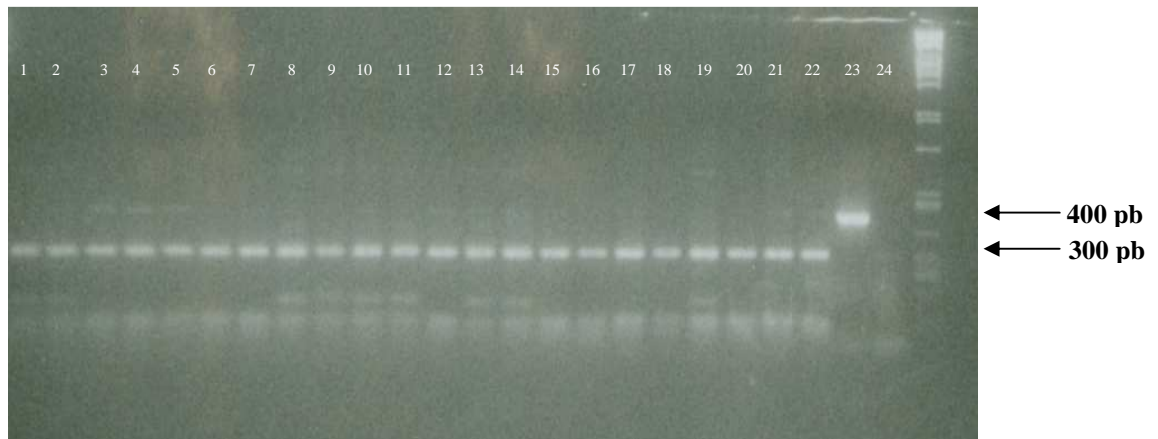


Figura 3. Digestión con *Taq* I de la amplificación generada por los iniciadores A-298 y B-tLYS, que amplifican un fragmento del gen II que codifica para la citocromo oxidasa. Diferentes poblaciones de *Diatraea indigenella*. La banda adicional en ciertas muestras se registra en hembras. Gel de agarosa al 1.8%.

Diferenciación genética

Después de evaluar todas las enzimas no se obtuvieron más polimorfismo que pudieran arrojar una diferenciación inter e intrapoblacional de las especies. De acuerdo con estos resultados, se secuenciaron 147 individuos de todas las poblaciones existentes, que fueron secuenciados empleando ADN mitocondrial y el iniciador A-298. De las muestras secuenciadas, 39 fueron excluidas del análisis final debido a fueron de baja calidad y podrían generar resultados erróneos.

El análisis de los 29 especímenes de *D. indigenella* generó 11 haplotipos, de una secuencia parcial del gen II de la citocromo oxidasa (365 pb). En cada uno de los grupos formados se registraron desde tres haplotipos hasta diez haplotipos (Tabla 9). De los 11 haplotipos, siete fueron únicos, presentándose solo en una localidad (Tabla 10). El haplotipo mas frecuente fue el A, registrado en 10 de las 18 poblaciones estudiadas, a lo largo de 84 km (Fig 4).

Tabla 9. Diversidad dentro de las localidades estimada para *Diatraea indigenella*.

UBICACIÓN	TAMAÑO DE LA MUESTRA	# HAPLOTIPOS	DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA	# SITIOS POLIMORFICOS	DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA (Pi)
CENTRO	17	10	0,83824	16	0,01108
SUR	12	3	0,62121	1	0,00174
GENERAL	29	11	0,778	16	0,00763

Tabla 10. Distribución de los haplotipos de *Diatraea indigenella* en la poblaciones.

POBLACIÓN	UBICACIÓN	HAPLOTIPOS										
San Fernando	SUR											K
Cofre	SUR											K
Cenicaña	SUR											K
Turin	SUR											K
Palosecal	SUR	A										
Pichucho	SUR	A										
Llano de Parraga	SUR		B									
Vilela	SUR	A										
Convenio	SUR	A										
Diez	CENTRO	A										
Josepilla	CENTRO	A										
Selva	CENTRO			C								
Abrojal	CENTRO				D							
Rita	CENTRO	A	B							I		
Paz	CENTRO	A				E	F				J	
Unión Saavedra	CENTRO				D							
Palo Alto	CENTRO	A						G				
Tablazo	CENTRO	A								H		

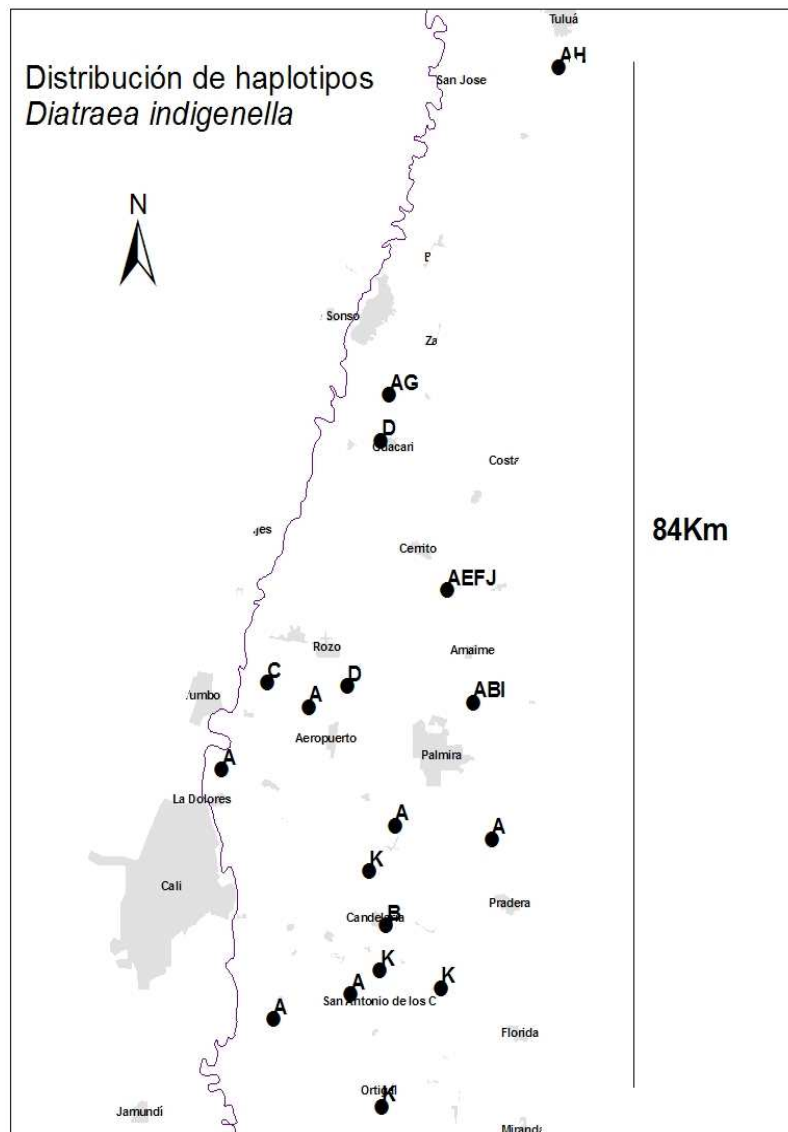


Figura 4. Distribución geográfica de los haplotipos encontrados para *Diatraea indigenella*.

Al calcular el estadístico F de diferenciación genética (Hudson, Slatkin y Maddison 1992) (F_{ST} : 0,11411), se obtiene un valor bajo; el hecho de que un haplotipo se encuentre distribuido a lo largo de la zona de estudio, un haplotipo dominante, refleja una alta similaridad y un alto flujo de genes (Nm : 3,88); el Nm se calculó empleando la ecuación expuesta por Wright 1951 (F_{ST} : $1/2Nm + 1$).

Para *D. saccharalis*, a partir de 71 especímenes, se generaron 8 haplotipos, de una secuencia de 359 pb. Con los grupos formados se tiene desde dos haplotipos hasta cuatro haplotipos (Tabla 11). De los 8 haplotipos, cinco fueron únicos,

presentándose solo en una localidad (Tabla 12). El haplotipo mas frecuente fue el A, registrado en 28 de las 30 poblaciones estudiadas, a lo largo de 180 km (Fig 5).

Tabla 11. Diversidad dentro de las localidades estimada para *Diatraea saccharalis*.

LOCALIDAD	TAMAÑO DE LA MUESTRA	# HAPLOTIPOS	DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA	# SITIOS POLIMOFICOS	DIVERSIDAD. NUCLEOTIDICA (Pi)
NORTE	26	3	0.21846	2	0.00103
CENTRO	31	4	0.18710	7	0.00164
SUR	11	2	0.18182	1	0.00052
GUATEMALA	3	3	1	9	0.01724
GENERAL	71	8	0,262	16	0,00268

Tabla 12. Distribución de los haplotipos de *Diatraea saccharalis* en la poblaciones.

POBLACION	UBICACIÓN	HAPLOTIPO			
		A	B	C	D
PICHUCHO	SUR	A			
L5	SUR	A			
L18	SUR	A			
L12	SUR	A			
TURIN	SUR	A			
LLANO DE P	SUR	B			
VILELA	SUR	A			
CONVENIO	SUR	A			
CORPOICA	CENTRO	A	C		
EL DIEZ	CENTRO	A			
JOSEPILLA	CENTRO	A			
RITA	CENTRO	A			
SELVA	CENTRO	A			
ABROJAL	CENTRO	A			
PAZ	CENTRO	A	D		
ROSALIA	CENTRO	A			
UNIÓN SAA.	CENTRO	A	E		
PALO ALTO	CENTRO	A			
TABLAZO	CENTRO	A			
LA TRINIDAD	NORTE	A			
RIOPAILA	NORTE	A			
EL PLACER	NORTE	A	D		
CANDELARIA	NORTE	A			
VERAGUAS	NORTE	A			
ARGENTINA	NORTE	A	D		
SAN LUIS	NORTE	A			
VILLA STELLA	NORTE	A	B		
SANTA LUCÍA	NORTE	A			
EL PILAR	NORTE	A			
GUATEMALA	GUATEMALA	F	G	H	

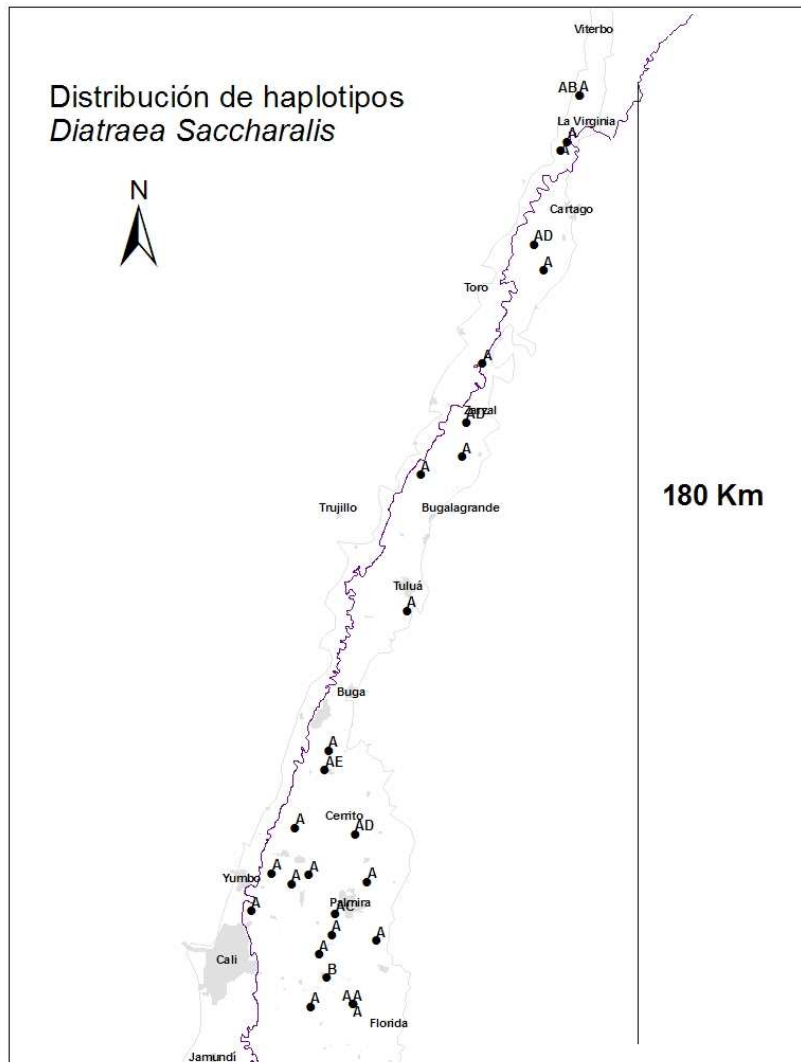


Figura 5. Distribución geográfica de los haplotipos encontrados para *Diatraea saccharalis*.

Al calcular el estadístico F de diferenciación genética (Hudson, Slatkin y Maddison 1992) (F_{ST} : 0,48304) se obtiene un valor relativamente alto, lo cual expondría una alta divergencia genética. Sin embargo, este valor es resultado de la inclusión de las muestras procedentes de Guatemala. Cuando se realizó el análisis sin estas, se obtuvo un F_{ST} : -0,02231. Cuando un F_{ST} da un valor negativo, puede ser interpretado como cero (Long 1986). Se obtuvo además una diversidad haplotípica de 0,19491 y diversidad nucleotídica de 0,00121. Estos resultados muestran una homogeneidad genética entre las poblaciones.

En el caso de *Diatraea busckella*, *Diatraea cramboides* y *Blastobasis graminea* no fue posible hacer un análisis poblacional debido a la poca cantidad de

muestras. Todas las muestras de estas especies mostraron haplotipos diferentes. Para *D. crambidoides* se comparó la secuencia del único espécimen del análisis con uno registrado en el GenBank (acceso AY320493). Para esta última especie, no se realizó un análisis morfológico de la genitalia del macho, ya que no se contaba con ningún espécimen. La información concerniente a la longitud de la secuencia evaluada para cada especie, la divergencia entre las secuencias y la composición nucleotídica se registra en la tabla 13.

Tabla 13. Composición nucleotídica de las secuencias obtenidas de las diferentes especies.

<i>Diatraea indigenella</i> (365 pb)				<i>Diatraea saccharalis</i> (359 pb)				<i>Diatraea busckella</i> (374 pb)				<i>Diatraea crambidoides</i> (350 pb)				<i>Blastobasis graminea</i> (369 pb)			
DIVERGENCIA DE LAS SECUENCIAS (%)																			
4.5				4.6				1				8				3.8			
COMPOSICIÓN NUCLEOTÍDICA																			
T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
37,3	14,6	36,5	11,7	38	14	35,6	12,3	38,4	13,6	35,7	12,3	37,5	15,2	34,5	12,8	39,2	13	35,3	12,5

Los resultados encontrados al comparar el análisis estadístico sobre los caracteres morfométricos y la diversidad haplotípica (Tabla 11) de *Diatraea saccharalis* muestran una correlación, ya que la zona donde se presenta la mayor variación en la diversidad haplotípica coincide con la diferenciación significativa que existe entre las muestras de la zona norte y zona centro, utilizando la variable 4 (Longitud de valva a valva en vista ventral) (Tabla 7). Se observan leves diferencias en especímenes de diferentes ubicaciones; esto se evidencia más al comparar los datos de las muestras de *Diatraea saccharalis* provenientes de Guatemala, que con el análisis morfológico y molecular pueden ser considerados como un biotipo diferente al colombiano.

Aunque hay poca diferenciación genética entre las poblaciones de *Diatraea indigenella*, el índice de migración refleja movimiento de especímenes, existiendo una dispersión potencial para mantener la homogeneidad genética (Vargas et al. 2006). Este tipo de estructura, una alta relación entre las poblaciones sustentada

por la co-ocurrencia de un mismo haplotipo en todas las localidades, es típica en especies de insectos que son transportadas por humanos e insectos plaga que se encuentran a través del mundo (Bae 2001).

En el caso de *D. saccharalis*, las poblaciones evaluadas exhiben una homogeneidad bastante alta; la frecuencia de los haplotipos diferentes al más común en la zona estudiada, no son suficientes para representar un grado de divergencia entre las poblaciones. El registro de estos haplotipos es normal teniendo en cuenta que las poblaciones de casi todas las especies, muestran al menos en algún grado, diferenciación genética al comparar diferentes poblaciones (Ehrlich & Raven 1969, citado por Lewter et al. 2006)

Con estos resultados y los concluidos por Obando (2007), donde las zonas que presentaron mayores niveles de daño, registradas en el diagnóstico de la situación de *Diatraea* del 2005, coinciden con la distribución de *D. saccharalis*, podemos decir que aparentemente no existe una relación entre la genética de estas especies y su comportamiento reflejado en la intensidad de infestación a lo largo del valle geográfico del río Cauca. La homogeneidad genética arroja un comportamiento similar; entonces deben existir otros factores que estén influenciando la incidencia que tiene esta plaga sobre el cultivo de la caña de azúcar. Por ejemplo, la presencia de variedades susceptibles, que permite la proliferación de *D. saccharalis* o de *D. indigenella*, iniciando focos que beneficien la dispersión e incidencia de la plaga en una zona dada. Igualmente las condiciones agroecológicas pueden hacer que el cultivo sea más vulnerable al ataque de la plaga y favorecer su proliferación (Obando 2007).

La baja variabilidad es un aspecto importante para la implementación de programas de control basados tanto en el uso de ciertos insecticidas, debido a la probabilidad reducida de la resistencia a estos (Jaramillo et al. 2001), como en el uso de enemigos naturales dirigidos a las diferentes especies, sobre las cuales se

esperaría un control efectivo, salvo condiciones que esten interfiriendo en este tipo de control.

BIBLIOGRAFÍA

BAE, J.S., I. KIM., S-R. KIM., B-R JIN & H-D. SOHN. 2001. Mitochondrial DNA sequence variation of the mushroom pest flies, *lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae), in Korea. Appl. Entomology. Zool. 36 (4): 451-457.

BLESZYNSKI, S.1969. The taxonomy of the Cambrine moth borer of sugar cane En: Williams, J. R. et al. Pets of sugar cane. Elsevier. Amsterdam – London. p 25.

BOX, H. 1956. New species and records of *Diatraea* and *Xanthopherne* (Lep: Pyralidae). Bull. Ent. Res. 22: 1- 50.

CHEUNG W.Y., N. HUBERT & B.S. LANDRY. 1993. A simple and rapid DNA extraction method for plant, animal, and insects suitable for RAPD and other PCR analysis. PCR Methods and Applications. 3: 69-70

FEDER, J.L., C.A. Chilcote & G.L. BUSH. 1988. Genetic differentiation between sympatric host races of the apple magot fly *Rhagoletis pomonella*. Nature 336: 61-64.

GOMEZ, L.A. y CADENA, P. 2007. Diagnóstico de la situación de *Diatraea* spp. en el Valle del río Cauca, segundo año. En: Carta trimestral Ene. – Mar. Cenicafía. Cali. Vol. 29 No 1. p. 27 – 30.

HOY, M. A. 1994. Insect Molecular Genetics. An introduction to principles and applications. Academic Press, Inc. San Diego, California. 546p.

HUDSON, R., M. SLATKIN. & W. MADDISON. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. Genetics 132: 583 -589

JARAMILLO. C., M.F. MONTAÑA., L.R. CASTRO., G.A. VALLEJO & F. GUHL. 2001. Differentiation and Genetic Analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD Amplification. Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol 96(8): 1043-1048

LANGE . C.L., K.D. SCOTT., G.C. GRAHAM., M.N. SALLAM., & P.G. ALLSOPP. 2004. Sugarcane moth borers (Lepidoptera: Noctuidae and Pyraloidea): phylogenetics constructed using COII and 16S mitochondrial partial gene sequences. Bulletin of Entomological Research, Volume 94, Number 5, October 2004 , pp. 457-464

LEWTER, J.A., A. SZALANSKI., R. NAGOSHI., R. MEAGHER., C. OWENS., & R. LUTTRELL. 2006. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuide). Florida, Entomologist. 89 (1)

LINARES, F., & R. BASTIDAS. 1996. Descripción comparativa del género *Diatraea* Guilding (Lepidoptera: Pyralidae) que atacan la caña de azúcar en Venezuela. Yaracuy, Venezuela. FONIAP. P 92. Serie a No 11

LONG, J.C 1986. The allelic correlation structure of Gianjand and Kalam speaking people. I. The estimation and interpretation of Wrigth's F-Statistics. Genetics 112:629-647.

OBANDO, V.P. 2007. Análisis de algunas causas del brote de *Diatraea spp.* (Lepidoptera: Crambidae), observado en el valle del río Cauca desde 2003. Tesis de pregrado. Pasto – Colombia. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas. 127p.

PASTRANA, C. 1991. Determinación del ciclo de vida de *Diatraea saccharalis* y *Diatraea indigenella* bajo varios regímenes alimenticios y su comparación morfológica. Tesis de pregrado. Palmira, Valle Universidad Nacional de Colombia. 87p.

PEAIRS, B. & SAUNDERS, J.L. 1980. *Diatraea lineolata* y *D. saccharalis*: Una revisión en relación con el maíz. Agronomía Constarticense 4(1): 123-135.

RODERICK, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: Gene flow, Phylogeography, and their uses. Ann. Rev. Entomol 41: 325-352.

ROZAS, J., J. C. SÁNCHEZ-DEL BARRIO., X. MESSEGUER & R. ROZAS. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.

SALLAM, M.S & ALLSOP, P.G. 2003. Bureau of sugar experiment stations. *Diatraea* incursion management Plan: 1-67

SAMBROOK, J., C. R. FRITSCH., T. MANIATIS. 1989. Preparation and examination of agarose gels. Págs. 6.9-6.19. en: Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. 2da Ed. Molecular cloning: A laboratory manual.

SCHILTHUIZEN, M. 2003. Shape matters: the evolution of insect Genitalia. Proceedings of the Section Applied and Experimental Entomology of the Netherlands Entomological Society 14: 9-15.

SIMON, C., F. FRATI., A. BECKENBACK., B. CRESPI., H. LIU P. FLOOK. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. *Annals Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.

TAMURA, K., J. DUDLEY., M. NEI & S. KUMAR. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24:1596-1599.

VARGAS, G.; OBANDO, V. y GOMEZ, L.A. 2005. Diagnóstico de la situación de *Diatraea* spp. en el Valle del río Cauca. En: Carta trimestral Jul – Dic. Cenicaña, Cali. Vol. 27 No 3-4 . p. 27 – 31

VARGAS, E., C. ESPITIA., C. PATIÑO, N. PINTO, G. AGUILERA, C. JARAMILLO, M.D. BARGUES & F. GUHL. 2006. Genetic structure of *Triatoma venosa* (Hemiptera: Reduviidae): molecular and morphometric evidence. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(1): 39-45

VIDIGAL, THDA., L. MONTRESOR., A. SIMPSON & O. CARVALHO. 2002. Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism of Cytocrome Oxidase Subunit I Used for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* species intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(1): 47-52.

WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15: 323 – 354.

ZALANSKI, A.L. & C.B. OWENS. 2003. GENETIC VARIATION OF THE SOUTHERN CORN ROOTWORM, (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE). *Florida Entomologist.* 86(3): 329-333.

ZENNER, J. I., JARAMILLO, C. T., GARCÍA, A. C. 1965. Determinación del parasitismo natural del *Diatraea* spp. en dos ingenios del Valle geográfico del río Cauca. Tesis de pregrado. Palmira valle. Universidad Nacional de Colombia.

