

**IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* EN ALGUNAS  
POBLACIONES DE COLOMBIA PARA EL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO  
MIGRATORIO DE LA ESPECIE**

HAIDY SALINAS HERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE MEDELLÍN  
FACULTAD DE CIENCIAS  
POSGRADO EN CIENCIAS- ENTOMOLOGÍA

Medellín

Agosto de 2010

**IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* EN ALGUNAS  
POBLACIONES DE COLOMBIA PARA EL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO  
MIGRATORIO DE LA ESPECIE**

HAILY SALINAS HERNÁNDEZ

BIÓLOGA

DIRECTORA

CLARA INÉS SALDAMANDO BENJUMEA

BIÓLOGA MSc. Ph.D

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS - ENTOMOLOGÍA

Medellín

Mayo de 2010

## TABLA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> como plaga	16
2.1.1. Distribución	16
2.1.2. Biología	17
2.1.3. Control	17
2.2. Biotipos y haplotipos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	18
2.2.1. Biotipo y haplotipo	18
2.2.2. Fisiología de los biotipos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	20
2.2.3. Diferencias en la distribución	21
2.2.4. Diferencias moleculares en los biotipos	22
2.2.5. Haplotipos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	24
2.3. ADN mitocondrial y su evolución	27
2.4. Gen <i>citocromo oxidasa I - COI</i> - como marcador molecular	30
2.5. Análisis de migración, dispersión y flujo genético	30
2.6. Principios de análisis y métodos de secuencias de ADN	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA – JUSTIFICACIÓN	38
4. OBJETIVOS	40
4.1. Objetivo general	40
4.2. Objetivos específicos	40

5. HIPÓTESIS	41
5.1. Hipótesis 1	41
5.2. Hipótesis 2	41
5.3. Hipótesis 3	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1. Colecta de larvas	42
6.2. Extracción de ADN	43
6.3. Amplificación y secuenciación del gen <i>citocromo oxidasa I- COI</i>	44
6.4. Análisis de secuencias y genética de poblaciones	44
7. RESULTADOS	47
7.1. Haplotipos de <i>Spodoptera frugiperda</i> en Tolima	47
7.2. Haplotipos de <i>Spodoptera frugiperda</i> en Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca	58
8. DISCUSIÓN	73
9. CONCLUSIONES	80
10. RECOMENDACIONES Y FUTURAS DIRECCIONES	82
11. REFERENCIAS CITADAS	83

## **AGRADECIMIENTOS**

La autora expresa sus agradecimientos a:

1. La Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto de investigación al investigador principal Clara Saldamando. Código Quipu 20101007063.
2. A la Corporación para Investigaciones Biológicas CIB-UNALMED, Unidad de Biotecnología Vegetal por permitir el desarrollo de la parte práctica de la investigación.
3. A Clara Saldamando por su dirección y asesoría en este trabajo de investigación
4. A Rafael Arango y a los integrantes de la Unidad de Biotecnología Vegetal por la enseñanza y los consejos en las técnicas de laboratorio y por permitirme hacer parte del excelente equipo laboral y parte de ellos.
5. A mi madre y a mi padre por la paciencia de estos dos últimos años de formación, que en algunos momentos parecieron ser eternos, por su confianza, comprensión y apoyo incondicional.

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), $P$ es el número de poblaciones muestreadas, $N_i$ es el tamaño de cada muestra y $N = \sum N_i$ es el número total de individuos. $g.f.$ : grados de libertad, $SSD$ : desviación de la suma de cuadrados, $MSD$ : media de la desviación de los cuadrados, $E(MSD)$ : media esperada de la desviación de los cuadrados.	36
<b>Tabla 2.</b> Componentes de varianza y su correspondientes estadísticos $\Phi$ .	37
<b>Tabla 3.</b> Número de larvas de <i>S. frugiperda</i> del departamento de Tolima.	47
<b>Tabla 4.</b> Sitios polimórficos y cambios nucleotídicos encontrados en los 18 haplotipos analizados de las muestras del departamento de Tolima.	49
<b>Tabla 5.</b> Haplotipos encontrados dentro de los biotipos de <i>S. frugiperda</i> en el Tolima	50
<b>Tabla 6.</b> Polimorfismo de ADN encontrado en el departamento de Tolima ( $h$ = número de haplotipos, $Hd$ = diversidad haplotípica, $S$ = número de sitios segregantes, $\pi$ = diversidad nucleotídica, $\theta$ = polimorfismo nucleotídico – Número promedio de diferencias pareadas en una población).	54
<b>Tabla 7.</b> Análisis de Varianza molecular realizado en 40 secuencias de ADN mitocondrial de <i>S. frugiperda</i> del departamento de Tolima.	57
<b>Tabla 8.</b> Número de larvas de <i>S. frugiperda</i> y cultivos de muestreo en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca.	58
<b>Tabla 9.</b> Secuencias de <i>S. frugiperda</i> obtenidas del GenBank de poblaciones de Estados Unidos (FL=Florida, AR=Arkansas, MP = Mississippi, LA= Los Ángeles).	59

<b>Tabla 10.</b> Sitios polimórficos y cambios nucleotídicos encontrados en los 42 haplotipos analizados de las muestras de los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca.	60
<b>Tabla 11.</b> Haplotipos encontrados dentro de los biotipos de <i>S. frugiperda</i> en Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca.	62
<b>Tabla 12.</b> Polimorfismo de ADN encontrado en los diferentes departamentos analizados en Colombia y en las poblaciones de Estados Unidos ( $h$ = número de haplotipos, $Hd$ = diversidad haplotípica, $S$ = número de sitios segregantes, $\pi$ = diversidad nucleotídica, $\theta$ = polimorfismo nucleotídico – Número promedio de diferencias pareadas en una población).	66
<b>Tabla 13.</b> Datos de la prueba de neutralidad de Tajima – Nei para las poblaciones analizadas de Colombia y Estados Unidos.	70
<b>Tabla 14.</b> Análisis de Varianza Molecular realizado en 111 secuencias de ADN de <i>S. frugiperda</i> en poblaciones colombianas y norteamericanas.	71
<b>Tabla 15.</b> Distancias genéticas pareadas basadas en $F_{ST}$ entre las poblaciones colombianas y norteamericanas.	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Organización de genes del ADN mitocondrial. Las bandas representan 22 RNAs de transferencia (Tomado de Freeland 2005). 28
- Fig. 2.** Número de individuos pertenecientes a cada uno de los haplotipos de *S. frugiperda* en el departamento de Tolima. 48
- Fig. 3.** Número de haplotipos de *S. frugiperda* colectados en diferentes cultivos en el departamento de Tolima. 52
- Fig. 4.** Distribución de haplotipos de *S. frugiperda* por cultivo muestreado en el departamento de Tolima. 53
- Fig. 5.** Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining y la distancia HKY (Hasegawa, Kishino y Yano 1985) basado en 40 secuencias del gen *COI* en muestras del Tolima y las plantas hospederas donde fueron colectadas (BA: Biotipo Arroz, BM: Biotipo Maíz, H++: híbrido positivo, H- -: híbrido negativo; Mz = Maíz, Az = Arroz, Sg = Sorgo y Alg = Algodón). 55
- Fig. 6.** Red de expansión mínima basada en 40 secuencias del gen mitocondrial *COI* en muestras de Tolima. 56
- Fig. 7.** Número total de haplotipos de *S. frugiperda* encontrados en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca y en las poblaciones de Estados Unidos. 59
- Fig. 8.** Distribución de haplotipos de *S. frugiperda* por cultivo muestreado en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca y en las poblaciones de Estados Unidos. 65



**Fig. 9.** Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining y la distancia HKY basado en 111 secuencias del gen *COI* de las diferentes poblaciones colombianas y norteamericanas y las plantas hospederas donde fueron colectadas (TOL =Tolima, MET= Meta, CB = Córdoba, ANT = Antioquia, VC = Valle del Cauca; Mz = Maíz, Az = Arroz, Sg = Sorgo, Alg = Algodón, Pto = Pasto, AY714299 a AY714304 y SFU72974 – SFU72977 = muestras norteamericanas). 67

**Fig. 10.** Red de expansión mínima basada en 111 secuencias del gen *COI* en muestras de Colombia y Estados Unidos. 69

**Fig. 11.** Árbol de Neighbor-Joining de las poblaciones colombianas y norteamericanas basado en valores de  $F_{ST}$  como medidas de distancia genética. 71

## RESUMEN

*Spodoptera frugiperda* es un insecto migratorio que es considerado una plaga importante en cultivos de maíz, sorgo, arroz, algodón y pastos en Norte y Sur América. Esta especie está compuesta por dos biotipos, “arroz y maíz” que son idénticos morfológicamente pero que difieren en características genéticas, fisiológicas y de asilamiento reproductivo. En estos dos biotipos se han secuenciado los genes del *citocromo oxidasa I, II* e ITS1 en diferentes poblaciones de Estados Unidos y Brasil. Sin embargo, este tipo de estudios no se ha llevado a cabo en Colombia. A partir de la secuenciación de un fragmento del gen mitocondrial *COI* en 40 individuos para el Tolima y 102 individuos para Colombia, se encontró: 18 haplotipos en Tolima y 43 dentro de Colombia. Se determinó que existe una mayor frecuencia del haplotipo 1 en los cultivos evaluados tanto para Tolima como para Colombia, indicando que éste es probablemente el haplotipo blanco dentro de los programas de monitoreo de esta plaga. Los resultados del AMOVA mostraron que los haplotipos de *S. frugiperda* no producen poblaciones genéticamente estructuradas para los cultivos analizados dentro del departamento de Tolima ( $F_{ST} = 0.000001$ ,  $P > 0.005$ ). Contrario a esto, sí se encontró estructuración genética para los departamentos colombianos y las poblaciones norteamericanas ( $F_{ST} = 0.76812$ ,  $P < 0.001$ ). El árbol de N-J para Tolima tuvo una tendencia a asociar híbridos y biotipos según el origen materno del gen *COI*. El árbol para Colombia no generó agrupaciones ni por asociación a planta hospedera ni por áreas geográficas. Las redes de expansión mínima corroboraron la alta frecuencia del haplotipo 1, encontrada con otro tipo de análisis. Los resultados de este estudio sugieren que este método de secuenciación es útil para establecerlo en el sistema de monitoreo de esta especie.

**Palabras Clave:** gusano cogollero, polimorfismo de ADN, *COI*.

## ABSTRACT

*Spodoptera frugiperda* is a migratory insect that is considered an important pest in corn, sorghum, rice, grass and bermuda grass in North and South America. This species has two strains, “rice and corn” that are identical morphologically but differ in their genetics, physiology and reproductive isolation. In these two strains the genes *cytochrome oxidase I, II* and *ITS1* have been sequenced in different populations of the United States. However, this kind of studies has never been carried out in Colombia. By using the sequencing of a fragment of the mitochondrial *COI* gene in 40 individuals from Tolima department and 102 from Colombia, 18 haplotypes for Tolima and 43 haplotypes for Colombia were found. It was concluded that there is a greater frequency of haplotype 1 on the analyzed crops for both, Tolima and Colombia, indicating that this haplotype probably is the target in the pest monitoring programs. AMOVA results showed no population structure between haplotypes of *S. frugiperda* for crops analyzed in Tolima ( $F_{ST} = 0.000001$ ,  $P > 0.005$ ). However, population structure between Colombian and North American haplotypes of *S. frugiperda* was found ( $F_{ST} = 0.76812$ ,  $P < 0.001$ ). The N-J for Tolima had a tendency to associate hybrids with strains depending on *COI* maternal origin. The tree for Colombia did not generate any association by host-plant neither geographical areas. The minimum spanning networks showed the highest frequency of haplotype 1, which was found by another kind of analysis. The results of this study suggest that sequencing mtDNA is a useful method to establish on the monitoring system of this species.

**Key Words:** fall armyworm, DNA polymorphism, *COI*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), es una plaga agrícola importante en la mayor parte del hemisferio occidental (López-Edwards et al. 1999). En Colombia, esta especie es una plaga primaria del maíz (*Zea mays*) L. y secundaria en el sorgo (*Sorghum* spp.), algodón (*Gossypium hirsutum*) y pastos (García et al. 2002). Del mismo modo, en Estados Unidos, México y Brasil, sus larvas producen altas pérdidas económicas en estos cultivos, especialmente para el cultivo de maíz (Nagoshi y Meagher 2004, Nagoshi et al. 2006, 2007 a y b, al López-Edwards et al. 1999, Busato et al. 2004). La causa de su amplia distribución en América del Norte, es su gran capacidad de dispersión y su ausencia de diapausa, su aparición en áreas con inviernos fuertes se debe a la presencia de poblaciones que hibernan y que luego migran en primavera (Pair et al. 1987). El movimiento de este insecto ha sido estudiado con detalle en América del Norte, ya que afecta las zonas central y oriental de los Estados Unidos y el sur de Canadá dada su migración anual desde estos lugares de América del Norte hacia México, Texas y Florida (Luginbill 1928, Young 1979, Pair et al. 1987, Nagoshi et al. 2007 b). En América del Norte, el estudio del comportamiento migratorio de esta polilla ha sido estudiado ampliamente debido a que si las poblaciones del biotipo de maíz y/o las poblaciones del biotipo de arroz son controladas en los sitios de hibernación (México, Texas y Florida), se podrían reducir o retrasar las migraciones hacia el norte y, por lo tanto, disminuir su densidad poblacional en campo (Nagoshi et al. 2007 a, b). Sin embargo, dicho manejo requiere un mayor conocimiento de la distribución poblacional de cada biotipo en los hábitats principales dentro de la región de hibernación (Nagoshi y Meagher 2004) y los movimientos de la especie desde América del Norte hasta América Central y América del Sur. Los movimientos de este insecto en América Central y América del Sur no se han con profundidad, debido a la falta de conocimiento de la capacidad de dispersión de esta polilla y, adicionado a esto, a los pocos estudios sobre la genética de las poblaciones de este insecto, que solo referencian Busato et al. (2004) en Brasil, Martinelli et al. (2007) y Clark et al. (2007) en Estados Unidos y Argentina. En Colombia, esta plaga se distribuye en las zonas donde se produce principalmente maíz (García et al. 2002) y se ha sugerido que en los trópicos, la dispersión de este insecto se produce como respuesta a los cambios estacionales en la precipitación, la temperatura y las plantaciones agrícolas (Nagoshi et al. 2007 a, b). Sin

embargo, son necesarios más estudios relacionados con el efecto del clima sobre los movimientos de *S. frugiperda*, particularmente en Colombia puesto que ellos permitirían optimizar el manejo integrado del insecto al prevenir su libre movimiento entre cultivos y departamentos del país. Antes de la década de los 80's, *S. frugiperda* era considerada una sola especie, pero en 1986 Pashley encontró dos biotipos morfológicamente indistinguibles que fueron identificados con aloenzimas –esterasas principalmente - (Prowell et al. 2004). Un biotipo, denominado "biotipo de maíz", que se alimenta principalmente de maíz y sorgo, y el otro biotipo denominado "biotipo de arroz" que se alimenta de arroz y pasto (Pashley 1986). Estos dos biotipos también se puede identificar con el uso de otros marcadores moleculares tales como PCR-RFLP de ADN mitocondrial y nuclear (Lu et al. 1992, Levy et al. 2002) y AFLP de ADN nuclear (Prowell et al. 2004). Veenstra et al. (1995) afirman que la ausencia de diferencias morfológicas entre los dos biotipos podría sugerir una relación muy cercana y, probablemente, un origen evolutivo reciente. Los dos biotipos han mostrado diferencias significativas en la preferencia de hospederos, su fisiología, comportamiento de apareamiento y susceptibilidad a insecticidas (Pashley 1986, 1988a; Pashley y Martin 1987, Pashley et al. 1995, Whitford et al. 1988, Whitford et al. 1992, Veenstra et al. 1995). Así mismo, hay evidencia de diferencias de comportamiento específicas al biotipo en la preferencia hacia la planta hospedera para su oviposición (Whitford et al. 1988, Pashley et al. 1992) y de aislamiento reproductivo en condiciones de laboratorio a nivel de comportamiento (Pashley y Martin 1987), temporal (Pashley et al. al 1992) y químico (Groot et al. 2008), y en la naturaleza de tipo ecológico, demostrando que la especie se encuentra en un periodo de divergencia genética de dos poblaciones asociadas principalmente al maíz y al arroz (Prowell et al. 2004). Estudios llevados a cabo en Brasil han identificado los dos biotipos de esta especie con el uso de AFLP's y ambos biotipos mostraron asociación a las mismas plantas hospederas que Pashley describió (Pashley 1986), al igual que diferencias fisiológicas, de desarrollo y susceptibilidad a insecticidas de manera similar a las diferencias que presentan los dos biotipos en América del Norte (Busato et al. 2004). En Colombia, la presencia de estos biotipos también ha sido confirmada recientemente para el departamento de Tolima, donde larvas del biotipo de maíz fueron encontradas principalmente en cultivos de maíz, algodón y sorgo y, las larvas del biotipo de arroz se encontraron más frecuentemente en cultivos de arroz y en muy bajas proporciones, en cultivos de maíz y

algodón (Vélez-Arango et al. 2008). En Estados Unidos, Lewter et al. (2006) secuenciaron un fragmento de 608 pares de bases de una región del ADN mitocondrial que incluía nucleótidos del gen citocromo oxidasa I, RNA de transferencia de la Leucina y del gen citocromo oxidasa II en 71 individuos colectados en Arkansas, Missisipi, Los Angeles y Florida, para determinar la existencia de variación genética dentro y entre los biotipos de *S. frugiperda* y encontraron niveles significantes de diferenciación genética entre todas las poblaciones de Arkansas y Florida y entre los estados en los cuales las poblaciones fueron agrupadas. Estos resultados se deben, probablemente, a que ambos biotipos presentaron diferente número de haplotipos y a su vez porque la frecuencia de estos haplotipos varió entre estados de este país. Dentro de estos biotipos se encontraron tres haplotipos dentro del biotipo de maíz (C1, C2 y C3) y cuatro haplotipos dentro del biotipo de arroz (R1, R2, R3 y R4), siendo los haplotipos C1 y R1 los más frecuentes. Los haplotipos C2 y C3 se presentaron solamente en Arkansas, el haplotipo R1 y R4 únicamente en Florida y el haplotipo R3 se encontró en Arkansas y Florida. Posteriormente, Nagoshi et al. (2007 a y b) publicaron dos artículos en los que los autores analizaron un fragmento de la región COI del ADN mitocondrial teniendo en cuenta poblaciones de Brasil, Texas y Florida. En 2007 a, Nagoshi et al., analizaron un fragmento de 937 pares de bases del gen COI de 73 individuos muestreados en cultivos de maíz, sorgo, pasto, amaranto, mijo, algodón y arroz en Florida, Texas y Brasil. Los autores demostraron que los 28 haplotipos encontrados en Brasil y Estados Unidos mostraban una asociación a plantas hospederas similar entre los dos países y una variabilidad en la distribución de los haplotipos que difería entre localidades y estacionalmente; apoyando la idea que el aislamiento geográfico entre estas poblaciones es el causante de la diferenciación genética y que el uso de plantas hospederas similares puede ser un carácter ancestral compartido entre ellos (Nagoshi et al. 2007 a). En el mismo año, Nagoshi et al. (2007 b) analizaron las secuencias de individuos pertenecientes al biotipo de maíz - encontradas en el estudio anterior - para determinar las variantes haplotípicas dentro del biotipo y poder comparar estos resultados con datos de poblaciones brasileras para evaluar la existencia de diferencias genéticas y de comportamiento. En el estudio se encontraron cuatro posibles subgrupos de haplotipos (CS-h1, CS-h2, CS-h3 y CS-h4) que presentaron diferencias marcadas en sus proporciones entre los dos países, ya que se encontró que el haplotipo CS-h4 era el más frecuente en Estado Unidos (CS-h4 > CS-h2 > CS-h1 >> CS-h3) y el haplotipo CS-h2 era el más

frecuente en Brasil (CS-h2 > CS-h1 > CS-h4), en donde el haplotipo CS-h3 no se encontró. Además los autores determinaron que los haplotipos no presentaron especificidad hacia las plantas hospederas analizadas (maíz, sorgo, algodón y pastos), como tampoco un efecto de las estaciones en su patrón de distribución, pero si indicaron que el intercambio genético que pueda existir entre estos dos países es tan limitado que no se produce homogenización entre las poblaciones de Brasil y Estados Unidos. La variabilidad en las proporciones y frecuencia de estos haplotipos en cada país, muestran que las poblaciones del biotipo de maíz tienen comportamientos diferentes en cuanto a su migración, lo cual es posible que ocurra con las poblaciones colombianas.

Debido a que la composición, distribución y frecuencia de haplotipos difiere entre Brasil y Estados Unidos y dado que la secuenciación del gen del citocromo oxidasa I –*COI* - ha sido útil en la identificación de haplotipos de *S. frugiperda*, el propósito de este estudio fue realizar una identificación molecular de los haplotipos de este insecto en 102 larvas colectadas en cuatro departamentos de Colombia durante 2006 a 2009 en cultivos de maíz, arroz, sorgo, pasto y algodón para comparar estas secuencias con los haplotipos de Estados Unidos obtenidos del GenBank con el fin de a) identificar las variantes de haplotipos en Colombia, b) determinar el nivel de diferenciación genética entre y dentro de estos dos países y c) obtener el polimorfismo nucleotídico y los estimadores del tamaño efectivo de la población para tratar la relevancia de la secuenciación de genes del ADN mitocondrial dentro de un sistema de monitoreo de la especie para mejorar el manejo integrado de plagas, con énfasis en este insecto, en el país.

## 2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. *Spodoptera frugiperda* como plaga

#### 2.1.1. Distribución

El gusano cogollero, *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuida) es una polilla que cubre la mayor parte del hemisferio occidental, con una distribución que se extiende desde el sur de Canadá, Florida, Louisiana, América central, el Caribe – pasando por Colombia, Brasil y Venezuela - hasta llegar al centro de Argentina (Pashley 1986, Ashley 1986). Según Luginbill (1928), esta especie tiene un origen tropical – subtropical en el hemisferio occidental. Es un insecto móvil y polífago que presenta preferencia por las gramíneas, tanto cultivadas como silvestres, dentro de las cuales se han registrado más de 80 especies de plantas de 23 familias como hospedantes de esta especie (Vélez 1997); que genera pérdidas en la mayoría de cultivos anuales (Ashley et al. 1987) y en países como Estados Unidos, es responsable por los daños causados en cultivos de maíz, sorgo y pastos – principalmente - (Sparks 1979, Pashley 1986) y esporádicamente en algodón y caña de azúcar (Pashley 1988a).

En Sur América, esta polilla es una de las principales plagas de maíz, arroz y algodón (Busato et al. 2004, Martinelli et al. 2007, Clark et al. 2007). En Colombia ha sido considerada una de las principales plagas del maíz (*Zea mays* L.) y secundaria en sorgo (*Sorghum* spp.), algodón (*Gossypium hirsutum*), hierbas y pastos (García et al. 2002). Su distribución geográfica a través del país es amplia y puede llegar a producir pérdidas hasta del 35% de la producción total en el cultivo de maíz (Torres y Cotes 2005).

*S. frugiperda* se registró por primera vez en Colombia en 1914 en el departamento de Antioquia (norte) y pocos años más tarde su distribución geográfica se extendió a los departamentos de Caldas (centro) y Valle del Cauca (oeste). Las larvas de este insecto se pueden encontrar en 38 cultivos, alimentándose fácilmente de hojas jóvenes y brotes de la mayoría de las plantas; por esta razón este insecto es llamado "gusano cogollero" (Bustillo y Posada 1986, García et al. 2002). La variedad de hospederos que tiene esta plaga y su amplia



distribución hace que sus poblaciones sean constantes durante el año (Barfield et al. 1980, García et al. 2002, Torres y Cotes 2005).

### **2.1.2. Biología**

El ciclo biológico de este insecto tiene una duración aproximada de 30 días y durante un año se pueden tener cerca de 12 generaciones. La hembra oviposita entre 800 y 1000 huevos, los cuales son depositados en el envés de la primera hoja de la planta hospedera; cuando emergen, las larvas se alimentan del follaje para poder pasar por sus seis instares larvales y un estado final de pupa (Caminera 2000, Sparks 1979). Los adultos de la especie se caracterizan por tener hábitos nocturnos con un aumento de su actividad en horas de la tarde (Sparks 1979).

La primera generación de la plaga en algunas especies cultivadas – como en maíz y sorgo - se presenta inmediatamente después de la emergencia de las plántulas y continúa durante la cosecha; las mayores densidades poblacionales se registran en la etapa de floración con dos o tres generaciones que sobrepasan los niveles de daño económico (Álvarez y García 1995, García et al. 2002).

### **2.1.3. Control**

El control de este insecto se ha realizado básicamente con insecticidas y, el incremento en el uso progresivo de los compuestos químicos ha generado resistencia sobre el genotipo de esta polilla aumentando sus densidades poblacionales (Pitre 1980). Se ha encontrado que *S. frugiperda* presenta resistencia a insecticidas que tienen como base compuestos como el DDT, ciclodienos, organofosforados, carbamatos y piretroides en países como Estados Unidos, México, Jamaica y Honduras (Morillo y Notz 2001, Pitre 1980). Además de la resistencia a compuestos químicos, es de importancia indicar que en países como Estados Unidos, los biotipos han mostrado diferentes comportamientos de resistencia a la endotoxina del *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac y a diferentes insecticidas (Adamczyk et al. 1997).

El manejo de esta polilla debe incluir un amplio conocimiento de las herramientas disponibles para minimizar satisfactoriamente las densidades poblacionales de este insecto; dentro de éstas herramientas se encuentra el control mecánico, en donde se recomienda realizar preparaciones adecuadas del terreno, selección apropiada de la semilla, un manejo conveniente de las malezas, destrucción de las socas de plantas hospederas, rotación de cultivos, y de ser posible, el uso de variedades tolerantes (Vélez 1997).

Los continuos esfuerzos para mejorar el control de la plaga, han aumentado el entendimiento de la biología y ecología del insecto, su comportamiento alimenticio, patrones de migración, diversidad de biotipos, distribución geográfica, fluctuaciones poblacionales y resistencia a insecticidas y a cultivos transgénicos (Meagher y Gallo-Meagher 2003, Nagoshi y Meagher 2004). Así mismo, ha aumentado el conocimiento de la ecología de algunos controladores biológicos naturales que pueden tener un efecto depredador o parasítico sobre *S. frugiperda* (Ashley 1979). Algunos de los géneros de insectos reportados como controladores de esta polilla en los diferentes estados de desarrollo pertenecen a las familias Braconidae (Ashley et al. 1987, Medina et al. 1988), Scelionidae (Álvarez y García 1995), Trichogrammatidae, Ichneumonidae, Vespidae y Coccinellidae, (Vélez 1997), algunos nemátodos de la familia Mermithidae (Vélez 1997 y dos cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Agudelo-Silva 1986, Gardner et al. 1984, Vélez 1997).

## **2.2. Biotipos y haplotipos de *Spodoptera frugiperda***

### **2.2.1. Biotipos y haplotipos**

Dentro de las categorías taxonómicas de las poblaciones que presentan un proceso de especiación, se pueden encontrar una gran variedad de términos utilizados por diferentes autores tales como biotipos, razas hospederas y especies (Diehl y Bush 1984, Pashley 1986, Drès y Mallet 2002, Coyne y Orr 2004). Drès y Mallet (2002) usan el término biotipo para referirse a una población con alguna diferenciación genética o fenotípica con respecto a otra población, la cual está en el mismo rango polimórfico de lo que taxonómicamente se define como especie. Los autores encuentran que esta diferenciación genética implica la diferenciación en genes de uno o dos marcadores moleculares y no es tan evidente si se compara con la

diferenciación genética en las razas hospederas, las cuales se diferencian en una gran cantidad de genes nucleares y mitocondriales. Además los autores aclaran que la asociación a hospedero no es tan específica ya que la población - que se encuentra en el proceso de diferenciación genética - puede tener más de un hospedero y a su vez, los biotipos no presentan un aislamiento reproductivo tan marcado como las razas asociadas a hospederos (Drès y Mallet 2002). Adicionalmente, Diehl y Bush (1984) definieron cinco categorías en las que un biotipo puede ser clasificado: fenocopias o ecomorfos no genéticos (cuando el mismo genotipo produce fenotipos diferentes bajo diferentes condiciones ambientales), polimorfismos genéticos (fenotipos discontinuos entre individuos con entrecruzamiento libre y que son el resultado de la variación alélica de una frecuencia más alta que no puede ser mantenida por mutación recurrente), razas geográficas (organismos similares en morfología, ecología o comportamiento los cuales comparten el mismo hábitat pero se encuentran en diferentes localidades), razas hospederas (población de especies que - reproductivamente - están parcialmente aisladas de otras poblaciones como consecuencia de la adaptación a un hospedero específico) y especies. Los organismos pueden ser clasificados en alguno de estos grupos, debido a que se encuentran en diferentes estados de divergencia evolutiva (Diehl y Bush 1984), tal como es el caso de *S. frugiperda*. Este insecto ha sido definido como “biotipo” por Pashley (1986) pero ubicado dentro del concepto de “raza hospedera” por Drès y Mallet (2002) dado que, las poblaciones divergentes de maíz y arroz de este insecto presentan barreras de aislamiento pre y postcigóticas (acorde a la definición de raza hospedera) pero la asociación a hospederos no es específica (acorde a la definición de biotipo), ya que el insecto puede tener más de un hospedero. Es importante mencionar que, aunque el insecto tenga características de una raza hospedera, el hecho de poseer más de un hospedero puede permitir que en este trabajo *S. frugiperda* sea categorizado como biotipo.

Dentro de los biotipos se pueden encontrar diferencias a nivel molecular que generan haplotipos (Lewter et al. 2006, Nagoshi et al. 2007 a y b). Un “haplotipo” es definido básicamente como una única forma genética que difiere de cualquier otra forma por variaciones en las posiciones individuales (al menos en un nucleótido) en una secuencia de ADN (Templeton 2006). Un biotipo de *S. frugiperda* puede presentar muchos haplotipos a nivel nuclear y mitocondrial y en este trabajo se decidió trabajar con secuencias de ADN mitocondrial, porque

este tipo de ADN no sufre recombinación y por lo tanto, la identificación de un haplotipo es única para cada uno de los polimorfismos genéticos posibles que se pueden generar para fragmento analizado (Hartl y Clark 1997). Por ello, la presencia de un haplotipo en uno o varios cultivos y localidades determinadas, indicaría que la población migró de un lugar a otro, tal como lo encontraron Nagoshi et al. (2007 a y b) en Estados Unidos y Brasil y como se evaluó en el presente trabajo por medio de la secuenciación de un fragmento del gen COI de larvas colectadas en cultivos de maíz, arroz, algodón, pasto y sorgo en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima, Valle del Cauca.

### **2.2.2. Fisiología de los biotipos de *Spodoptera frugiperda***

Dos biotipos, simpátricos o parapátricos, han sido identificados por sus preferencias de planta hospedera (Pashley 1986). El biotipo de arroz se ha asociado con arroz y pastos, mientras que el biotipo maíz predomina en maíz y algodón (McMichael y Prowell 1999). Los dos biotipos son casi idénticos morfológicamente; difieren en características tales como tasas de desarrollo, peso y sobrevivencia de larvas y pupas, entre otras (Pashley 1988a, Quisenberry y Whitford 1988, Whitford et al. 1988, Whitford et al. 1992).

El desarrollo de los individuos del biotipo de arroz es especialmente sensible al tipo de planta huésped (Pashley 1988a) debido, posiblemente, a la menor actividad de la enzima oxidasa en comparación con el biotipo de maíz (Veenstra et al. 1995). Además, hay evidencia de especificidad de planta hospedera para la oviposición (Whitford et al. 1988, Pashley et al. 1992) y un aparente aislamiento reproductivo en condiciones de laboratorio. Desde este punto de vista, Pashley y Martin (1987), observaron que cuando las hembras del biotipo maíz se cruzaban con machos del biotipo arroz, no se producía progenie y los espermatozoides no se transferían. Sin embargo y en contraste estos hallazgos, Whitford et al. (1988) obtuvieron una descendencia fértil en laboratorio en los cruces de ambos biotipos. Las diferencias en los resultados obtenidos por estos autores podría radicar en la edad de las colonias utilizadas en sus experimentos o en el origen geográfico de las muestras, pues Pashley y Martin (1987) trabajaron con muestras de Louisiana y Whitford et al. (1988) al realizar sus experimentos con poblaciones de Georgia y Mississippi.

### 2.2.3. Diferencias en la distribución

Dentro de algunos de los factores que pueden estar afectando los patrones anuales de distribución y las densidades poblacionales de este insecto se encuentran los factores físicos ambientales, disponibilidad de plantas hospederas y mortalidad natural, entre otros (Ashley 1986). En los Estados Unidos, los biotipos de *S. frugiperda* se han detectado en las regiones donde no es probable sobrevivir por el invierno, debido a que estos insectos tienen la capacidad de migrar desde el norte del país a Florida durante la estación fría (Sparks 1979, Wiseman y Davis 1979, Ashley 1986, Nagoshi y Meagher 2004). Estudios anteriores llevados a cabo en Louisiana por Pashley (1988b) han demostrado que el biotipo de maíz se detectó por primera vez en primavera y alcanzó un máximo densidad poblacional a principios y mediados del verano, coincidiendo con la maduración de la cosecha local de maíz. En contraste, la población del biotipo de arroz no muestra una densidad poblacional considerable sino hasta finales de verano, un período en que la población del biotipo de maíz está casi ausente (Pashley et al. 1992). Con base en estos resultados, los autores afirmaron que el tiempo y/o magnitud de la migración de este insecto puede ser diferencial entre los biotipos. Contrario a estos resultados, Nagoshi y Meagher (2004), encontraron que los dos biotipos tuvieron la misma disminución en la densidad poblacional de julio a octubre; sin embargo también encontraron que la disminución poblacional del biotipo de arroz comienza antes que la disminución poblacional del biotipo de maíz. Los autores consideran que esta disminución de la población de los biotipos podría deberse a algo más general del ambiente o condiciones biológicas, más que a la coordinación entre planta huésped y los ciclos de vida de los biotipos de *S. frugiperda*. De hecho, Pair et al. (1987), observaron que los cambios en las densidades poblacionales del insecto varían dependiendo la calidad y cantidad de plantas hospederas, lo cual depende del efecto del ciclo estacional húmedo – seco del ambiente en el que se realizó el estudio, más que de una interacción entre el insecto y sus plantas hospederas (Pair et al. 1987).

Los resultados de estudios llevados a cabo por diferentes autores acerca de las diferencias en la dispersión del insecto, pueden sugerir dos aspectos a tener en cuenta: a) que la divergencia genética entre los dos biotipos precedió el movimiento de *S. frugiperda* al Norte y el Sur de América o b) que existe una considerable interacción entre estas poblaciones geográficamente distantes a través de los grandes movimientos de

dispersión. Estudios genéticos previos han apoyado esta última idea, indicando la presencia de algún movimiento entre las poblaciones de la región del Caribe y América del Norte (Pashley 1986, Nagoshi et al. 2007 b, Nagoshi et al. 2008). Por otro lado, las evidencias de diferencias fisiológicas entre las poblaciones de los biotipos en diferentes zonas, son consistentes con el aislamiento reproductivo causado por la separación geográfica y los estudios que comparan la susceptibilidad a insecticidas han demostrado que las poblaciones de *S. frugiperda* pueden llegar a diferenciarse. Tal es el caso del estudio realizado por Young (1979), en donde las poblaciones del lado este del río Mississippi son significativamente diferentes a las poblaciones que se encuentran en el lado occidental del río, como resultado de la presión de selección por el uso de compuestos químicos.

#### **2.2.4. Diferencias moleculares en los biotipos**

Aunque se puedan encontrar diferencias a nivel fisiológico o reproductivo dentro de los biotipos, las similitudes en características a nivel morfológico hacen imposible su separación (Nagoshi y Meagher 2003 a y b). Sin embargo, los dos biotipos difieren en varias características a nivel molecular que permiten su diferenciación de manera rápida y efectiva. Dentro de estas características, se pueden incluir las variaciones en aloenzimas electroforéticas, en particular las esterasas (Pashley 1986), polimorfismos de ADN mitocondrial (Lu y Adang 1996, Levy et al. 2002, Meagher y Gallo-Meagher 2003, Nagoshi y Meagher 2004, Meagher y Nagoshi 2004, Nagoshi et al. 2006, Nagoshi et al. 2007a, 2007b), RFLP's (Lu et al. 1992), AFLP's (McMichael y Prowell 1999) y las diferencias en las secuencias de ADN repetitivo (Lu et al. 1994).

En la región central de Colombia (Tolima), se han utilizado dos marcadores genéticos para distinguir los dos biotipos (Vélez-Arango et al. 2008). El primero de los marcadores diagnóstico está determinado por un patrón de ADN mitocondrial generado por la digestión de la enzima *MspI*, la cual presenta diferencias fácilmente observables en el tamaño molecular de los fragmentos que forman los dos biotipos, comportándose como un indicador consistente en la identidad de los biotipos. Los autores determinaron que esta identidad se presenta cuando, después de la digestión sobre el ADN mitocondrial, con la enzima *MspI* se generan dos posibles resultados: una sola banda de 569 pb, indicando la ausencia de cortes enzimáticos sobre el fragmento del gen

mitocondrial, lo cual es característica típica del biotipo de arroz, o la visualización de dos bandas de 497 pb y 72 pb, indicando la acción enzimática sobre el fragmento producida por la digestión de la enzima *MspI*, lo cual es exclusivo del biotipo de maíz (Levy et al. 2002, Nagoshi y Meagher 2003 a y b, Vélez-Arango et al. 2008). El segundo marcador específico de biotipos es una secuencia repetida de ADN nuclear, denominado FR (Fall Armyworm Rice Strain). La secuencia FR de 189 pb es abundante en las hembras del biotipo arroz y está organizada en tándem; en los machos de este biotipo aunque se encuentra presente, hay una disminución de cerca de 120 copias de esta unidad. Este marcador está presente en el biotipo de arroz y poco frecuente en el biotipo de maíz, produciendo entre 0 y 3 bandas, lo que indica la ausencia de grandes grupos de este tándem en este biotipo (Nagoshi y Meagher 2003 a). Respecto a la abundancia de la región FR, Vélez-Arango (2009) comprobó que la presencia de ésta en machos y hembras de *S. frugiperda* fue igual para los dos sexos, demostrando que este gen no se comporta como un gen ligado al cromosoma X.

Los datos de la identificación de los biotipos en Colombia obtenidos por Vélez-Arango (2009), han demostrado que los individuos del biotipo de maíz se encuentran más abundantemente en maíz, algodón y sorgo, mientras que los individuos del biotipo de arroz son encontrados más frecuentemente en los cultivos de arroz, seguido por el cultivo de maíz, algodón y sorgo, pero en proporciones muy bajas. Así mismo, la autora encontró que la combinación del marcador mitocondrial (*COI*) y el marcador nuclear (FR) es útil para la identificación de los híbridos que generan estos dos biotipos. El análisis puede evidenciar híbridos tipo positivo-positivo (++) cuando se generan productos de digestión con la enzima *MspI* en el gen mitocondrial y además, presenta amplificaciones mayores a 500 bp con los cebadores de la región FR o puede evidenciar híbridos tipo negativo-negativo (- -) cuando no se presenta digestión con la enzima *MspI* a nivel mitocondrial y los productos de amplificación son menores a 500 pb con los cebadores de la región FR (Vélez-Arango et al. 2008, Vélez-Arango 2009). Estos resultados corroboran lo encontrado por Nagoshi y Meagher (2003 a y b), quienes hallaron este tipo de hibridación al realizar cruces en laboratorio de hembras del biotipo de maíz con machos del biotipo de arroz y viceversa, obteniendo una progenie F1 y F2 que fue genotipificada con la enzima *MspI* y la región nuclear FR. Además de la presencia de híbridos de *S. frugiperda* en el Tolima, Vélez-Arango et al. (2008), pudieron determinar que no existen diferencias de la distribución de éstos híbridos

respecto a la planta hospedera, ya que aparentemente las hembras híbridas no tienen ninguna preferencia por algún hospedero en particular al momento de la oviposición, sugiriendo fuertes comportamientos preferenciales de hembras de biotipos puros en comparación con las hembras híbridas o a una diferencia de supervivencia de las larvas de cada biotipo al estar en la planta huésped incorrecta (Vélez-Arango et al. 2008).

### 2.2.5. Haplotipos de *Spodoptera frugiperda*

Los estudios realizados para encontrar y analizar los patrones de distribución de haplotipos de *S. frugiperda* han sido realizados mediante secuencias de genes mitocondriales (COI, COII, ND1) y nucleares (ITS-1) (Lewter et al. 2006, Nagoshi et al. 2006, Nagoshi et al. 2007 a y b, Nagoshi et al. 2008). Lewter et al. (2006), trabajaron con 71 individuos de poblaciones diferentes de Estados Unidos (Arkansas, Florida, Los Angeles y Mississippi), y analizaron las secuencias de un fragmento de 608 pb que incluía 222 pb del gen mitocondrial *COI*, 66 pb del tRNA-leu y 318 pb del gen mitocondrial *COII*. Los autores encontraron siete haplotipos (con números de acceso a GenBank AY714298, AY714299, AY714300, AY714301, AY714302, AY714303, AY714304), tres haplotipos dentro del biotipo de maíz (C1, C2 y C3) y cuatro haplotipos del biotipo de arroz (R1, R2, R3 y R4) y encontraron nueve sitios variables entre estos. Los haplotipos C1 y R1 fueron los más comunes en todas las poblaciones donde cada biotipo del insecto fue muestreado. Los haplotipos C2 y C3 solo se encontraron en Arkansas, los haplotipos R1 y R4 fueron únicos de la Florida y el haplotipo R3 se presentó en Arkansas y Florida. En este trabajo, los autores encontraron que las poblaciones de biotipos de Arkansas y Florida estaban estructuradas genéticamente ( $\Theta_{ST} = 0.493$ ,  $P < 0.001$ ) y que al agrupar las poblaciones para determinar la diferenciación entre estados también se encuentra una estructuración genética ( $\Theta_{CT} = 0.387$ ,  $P < 0.005$ ), debido a que los biotipos presentaron diferente número de haplotipos y a que su frecuencia varió entre los diferentes estados evaluados de este país. En el 2007, Nagoshi et al., estudiaron el gen mitocondrial *COI* para identificar y comparar los haplotipos presentes en Brasil con aquellos encontrados en Texas y Florida para determinar si los haplotipos presentes en Brasil mostraban tendencias comparables en la distribución de la planta hospedera respecto a los haplotipos de los dos biotipos presentes en Estados Unidos. En este estudio, los autores identificaron y compararon 73 secuencias de un fragmento del gen *COI* de 937 pb en poblaciones



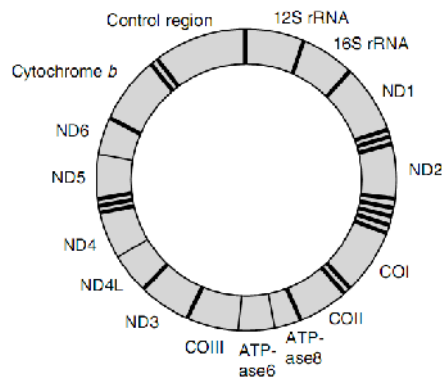
de Texas, Florida y Brasil; estas secuencias fueron divididas en dos grupos asociados con los biotipos que fueron definidos por 19 polimorfismos nucleotídicos (171 (C/T), 207 (A/T), 258 (T/C), 489 (C/T), 564 (C/T), 570 (T/C), 600 (T/C), 634 (C/T), 663 (A/T), 738 (G/A), 759 (C/T), 768 (T/C), 816 (T/C), 823 (T/C), 912 (T/C), 987 (C/T), 1044 (A/T)). Además, los autores encontraron 24 sitios adicionales que no fueron específicos para los biotipos pero que -en combinación con las variaciones de los sitios específicos de los biotipos- permitieron la identificación de 28 haplotipos diferentes: 14 en el biotipo de arroz (CS1 a CS14) y 14 en el biotipo de maíz (RS1 a RS14) dentro de los cuales se encontró variabilidad en la distribución entre las localidades, sin embargo, los haplotipos CS1 y RS1 fueron los más frecuentes dentro de cada biotipo. Para el biotipo de arroz, el haplotipo RS-1 estuvo presente en las tres localidades, el haplotipo RS-2 se encontró en Texas y Brasil, los haplotipos RS-3 a RS-8 fueron únicos para Florida, el haplotipo RS-9 fue único para Texas y los haplotipos RS-10 a RS-14 fueron únicos para Brasil. Por otro lado, para el biotipo de maíz, el haplotipo CS-1 estuvo presente en las tres localidades, los haplotipos CS-2 y CS-3 se presentaron en Texas y Brasil, los haplotipos CS-4 a CS-6 fueron únicos de Florida, los haplotipos CS-7 y CS-8 se encontraron en Texas y los haplotipos CS-9 a CS-14 fueron únicos de Brasil. Cabe mencionar que la mayoría de los haplotipos estuvieron representados por un sólo espécimen (22 de 28 haplotipos). En este trabajo los autores concluyeron que las diferencias genéticas presentadas entre Brasil y Estados Unidos se deben a un aislamiento geográfico entre estos dos países. Este aislamiento está soportado por la existencia de polimorfismos genéticos específicos de las localidades, en donde el sitio 633 está presente en 1/3 de la población del biotipo de arroz de la Florida y ausente en Brasil y Texas y los sitios 666 y 717 fueron encontrados en 2/9 y 1/3, respectivamente, dentro del biotipo de maíz, únicamente en Texas. El mismo año, Nagoshi et al. (2007 b) analizaron las secuencias de individuos pertenecientes al biotipo de maíz - encontradas en el estudio anterior (Nagoshi et al. 2007 a) - para determinar las variantes haplotípicas dentro de este biotipo y poder comparar los resultados con datos de poblaciones brasileñas para evaluar la existencia de diferencias genéticas y de comportamiento. En este estudio, los autores localizaron siete sitios específicos adicionales, dentro de los cuales cinco estuvieron en un 99% fijos en cada biotipo (1125, 1176, 1182, 1197 y 1216) el polimorfismo nucleotídico estuvo fijo >99%, convirtiéndolos en marcadores diagnóstico útiles en la identificación de los biotipos. De estos cinco sitios, los

autores resaltan la importancia del polimorfismo encontrado en el sitio 1182, resultante como sitio de restricción de la enzima *EcoRV* y que está presente en el biotipo arroz y ausente en el biotipo de maíz, ya que permitiría la identificación de los biotipos sin secuenciar el ADN. Los otros dos sitios estuvieron fijos en el biotipo de arroz y mostraron un alto polimorfismo dentro del biotipo de maíz. En el sitio 1164, todas las muestras del biotipo arroz tenían timina, las muestras del biotipo maíz de Florida tenían guanina o adenina y las de Brasil tenían adenina. En el sitio 1287, todas las muestras del biotipo de maíz de Florida tenía guanina y todas las de Brasil tenían adenina. Debido al polimorfismo encontrado en este sitio, se generaron cuatro posibles subgrupos de haplotipos dentro del biotipo de maíz: CS-h1 (A en el sitio 1164 y A en el sitio 1287), CS-h2 (A en el sitio 1164 y G en el sitio 1287), CS-h3 (G en el sitio 1164 y A en el sitio 1287) y CS-h4 (G en el sitio 1164 y G en el sitio 1287). Los autores encontraron que estos haplotipos presentaron diferencias marcadas en sus proporciones entre los dos países, ya que el haplotipo CS-h4 era el más frecuente en Estado Unidos (CS-h4 > CS-h2 > CS-h1 >> CS-h3) y el haplotipo CS-h2 era el más frecuente en Brasil, en donde el haplotipo CS-h3 no se encontró (CS-h2 > CS-h1 > CS-h4). Además los autores determinaron que los patrones de distribución de los haplotipos no se ven afectados por la especificidad hacia las plantas hospederas (maíz, sorgo, algodón y pastos), como tampoco por las estaciones en las que son muestreados los individuos; sin embargo si indicaron que el intercambio genético que pueda existir entre estos dos países es tan limitado que no se produce homogenización entre las poblaciones de Brasil y Estados Unidos, debido a las distancias geográficas que separan las poblaciones y a posibles diferencias en las feromonas que son utilizadas para el apareamiento (Nagoshi et al. 2007 b).

A través de este tipo de análisis, Nagoshi et al. (2007 a, b) afirman que es posible realizar estudios más precisos y detallados de la distribución de los haplotipos de este insecto en diferentes países en donde se presente *S. frugiperda* como plaga y por lo tanto analizar su comportamiento de migración. Además como la variabilidad en las proporciones y frecuencia de los haplotipos dentro de los biotipos, es mediada por aislamiento geográfico entre los países, es importante establecer cuál es la frecuencia y distribución de estos haplotipos en nuestro país para determinar si existen diferencias a nivel de comportamiento y/o genéticas entre Colombia y Estados Unidos.

### 2.3. ADN mitocondrial y su evolución

El ADN mitocondrial es un material genético circular cerrado de doble cadena que se localiza en el interior de las mitocondrias celulares. Este genoma es de aproximadamente 15 000 a 17 000 pares de bases y codifica una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales (Ballard y Whitlock 2004). Las proteínas restantes del ADN mitocondrial son codificadas por el ADN nuclear (nADN). Las dos cadenas del ADN mitocondrial reciben el nombre de cadena L (ligera o light) y cadena H (pesada o heavy) atendiendo a su coeficiente de sedimentación. La mayor parte de las secuencias codificantes (28 genes) se encuentran en la cadena H. Estas secuencias se distribuyen en esta cadena de forma muy compactada, llegando incluso a solaparse. El ADN mitocondrial contiene información de 38 genes: 2rRNA (12S y 16S), 22tRNA y 13 genes estructurales, los cuales codifican diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa: a) Tres subunidades de la citocromo c-oxidasa (*COI*, *II* y *III*) (Complejo IV); b) Una subunidad de la *citocromo b* (*cyt b*) óxido-reductasa (complejo III); c) Siete subunidades ND (1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6) del complejo NADH deshidrogenasa (Complejo I) y d) 2 subunidades (6 y 8) del complejo ATP sintetasa (Complejo V) (Fig. 1) (Ballard y Whitlock 2004, Freeland 2005).



**Fig. 1.** Organización de genes del ADN mitocondrial. Las bandas representan 22 RNAs de transferencia. (Tomado de Freeland 2005).

El ADN mitocondrial se transmite – en la mayoría de animales - de forma no mendeliana por línea materna. Aunque machos y hembras lo tienen, son únicamente las hembras quienes lo transmiten a la descendencia

(Hurst y Jiggins 2005) y por eso este tipo de ADN no sufre recombinación, convirtiéndola en una molécula ideal para analizar filogenias, ya que permite analizar relaciones ancestro-descendiente en las cuales se evalúan similitudes genéticas entre taxa ancestrales y descendientes, debido a que éstos últimos han sufrido de mutaciones neutras (Hartl y Clark 1997) que pueden ser evaluadas a través de la coalescencia (Freeland 2005)

Es importante recalcar que, por su herencia materna, este ADN provee la mitad de la información genética de una población y por lo tanto no se ajusta a los modelos sobre estructura genética de poblaciones dados por Wright, ya que éste analiza genes nucleares y asume poblaciones naturales diploides ( $2N$ ) (Hartl y Clark 1997, Freeland 2005). Sin embargo, es un tipo de ADN muy útil para evaluar efectos sobre el tamaño efectivo de una población ya que al tener la mitad del tamaño efectivo del ADN nuclear, su tamaño puede ser más fácilmente afectado por procesos naturales como los efectos de fragmentación ya que es relativamente más sensible a efectos demográficos - como los cuellos de botella, aun cuando la población resulte con menos sobrevivientes - por ende menos haplotipos mitocondriales - tiene la facilidad de recuperarse rápidamente, lo que permite obtener respuestas sobre la población a menor plazo (Freeland 2005). Además del papel que desempeña el genoma mitocondrial en la producción de energía celular, su tasa de evolución es mucho más rápida - hasta 10 veces- que la del genoma nuclear (Ballard y Whitlock 2004, Hurst y Jiggins 2005). Esta característica de rápida evolución sumada a la herencia materna, recombinación limitada y gran robustez, hacen que el ADN mitocondrial sea un marcador ideal para la solución de muchas preguntas a nivel de especie (Avice et al. 1987). Adicionalmente, posee una característica importante para realizar diferentes deducciones: neutralidad. Las inferencias realizadas a partir de los estudios de ADN mitocondrial parten del supuesto de que este ADN sigue un modelo de evolución neutral. Este tipo de modelo postula que la mayor parte de las mutaciones son selectivamente neutras y su fijación se produce aleatoriamente por deriva genética. Las mutaciones neutras son mantenidas en una población mediante el equilibrio entre mutación y deriva, de manera que el polimorfismo en una población es el estado intermedio previo a la fijación. Por ende, bajo condiciones neutras la cantidad de polimorfismo de una población es directamente proporcional al producto del tamaño efectivo de la población por la tasa de mutación (Ballard y Whitlock 2004).

Por otra parte, existen algunos inconvenientes que se deben tener en cuenta al trabajar con ADN mitocondrial, entre ellos la integración de este tipo de ADN con el genoma nuclear, donde evolucionan como pseudogenes nucleares o numts (Nuclear mitochondrial DNA-like sequences) a un ritmo más lento que sus homólogos mitocondriales (Willams y Knowlton 2001, Ballard y Whitlock 2004). Aunque estos fragmentos se han descrito en varios organismos, aun no se tiene la certeza del mecanismo mediante el cual se producen estas inserciones, así como las consecuencias de las mismas. Sin embargo, son de importancia debido a que la presencia de estos fragmentos dificulta la amplificación de secuencias exclusivamente mitocondriales y por ende las conclusiones pueden ser descritas de manera errónea (Ballard y Whitlock 2004, Frézal y Leblois 2008).

A nivel de polimorfismos mitocondriales, los cuales son en su mayoría sustituciones puntuales, es importante resaltar que la determinación de este polimorfismo que permite determinar diferentes haplotipos dentro de una población, debería realizarse a partir del genoma completo mitocondrial. Sin embargo, a nivel de la población, estos enfoques no resultan prácticos debido al elevado número de muestras que puedan existir y a la presencia de regiones del ADN mitocondrial con poca variabilidad. Por tanto, es de utilidad definir los haplotipos mitocondriales mediante el estudio de las regiones más variables – y por tanto más informativas– en un número elevado de individuos (Awise et al. 1987).

#### **2.4. Gen *citocromo oxidasa I* – *COI* - como marcador molecular**

Dentro de las subunidades del ADN mitocondrial, el gen *citocromo oxidasa I* (*COI*), posee varias características que lo convierten en uno de los mejores marcadores moleculares disponibles para estudios relacionados con la evolución (Awise et al. 1987). Dentro de éstas, se encuentra su tamaño y estructura, las cuales son características conservadas en la mayoría de organismos que se han estudiado (Saraste 1990); la longitud del gen que se presenta como la mayor dentro de las tres subunidades del *citocromo oxidasa*, que permite amplificar y secuenciar muchos más caracteres o nucleótidos; la presencia de extremos altamente conservados que permite el uso de cebadores universales para generar comparaciones y conclusiones robustas en diferentes tipos de análisis (Folmer et al. 1994, Zhang y Hewitt 1997). Además de lo anterior, el gen *COI* posee un rango

amplio de señales filogenéticas, particularmente en la tercera posición de las trietas de codones, lo que genera que la tasa de evolución molecular sea casi tres veces mayor comparada con otros genes tales como 12S o 16S tal que permite la discriminación no solo de especies cercanamente relacionada, sino además de grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Knowlton y Weigh 1998). Así mismo, al poseer una tasa de mutación más rápida, comparada con otros genes mitocondriales tales como el ND4 (Freeland 2005), permite el análisis de polimorfismos nucleotídicos dentro de una misma especie a diferencia del ND4 que es utilizado para analizar diferencias nucleotídicas a nivel de género o familia. Por estas razones, este gen es usado en esta investigación, en donde el objetivo es encontrar las variantes haplotípicas de *S. frugiperda*.

## 2.5. Análisis de migración, dispersión y flujo genético

La migración es el movimiento de poblaciones de una localidad a otra, lo cual muchas veces implica que exista flujo genético entre los individuos migrantes y los individuos locales. La dispersión, es simplemente, una medida del movimiento de individuos en la naturaleza y se puede determinar también por medio del uso de métodos de marcaje –recaptura. Ambas son medidas diferentes del movimiento de individuos entre localidades, ya que el primero implica toda una población, y el real flujo de genes, mientras que el segundo, mide la capacidad que tiene un individuo en desplazarse (Mallet 2001).

Por otro lado, el flujo genético hace referencia al flujo de genes entre poblaciones, y ha sido determinado por Wright a partir de los estadísticos  $F$ , particularmente de una relación entre el número de migrantes y el  $F_{ST}$ , el cual para los genes nucleares se calcula como:

$$F_{ST} = 1 / (1 + 4Nm),$$

donde  $Nm$  es el número de migrantes (Wright 1951, Hartl y Clark 1997). Para los genes mitocondriales, Hudson et al. (1992), definieron éste estadístico como:

$$F_{ST} = 1 / (1 + 2Nm)$$

La migración se puede analizar con estudios de movimientos poblacionales en individuos, que muchas veces se ven marcados por las estaciones, tal y como se presenta en algunos insectos como la mariposa monarca *Danaus plexipus arippus* (Lepidoptera: Danaidae), la cual se mueven desde Canadá y Estados Unidos hacia México (Masters et al. 1988). Por ello se analiza la dispersión como una medida directa del movimiento de un individuo, mientras que el flujo genético, es una medida indirecta de la capacidad que tienen los individuos de desplazarse y producir prole (Mallet 2001). Cabe notar que en este trabajo cuando se discute sobre la migración de *S. frugiperda*, en realidad se hace referencia al flujo genético entre sus poblaciones.

## 2.6. Principios de análisis y métodos de secuencias de ADN

Debido a que las secuencias de ADN presentan diferentes tipos de sustitución nucleotídica, los modelos de este tipo de sustitución son utilizados en muchos análisis para describir diferentes probabilidades de cambios entre una base nucleotídica y otra (Posada y Crandall, 2001). Por esto, es importante el uso de pruebas estadísticas para determinar el mejor modelo que se ajuste a un grupo de secuencias particular (Posada y Crandall, 2001). Una de estas pruebas para la selección de un modelo es la comparación simultánea de todos los modelos posibles a través de dos criterios importantes: el criterio de información Akaike (AIC) y el criterio de información Bayesiano (BIC) (Posada y Crandall, 2001).

El criterio de información Akaike es una medida de bondad de ajuste de un modelo estadístico estimado y se basa en el concepto de entropía. Este ofrece una medida relativa de la pérdida de información cuando un modelo se utiliza para describir la realidad, se puede decir que genera un equilibrio entre el sesgo y la varianza de la construcción del modelo. La metodología de este criterio trata de encontrar el modelo que mejor se ajuste a un grupo de datos con un mínimo de parámetros libres; este será aquel que tenga el menor valor de AIC (Akaike 1974).

El criterio AIC se define como:

$$AIC = 2k - 2 \ln (L),$$

donde  $k$  es el número de parámetros en el modelo estadístico y  $L$  es el valor maximizado de la función de verosimilitud para el modelo estimado (Akaike 1974).

El criterio de información Bayesiano, también es un criterio para la selección AIC y de igual manera, cuando el número de parámetros que se tienen en cuenta se aumenta, la penalización también aumenta. A diferencia entre los dos criterios radica en el valor de penalización que se le da al modelo cuando tienen muchos parámetros es mayor en el criterio Bayesiano (Schwarz1978).

El criterio BIC es:

$$- 2 * \ln p (x | k) \approx BIC = - 2 * \ln L + k \ln (n),$$

donde  $x$  son los datos observados;  $n$  es el número de puntos de datos en  $x$ , el número de observaciones, o el tamaño de la muestra;  $k$  es el número de parámetros libres a estimar;  $p (x | k)$  es la probabilidad de los datos observados, dado el número de parámetros y  $L$  es el valor máximo de la función de probabilidad para el modelo estimado (Schwarz1978).

Dentro de los modelos más usados para el análisis de diferentes datos se encuentra el modelo más simple de JC69 (Jukes y Cantor 1969). Este asume igual frecuencia de bases,  $\pi_T = \pi_C = \pi_A = \pi_G = 1/4$ , y una única tasa de sustitución para todos los nucleótidos, en donde, por ejemplo una mutación de A - C tiene la misma tasa que una mutación A - G o de A - T y además, parte del supuesto que las mutaciones ocurren al azar. La matriz según la frecuencia de las bases es:

	A	T	C	G
A	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$
T	$\alpha$	-	$\alpha$	$\alpha$
C	$\alpha$	$\alpha$	-	$\alpha$
G	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	-



En este modelo la tasa de sustitución para cada nucleótido es 3 veces  $\alpha$  (la suma de las tres posibles mutaciones de cada nucleótido) por unidad de tiempo. Para determinar la distancia entre dos secuencias, se tienen en cuenta:

$$d = -\frac{3}{4} \ln(1 - \frac{4}{3} p),$$

donde  $p$  es la proporción de sitios que difieren entre las dos secuencias.

El modelo Kimura -2- parámetros (Kimura 1980) al igual que el modelo de JC69, también asume que las mutaciones ocurren aleatoriamente pero tiene en cuenta que la tasa de transiciones (purina por purina y/o pirimidina por pirimidina) es mucho mayor que la tasa de transversiones (purina por pirimidina) y por ende el modelo incluye un parámetro para transiciones ( $\alpha$ ) y otro para las transversiones ( $\beta$ ). La matriz para este modelo es:

	A	T	C	G
A	-	$\beta$	$\beta$	$\alpha$
T	$\beta$	-	$\alpha$	$\beta$
C	$\beta$	$\alpha$	-	$\beta$
G	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	-

En este modelo cada nucleótido tiene una tasa de sustitución transicional ( $\alpha$ ) por unidad de tiempo y dos tasas de sustitución transversional ( $\beta$ ) por unidad de tiempo. La distancia en este modelo está dada por:

$$d = -\frac{1}{2} \ln(1 - 2p - q) - \frac{1}{4} \ln(1 - 2q),$$

donde  $p$  es la proporción de sitios que muestra diferencias en las transiciones y  $q$  es la proporción de sitios que muestra diferencias en las transversiones.

El modelo HKY o Hasegawa, Kishino y Yano (Hasegawa et al. 1985) supone un tiempo de proceso reversible, una distribución no uniforme de los nucleótidos ( $\pi_T \neq \pi_C \neq \pi_A \neq \pi_G$ ) y diferentes tasas de evolución para las transiciones y transversiones, por tanto, los parámetros requeridos en su función son la relación transición/transversión ( $T_s/T_v$ ) y las frecuencias de las bases, las cuales se aplican a la matriz:

	A	T	C	G
A	-	$\beta g_T$	$\beta g_C$	$\alpha g_G$
T	$\beta g_A$	-	$\alpha g_C$	$\beta g_G$
C	$\beta g_A$	$\alpha g_T$	-	$\beta g_G$
G	$\alpha g_A$	$\beta g_T$	$\beta g_C$	-

El modelo GTR (Generalized Time-Reversible) (Yang 1994), es el modelo neutral más general e independiente que permite seis diferentes parámetros de tasa de sustitución y es el modelo más general que todavía es consistente con el requerimiento de ser reversible. Los seis parámetros son las tasas relativas de cada tipo de sustitución, es decir, A por C, A por G, A por T, C por G, C por T y G por T. Como este es un proceso tiempo reversible, el parámetro de un tipo de sustitución (A por T) es asumido como el mismo que el reverso (T por A).

	A	T	C	G
A	-	$ag_T$	$bg_C$	$cg_G$
T	$ag_A$	-	$dg_C$	$eg_G$
C	$bg_A$	$dg_T$	-	$fg_G$
G	$cg_A$	$eg_T$	$fg_C$	-

En general, las diferencias entre los algunos de los modelos de sustitución nucleotídica radica, por lo tanto, en el grado de complejidad de cada una de sus funciones (ecuaciones), las cuales involucran diferentes estimadores como los son la tasa de cambio nucleotídica, la tasa de reversión de mutaciones y la frecuencia con la que se encuentra un haplotipo (secuencia) en todas las secuencias analizadas (Nei y Kummar 2000).

Como es claro que los modelos de sustitución tienen un papel importante dentro de la filogenética molecular y obtener el modelo apropiado es esencial para la robustez de los resultados, cabe denotar que existen actualmente programas especializados en procesar la información y generar, con una buena precisión, el modelo que mejor modelo que se ajusta a los datos. Dentro de estos programas, Modeltest o jModelTest, poseen varias características que los hacen programas más exactos al momento de escoger modelos de sustitución nucleotídica (Posada y Crandall 1998). Dentro de éstas características se encuentran: a) permiten definir el modelo dentro de un grupo de modelos candidatos, b) implementa – según los requisitos del

investigador – pruebas de ratio de verosimilitud jerárquicas (hLRTs por sus siglas en inglés “ hierarchical likelihood ratio test) y pruebas de ratio de verosimilitud dinámica (dLRTs por sus siglas en inglés “ dynamic likelihood ratio test), c) provee un rango de modelos acorde a los criterios AIC y BIC, d) calcula la importancia relativa de cada parámetro y e) calcula las estimaciones medias de estos modelos (Posada y Buckley 2004, Posada 2008).

Por otra parte, la estructura genética de las poblaciones se ha venido estudiando en términos de estadísticos-F desde que Wright (1951) propusiera medir la desviación de las frecuencias genotípicas mediante los parámetros  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$  para realizar estudios microevolutivos de una especie y así determinar si sus poblaciones están genéticamente estructuradas debido al efecto de diferentes fuerzas evolutivas entre las que se encuentran la selección natural y la mutación, generando diversificación entre las poblaciones o por el contrario, flujo genético y deriva produciendo homogeneidad entre las poblaciones (Hartl y Clark 1997, Heedrick 2004). Es importante mencionar que el método denominado Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA), permite realizar la estimación de los estadísticos F haciendo uso de la información molecular presente en las poblaciones que forman la muestra (Excoffier et al., 1992). Este análisis utiliza el hecho de que una suma de cuadrados convencional (SS) puede escribirse como la suma de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de observaciones y por esto, es posible construir un análisis jerárquico de la varianza molecular directamente a partir de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de datos moleculares (Li, 1976).

Partiendo de un análisis de varianza ANOVA (Tabla 1), se puede analizar los datos moleculares y partiendo de los componentes de varianza se pueden calcular los estadísticos  $\Phi$  (phi), los cuales resumen el grado de diferenciación de la población y son análogos a los estadísticos F, debido a que se tiene en cuenta el componente de diferenciación genética entre poblaciones (similar al estadístico  $F_{ST}$ ), dentro de poblaciones (similar al estadístico  $F_{IS}$ ) y el componente de diferenciación total (similar al estadístico  $F_{IT}$ ) (Tabla 2) (Excoffier et al. 1992, Excoffier 2001).

**Tabla 1.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA),  $P$  es el número de poblaciones muestreadas,  $N_i$  es el tamaño de cada muestra y  $N = \sum N_i$  es el número total de individuos.  $gl$ : grados de libertad,  $SSD$ : desviación de la suma de cuadrados,  $MSD$ : media de la desviación de los cuadrados,  $E(MSD)$ : media esperada de la desviación de los cuadrados.

FUENTE DE VARIACIÓN	gl	SSD	MSD	E(MSD)
Entre poblaciones	$P - 1$	$SSD(AP)$	$SSD(AP)/(P - 1)$	$\sigma_w^2 + n' \sigma_a^2$
Entre genes dentro de poblaciones	$2N - P$	$SSD(WP)$	$SSD(WP)/(2N - P)$	$\sigma_w^2$
<b>Total</b>	$2N - 1$	$SSD(T)$		

**Tabla 2.** Componentes de varianza y su correspondientes estadísticos  $\Phi$

VARIANZA	ESTADÍSTICOS $\Phi$
$\sigma^2_a = F_{ST} \sigma^2$	$F_{IT} = (\sigma^2_a + \sigma^2_b) / \sigma^2$
$\sigma^2_b = (F_{IT} - F_{ST}) \sigma^2$	$F_{ST} = \sigma^2_a / \sigma^2$
$\sigma^2_w = (1 - F_{IT}) \sigma^2$	$F_{IT} = \sigma^2_b / (\sigma^2_b + \sigma^2_w)$
$\sigma^2 = \sigma^2_w + \sigma^2_b + \sigma^2_a$	

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA – JUSTIFICACIÓN

*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) es una de las principales plagas agrícolas de la mayor parte del hemisferio occidental (López-Edwards et al. 1999). En los Estados Unidos, México y Brasil, la plaga genera un aumento en los costos de producción para todos los cultivos que utiliza como planta hospedera, especialmente en las producciones de maíz (Nagoshi et al. 2004, 2006, 2007 a y b, López-Edwards et al. 1999, Busato et al. 2004). En Colombia, esta especie es una de las principales plagas del maíz y secundaria en sorgo, algodón y pastos (García et al. 2002). La causa de la amplia distribución es su hábito polífago y la gran capacidad de movimientos de dispersión (Pair et al. 1987). El movimiento de este insecto ha sido estudiado con mucho detalle en América del Norte ya que afecta las zonas Central y Oriental de Estados Unidos y el sur de Canadá debido a su migración anual de todos estos sitios (Luginbill 1928, Young 1979, Pair et al. 1987). En Estados Unidos se ha tenido en cuenta el comportamiento migratorio de esta polilla, ya que si las poblaciones de los biotipos de maíz y arroz se pueden controlar en los sitios de hibernación, como por ejemplo en México, Texas y Florida, debería ser posible reducir sustancialmente las migraciones hacia el norte, y, por tanto, disminuir su densidad de población en campo. Sin embargo, los movimientos de este insecto en América Central y América del Sur no se han estudiado ampliamente, debido a la falta de conocimiento de las respuestas biológicas, ecológicas y de comportamiento que pueda presentar la especie en países neotropicales (Nagoshi et al. 2007 b). En Colombia, esta plaga se distribuye en una gran cantidad de cultivos, entre ellos maíz, arroz, caña de azúcar y algodón, entre otros (García et al. 2002) y algunos investigadores como Nagoshi et al. (2007 b) sugieren que la dispersión de este insecto en los trópicos se puede producir como respuesta a los cambios estacionales en las precipitaciones, temperatura y las plantaciones agrícolas.

La identificación, en diferentes países, de dos biotipos (biotipo de arroz y biotipo de maíz) dentro de la especie, (Pashley 1986, Busato et al. 2004) fue confirmada de igual manera en Colombia (Tolima) por Vélez-Arango et al. (2008). En este caso, el biotipo maíz se encontró en maíz, algodón y sorgo y el biotipo de arroz principalmente en cultivos de arroz, con muy baja proporción en maíz y algodón. Estos biotipos presentaron estructuración genética explicada por su asociación a su planta hospedera puesto que dos análisis de varianza

molecular realizados para un marcador nuclear y otro mitocondrial fueron significativos para los cultivos mencionados anteriormente (pruebas estadísticas) (Vélez-Arango 2009). En este trabajo, también se encontró que existe un alto flujo genético entre las poblaciones del insecto encontradas en maíz, algodón y sorgo y un flujo genético restringido entre estos tres cultivos y el arroz, explicando la existencia de ambos biotipos en la naturaleza.

Además de lo anterior, Lewter et al. (2006) y Nagoshi et al. (2007a y b) han demostrado que existen diferentes haplotipos mitocondriales en América del Norte y en Brasil y que su frecuencia y patrones de distribución varían entre localidades de un mismo país (Mississippi, Texas, Florida y Arkansas) y entre países, sugiriendo un aislamiento geográfico teniendo en cuenta que la asociación de los haplotipos a las plantas hospederas en ambos países es muy similar. Este último resultado podría implicar que la diferenciación genética de los dos biotipos se produjo antes de la dispersión de *S. frugiperda* o que existe una considerable interacción entre estas poblaciones geográficamente distantes. Esta última idea sugiere la posibilidad de migración entre las poblaciones de la región del Caribe y las de América del Norte (Pashley 1986). Sin embargo, aún se desconoce, a ciencia cierta, si las poblaciones de *S. frugiperda* en el hemisferio occidental interactúan o no.

De la misma manera, es de total desconocimiento, la composición y distribución haplotípica de los dos biotipos en Colombia. Por tanto, se hace necesario identificar estos haplotipos, a partir de la secuenciación mitocondrial y probar si éstos muestran algún patrón en la distribución que sugiera especificidad geográfica, estacional o de planta hospedera. De esta manera, se podrá tener un mejor conocimiento de los movimientos de este insecto y así optimizar los planes de monitoreo en el manejo integrado de plagas de este insecto en nuestro país.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Identificar los haplotipos de *S. frugiperda* presentes en Colombia con base en la secuenciación de un fragmento del gen *citocromo oxidasa I*, *COI*.

### 4.2. Objetivos específicos

- ❖ Analizar la secuencia *COI* para encontrar haplotipos variantes de los biotipos arroz y maíz.
- ❖ Probar si los patrones de distribución sugieren especificidad geográfica y/o de planta hospedera de haplotipos de *S. frugiperda* en las diferentes poblaciones de Colombia.
- ❖ Comparar genéticamente las poblaciones de *S. frugiperda* de Colombia y algunas secuencias de Estados Unidos para evaluar si existen diferencias en la composición haplotípica entre estos dos países.

## **5. HIPÓTESIS**

### **5.1. Hipótesis 1**

Ho: No existe una diferencia en la frecuencia de haplotipos de *S. frugiperda* en los departamentos y cultivos evaluados.

Ha Existe una diferencia en la frecuencia de haplotipos de *S. frugiperda* en los departamentos y cultivos evaluados.

### **5.2. Hipótesis 2**

Ho: No existe especificidad geográfica de la distribución de los haplotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* en Colombia.

Ha: Existe especificidad geográfica de la distribución de los haplotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* en Colombia.

### **5.3. Hipótesis 3**

Ho: No existe estructuración genética entre las secuencias de poblaciones de *S. frugiperda* de Colombia y Estados Unidos.

Ha: Existe estructuración genética entre las secuencias de poblaciones de *S. frugiperda* de Colombia y Estados Unidos.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Colecta de larvas

Un total de 1600 larvas de *S. frugiperda* fueron colectadas en los departamentos de Tolima, Córdoba, Meta, Antioquia y Valle del Cauca. Los muestreos se hicieron completamente al azar, en cultivos de maíz, algodón, arroz, pasto y sorgo y, fueron realizados por Ingenieros Agrónomos de Corpoica. Las colectas en el departamento del Tolima las realizó la Dra. Elizabeth Aguilera Garramuño (Investigador PhD Asociado, Corpoica, Tibaitatá), como parte de su tesis de PhD sobre Ecología del paisaje de *S. frugiperda* en el país. Estos muestreos se hicieron a finales del 2006 y principios de 2007. En los demás departamentos, los muestreos se realizaron a finales del 2008 y principios del 2009. Las colectas se hicieron de larvas y no de adultos, debido a que se deseaba determinar si los haplotipos de *S. frugiperda* presentaban algún tipo de asociación con la planta hospedera de la misma manera que se realizó en el trabajo de Vélez-Arango (2009). Esto dado que los adultos del insecto tienden a dispersarse entre cultivos y por lo tanto el muestreo de adultos podría sesgar la asociación del individuo al hospedero. Adicionalmente, los sitios muestreados fueron tenidos en cuenta para analizar la frecuencia de los haplotipos de *S. frugiperda* en departamentos que presentaran condiciones agronómicas diferentes para la plaga. En el departamento de Antioquia se produce únicamente maíz, en el departamento del Meta no se cultiva algodón, pero se produce maíz, sorgo y arroz (principalmente este último cultivo) y en los departamentos de Córdoba y Tolima, se produce maíz, algodón, sorgo y arroz. Se esperaría, por lo tanto que adultos de *S. frugiperda* migraran de una localidad a otra, dependiendo de su oferta alimenticia y también de las condiciones climáticas del lugar en el que se encuentre, como lo reportaron Nagoshi et al. 2007 (a, b) y 2008 en sus estudios realizados en Estados Unidos y Brasil.

Una vez colectadas, las larvas fueron almacenadas en tubos de plástico de 1,5 ml con etanol al 70%, etiquetados con el lugar de recolección y planta hospedera, y enviadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB (Corporación para Investigaciones Biológicas) en donde fueron almacenadas al vacío a -70° C hasta su procesamiento. Una vez en las instalaciones de la corporación, el 25% de las larvas fueron determinadas usando las claves de Tood y Poole (1980). Dentro de algunas de las características que permiten

la correcta identificación de esta especie se encuentran la presencia de propatas desde el segmento abdominal A3 al A6, crochets presentes, tres setas en el grupo SV en la propata del segmento abdominal 6 (A6), cuerpo liso o cubierto con gránulos convexos o cónicos, espiráculo en el segmento abdominal 8 (A8) ubicado lateralmente y margen posterior del lóbulo anal convexo, no lobulado o sin tubérculos, entre otras.

## **6.2. Extracción de ADN**

Un fragmento de la parte posterior de las larvas se utilizó para la extracción de ADN, la cual se llevo a cabo con el protocolo CTAB con algunas modificaciones (Black y Duteau 1997). Cada fragmento fue homogenizado con nitrógeno líquido y depositado en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se adicionó 400 µl de buffer de extracción CTAB (2X), 4 µl de β-mercaptoetanol y 20 µl de Proteinasa K. Cada tubo fue incubado por 1 h a 65° C y mezclado por inversión suave cada 10 min. Cada muestra fue centrifugada por 6 min a 12.000 rpm a 10° C y luego la solución fue transferida a un nuevo tubo. A cada tubo se le agregaron 500 µl de cloroformo alcohol-isoamílico frío (24:1) y fue centrifugado por 30 min a 12.000 rpm a 10° C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y el procedimiento se repitió con un volumen igual de cloroformo alcohol-isoamílico y fue centrifugado nuevamente por 30 min a 12.000 rpm a 10° C. El nuevo sobrenadante fue trasferido a un nuevo tubo, se adicionó un volumen equivalente de cloroformo frío (100%) y se centrifugó por 20 min a 12.000 rpm a 10° C. El sobrenadante resultante fue transferido a otro tubo y se adicionó 400 µl de isopropanol frío. El ADN fue precipitado por refrigeración a -20° C por 1 h y luego centrifugado por 30 min a 12.000 rpm a 4° C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado con 500 µl de etanol frío (100%) y centrifugado por 6 min a 12.000 rpm a 4° C; este procedimiento se repitió y el pellet fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 50 µl de buffer TE (1X) (TRIS HCL 100 mM y EDTA 10 mM, pH 8.0). Finalmente, el RNA fue removido adicionando 1 µl de RNasa e incubando a 37° C por 1 h.

### 6.3. Amplificación y secuenciación del gen *citocromo oxidasa I*– *COI*

La amplificación por PCR del gen *COI* fue llevada a cabo en una mezcla de reacción de 50 µl que contenía 5 µl de buffer de PCR, 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dNTPs, 2 µl del cebador sentido, 2 µl del cebador contra sentido y 1 µl de Taq polimerasa. El programa de amplificación en termociclador fue: 94°C (3 min), seguido de 30 ciclos de 94° C (1 min) 59° C (1 min), 72° C (1 min), y un segmento final de extensión de 72° C por 10 min (My Cycler Thermal Cycler, Biorad). La amplificación del *COI* se llevo a cabo con el par de cebadores JM76 F (5'GAGCTGAATTAGGRACCTCCAGG3') y *COI* 1483 R (5'GCTGGTGGTAAATTTTGATAT3') (Invitrogen). Cada producto amplificado fue visualizado en una cámara de electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 2.0 µl de bromuro de etidio. Las muestras fueron enviadas a Macrogen Inc. (Corea) para purificación y secuenciación.

### 6.4. Análisis de secuencias y genética de poblaciones

Para verificar la identidad molecular de las secuencias amplificadas se realizaron dos árboles de Neighbor - Joining y se observó que las secuencias de referencias del gen *COI* de *S. fugiperda* obtenidas del GenBank se unen a las secuencias amplificadas en este trabajo, confirmando así la identidad taxonómica del material biológico utilizado en esta investigación (Figs. 5 y 9).

Estas secuencias fueron editadas a mano con Bioedit (Hall 1999) y alineadas con el algoritmo Clustal W (Larkin et al. 2007, Cheena et al. 2003) en el programa Mega 4.0 (Kumar et al. 2008). Las comparaciones de las secuencias de ADN que incluyeron la identificación de los haplotipos y los sitios polimórficos fueron realizadas con el programa DNAsp V5. (Librado y Rozas 2009). Para determinar el modelo de la tasa de evolución nucleotídica se utilizó el programa jModelTest (Posada 2008, Guindon y Gascuel 2003). Los árboles de Neighbor - Joining fueron escogidos en este trabajo para visualizar la similitud genética entre haplotipos colombianos y comparar los resultados obtenidos con los resultados obtenidos por Nagoshi et al. (2007 a, b). Estos árboles se basan en la asociación de grupos dada la identidad genética entre las secuencias de ADN evaluadas, pueden incorporar cualquier tasa de evolución del gen y agrupa los OTUS teniendo en cuenta la

distancia mínima entre las ramas que los conectan (Nei y Kumar 2000, Hedrick 2004) y fueron generados con el programa en línea Phylogeny.fr (Dereeper et al. 2008). Además de estos árboles, se realizó un árbol de Neighbor – Joining en el programa Mega 4.0 (Kumar et al. 2008) con base en estadísticos  $F_{ST}$  generados en evaluaciones de poblaciones pareadas que fueron obtenidos con el programa Arlequín v. 2.0 (Schneider et al. 2000). Estos árboles se realizaron con el objetivo de visualizar las diferencias genéticas entre las poblaciones colombianas evaluadas (departamentos) y las secuencias de Estados Unidos (de diferentes estados de este país), teniendo en cuenta que estos árboles se basan en los estadísticos de diferenciación genética parados  $F_{ST}$  y no en las secuencias mitocondriales.

Además de lo anterior, las secuencias fueron analizadas en cuanto a su diversidad nucleotídica con el estimativo  $\Pi$  y polimorfismo nucleotídico  $\theta$  (Hedrick 2004).  $\Pi$  determina el promedio de la proporción de diferencias nucleotídicas entre todos los pares de secuencias de una muestra, que en este caso son las muestras de ADN de larvas secuenciadas de *S. frugiperda* obtenidas de las diferentes poblaciones, el cual es igual a:

$$\Pi = N/(N-1) \sum p_i p_j \Pi_{ij},$$

donde N es el número de secuencias analizadas;  $p_i$  es la frecuencia de la secuencia “i” y  $\Pi_{ij}$  es la proporción de nucleótidos que difieren entre las secuencias de ADN comparadas *ith* y *jth* (Nei y Kumar 2000, Hedrick 2004). Por otro lado,  $\theta$  se relaciona con la proporción de nucleótidos que se espera que sean polimórficos en cualquier muestra tomada del genoma de un organismo. Siendo

$$\theta = S/a_1,$$

$$a_1 = \sum 1/i,$$

donde n es el tamaño de la muestra (número de marcadores utilizados para el análisis); S es el número de fragmentos polimórficos generados por cada marcador e i es n-1 (Hartl y Clark 1997). Estos análisis fueron realizados con el programa DNAsp V5 (Librado y Rozas 2009).

A nivel de la población, se calculo el tamaño efectivo que corresponde a  $N_{ef}$ , cuando se determina el tamaño efectivo de las hembras, mientras que el tamaño efectivo total de la población es  $N_e = N_{ef} / 2$  (Hedrick 2004). Por lo tanto, el valor del tamaño efectivo obtenido en esta investigación debe ser multiplicado por dos; por ejemplo: 800.000 individuos encontrados por 2 sería un total de 1.600.000 individuos en total en la población.

El análisis AMOVA, de la estructura genético - poblacional de las muestras de *S. frugiperda* utilizadas en este trabajo, se realizó con el programa Arlequín v. 2.0 (Schneider et al. 2000). Además, este programa fue utilizado para obtener los datos de la prueba de neutralidad de Tajima-Nei (1984), las cuales fueron graficadas en un árbol de Neighbor – Joining en el programa Mega 4.0 (Kumar et al. 2008)

Finalmente, el programa TCS v. 1.21 (Clement et al. 2000) fue utilizado para construir las redes de expansión mínima, los cuales están relacionados con la distancia y la frecuencia de los haplotipos. Este método comienza combinando las redes de mínima expansión (MSN por sus siglas en ingles “Minimum Spanning Network”) en una sola red, los cuales son incorporados por criterios de parsimonia. Este método de análisis de redes es ampliamente usado para determinar la frecuencia de los haplotipos analizados y sus similitudes genéticas usado. Además es un método muy rápido que puede analizar muchas secuencias de haplotipos en una cantidad razonable de tiempo; teniendo como principal requerimiento la ausencia de recombinación (Foulds et al. 1979).

## 7. RESULTADOS

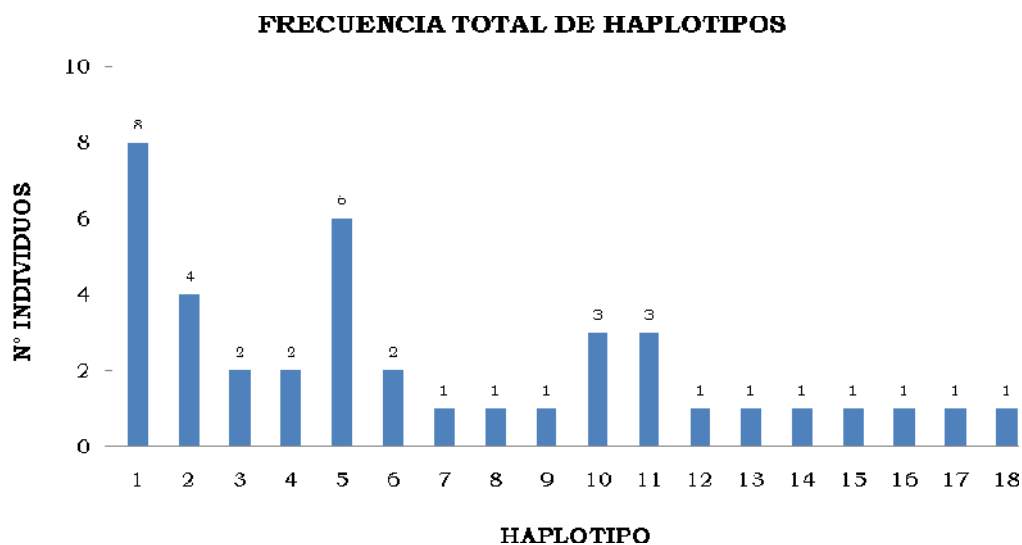
### 7.1. Haplotipos de *Spodoptera frugiperda* en el Tolima

Se obtuvieron un total de 40 secuencias de 642 pares de bases correspondientes a la región 5' del gen *citocromo oxidasa I*. Estas secuencias se obtuvieron de muestras de *S. frugiperda* colectadas en los cultivos de maíz, algodón sorgo y arroz que fueron identificados anteriormente como biotipo de maíz, biotipo de arroz, híbrido tipo H - - e híbrido tipo H + + por Vélez-Arango et al. (2008) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Número de larvas de *S. frugiperda* del departamento de Tolima.

CULTIVO	BIOTIPO	Nº INDIVIDUOS
Algodón	Arroz	1
	Maíz	7
	H- -	5
	H++	5
Arroz	Arroz	5
	Maíz	1
	H- -	5
	H++	1
Maíz	Arroz	2
	Maíz	4
Sorgo	Arroz	1
	Maíz	2
	H- -	1
<b>TOTAL</b>		<b>40</b>

La frecuencia promedio de las bases nucleotídicas fue A = 41.6, C = 12.6, G = 14.3 y T = 31.5. El número de haplotipos obtenido fue de 18 (Tabla 4), siendo el haplotipo 1 el más frecuente (8/40), seguido del haplotipo 5 (6/40), 10 y 11 (3/40), 6 (2/40) y los haplotipos 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 los menos frecuentes (1/40, cada uno de estos) (Fig. 2).



**Fig. 2.** Número de individuos pertenecientes a cada uno de los haplotipos de *S. frugiperda* encontrados en el departamento de Tolima.

En la tabla 4 se describen los cambios nucleotídicos encontrados en los 10 sitios polimórficos para este grupo de secuencias. Los sitios encontrados fueron: 1, 2, 6, 10, 14, 20, 105, 177, 180 y 190 (Tabla 4). En estos sitios polimórficos se observó que se presentaron tres cambios T – C, tres cambios A – C, un cambio A – T, un cambio C – T, dos cambios A – G. Por lo tanto, en estas secuencias ocurrieron cinco transversiones y cinco transiciones.

**Tabla 4.** Sitios polimórficos y cambios nucleotídicos encontrados en los 18 haplotipos analizados de las muestras del departamento de Tolima

HAPLOTIPO	SITIOS POLIMÓRFICOS									
	1	2	6	10	14	20	105	177	180	190
1	T	A	A	A	C	A	T	T	A	A
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	.	.	.	.	T	.	.	C	G	.
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	C	C	C	T	.	C	.	.	.	.
13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.



15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

En la tabla 5 se puede observar que el haplotipo 1 incluye individuos pertenecientes al biotipo de maíz e híbridos H ++, el haplotipo 2 por individuos del biotipo de maíz e híbridos H - -, el haplotipo 3 por los dos tipos de híbridos H++ y H--, el haplotipo 5 por una combinación de individuos de los biotipos de maíz y arroz y por individuos de ambos tipos de híbridos, el haplotipo 6 por individuos de ambos biotipos, los haplotipos 7 y 8 por individuos del biotipo maíz, el haplotipo 9 por híbridos H ++, el haplotipo 10 por individuos que son híbridos H - - y del biotipo de arroz, el haplotipo 11 - en su mayoría - por individuos del biotipo de arroz, los haplotipos 12, 13 y 17 por híbridos H - -, los haplotipos 14, 15 y 16 por individuos del biotipo de maíz y el haplotipo 18 por individuos del biotipo de arroz.

**Tabla 5.** Haplotipos encontrados dentro de los biotipos de *S. frugiperda* en el Tolima.

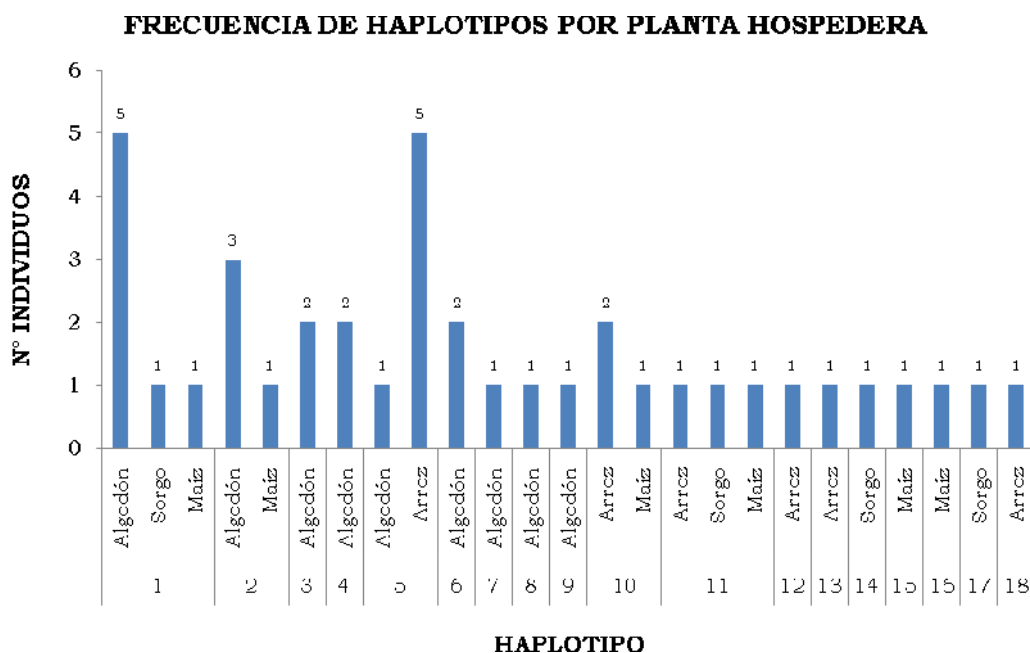
HAPLOTIPO	Nº INDIVIDUOS	CULTIVO	MUESTRAS	CLASE
1	8	Algodón	3	H --
		Algodón	7	H ++
		Algodón	8	H ++
		Algodón	14	H ++
		Algodón	15	BM
		Sorgo	31	BM
		Maíz	37	BM
		Arroz	42	BA
2	4	Algodón	4	H --
		Algodón	11	BM
		Algodón	18	BM
		Maíz	36	BM
3	2	Algodón	5	H --
		Algodón	12	H ++
		Algodón	6	H --

4		Algodón	13	BM
5	6	Algodón	9	H --
		Arroz	22	BA
		Arroz	24	H --
		Arroz	43	BA
		Arroz	45	BM
		Arroz	46	H ++
6	2	Algodón	10	BA
		Algodón	16	BM
7	1	Algodón	17	BM
8	1	Algodón	19	BM
9	1	Algodón	20	H ++
10	3	Arroz	21	H --
		Arroz	23	H --
		Maíz	40	BA
11	3	Arroz	25	BA
		Sorgo	38	BA
		Maíz	41	BA
12	1	Arroz	26	H --
13	1	Arroz	28	H --
14	1	Sorgo	32	BM
15	1	Maíz	34	BM
16	1	Maíz	35	BM
17	1	Sorgo	39	H --
18	1	Arroz	44	BA

---

Cabe resaltar que dentro de los haplotipos encontrados existen cuatro haplotipos que se presentan con mayor frecuencia dentro de los cultivos muestreados. El haplotipo 1, se encuentra en mayor abundancia en el cultivo de algodón, sorgo y maíz, el haplotipo 5 se encuentra más frecuente en algodón pero también se presenta en arroz y los haplotipos 2 y 10 se encuentran en los cultivos de algodón, arroz y maíz. Los demás haplotipos se

encuentran en menor frecuencia en los demás cultivos analizados (Fig. 3). Es importante tener en cuenta que la mayor frecuencia de estos haplotipos se encontró en el cultivo de algodón debido a que este cultivo fue más ampliamente muestreado en este departamento.

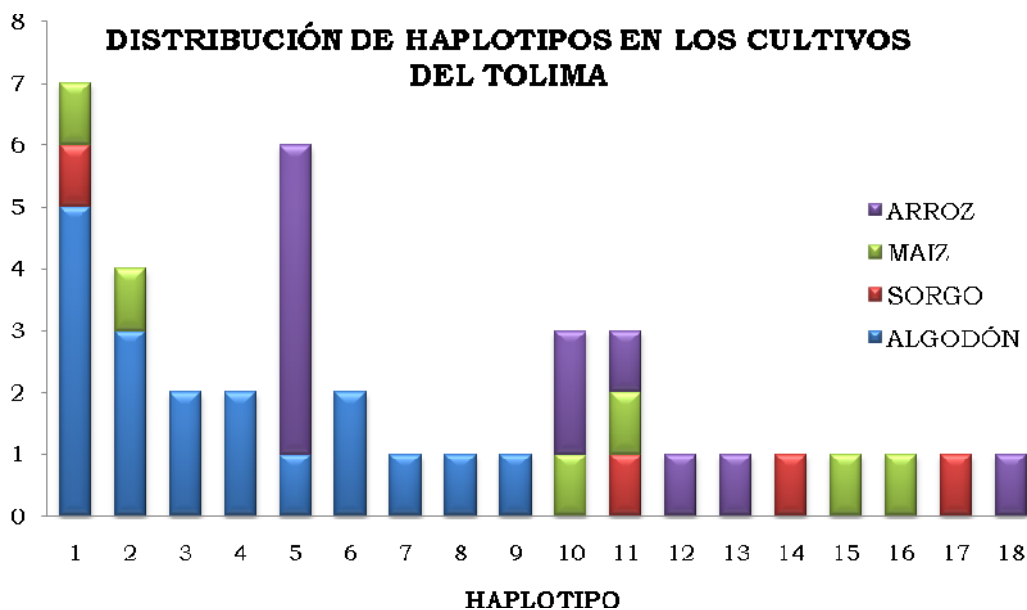


**Fig. 3.** Número de haplotipos de *S. frugiperda* colectados en diferentes cultivos en el departamento de Tolima.

Así mismo, se debe tener en cuenta que el haplotipo 1, que fue el más abundante del departamento Tolima, se presenta en los tres cultivos en los que se ha localizado el biotipo de maíz - según los resultados encontrados por Vélez-Arango et al. (2008) y Vélez-Arango (2009), al igual que los haplotipos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 17 y 18. Por su abundancia y presencia en todas las plantas hospederas, este haplotipo podría ser considerado el primer blanco en los programas de manejo de plagas, dada su alta frecuencia en este departamento.

En la Figura 4 se pueden observar los resultados encontrados y descritos anteriormente, vistos como el número total acumulado del haplotipo analizado por cultivo. Se observa que los haplotipos 1 a 9 se

encontraron con mayor frecuencia en el cultivo de algodón y los haplotipos 5, 10, 11, 12, 13 y 18 en el cultivo de arroz. En el cultivo de sorgo también se encontró el haplotipo 1 además de los haplotipos 11, 14 y 17 y en el cultivo de maíz se encontraron los haplotipos 1, 10, 11, 15 y 16.



**Fig. 4.** Distribución de haplotipos de *S. frugiperda* por cultivo muestreado en el departamento de Tolima.

Los valores de  $\pi$ ,  $h$ ,  $H_d$  y  $\theta$  se encuentran resumidos en la Tabla 6 y dado que el polimorfismo nucleotídico es igual a  $2N_e\mu$ , para el ADN mitocondrial (Freeland 2005, Hedrick 2004), el tamaño efectivo de la población de *S. frugiperda* para el departamento del Tolima es de 1.619.000 individuos, asumiendo una tasa de mutación de  $\mu = 1 \times 10^{-7}$  (Nei y Kumar 2000).

**Tabla 6.** Polimorfismo de ADN encontrado en el departamento de Tolima ( $h$  = número de haplotipos,  $Hd$  = diversidad haplotípica,  $S$  = número de sitios segregantes,  $\pi$  = diversidad nucleotídica,  $\theta$  = polimorfismo nucleotídico - número promedio de diferencias pareadas en una población).

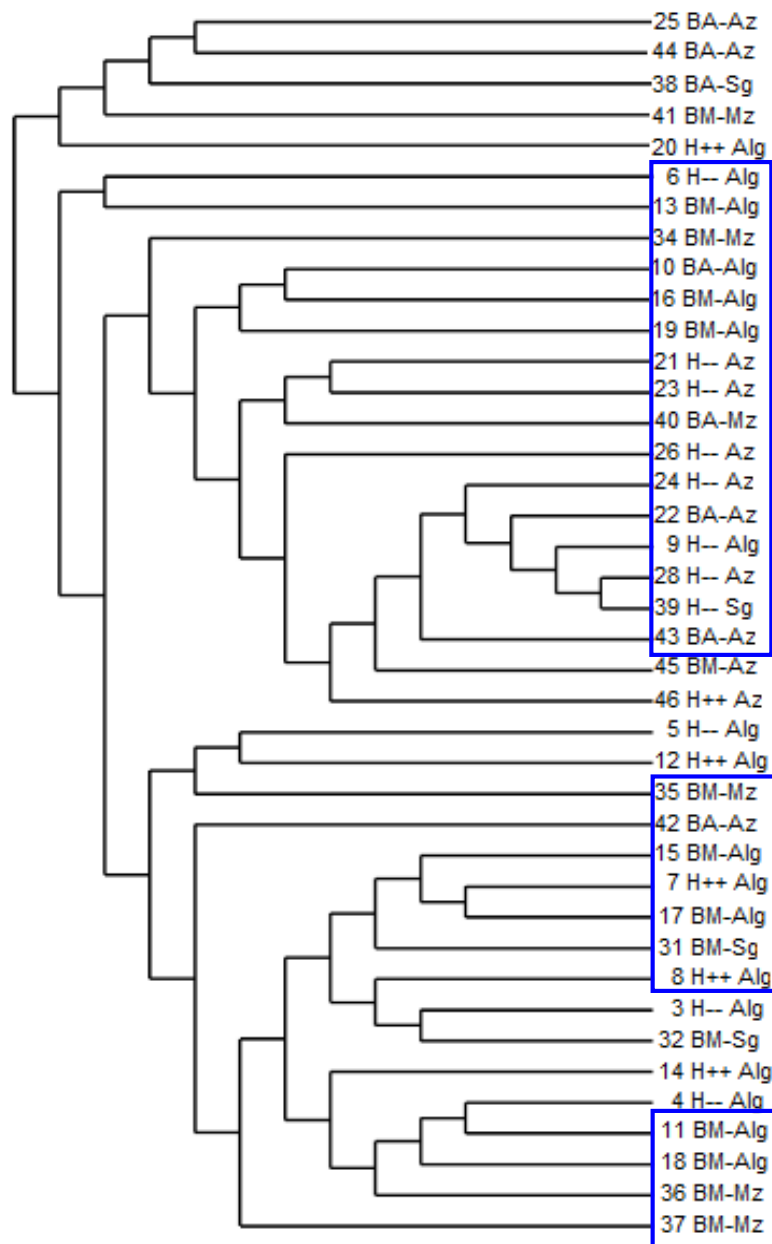
<b>PARES BASES</b>	<b>H</b>	<b>Hd</b>	<b>S</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b><math>\theta</math></b>
642	18	0.926	0.399	0.14967	0.16196

Para el árbol de Neighbor - Joining obtenido de las secuencias de *S. frugiperda* colectadas en el departamento del Tolima, las 40 muestras de los cultivos de maíz, arroz, sorgo y algodón, mostraron tener una tasa de sustitución nucleotídica que se ajusta al modelo de distancia de HKY con el programa jModeltest basado en el criterio BIC (BIC = 3872.6662,  $-\ln L = 1677.9257$ ) (Fig. 5).

Para establecer la asociación de los haplotipos respecto a su origen mitocondrial materno, este trabajo se basó en la tesis de maestría presentada por Vélez-Arango (2009), en donde se tuvo en cuenta la digestión de un fragmento mitocondrial con la enzima *MspI* y la amplificación de fragmentos de la región FR de menos de 500 pb o más de 500 pb. Desde este punto de vista, el biotipo de maíz se caracteriza por presentar digestión con la enzima de restricción y amplificación de fragmentos menores a 500 pb, el biotipo de arroz no presenta corte con la enzima de restricción y amplifica fragmentos de más de 500 pb; los híbridos tipo H + + presentan digestión con la enzima *MspI* y amplifica fragmentos de más de 500 pb y, los híbridos tipo H - - no presentan digestión con la enzima de restricción y amplifica fragmentos menores a 500 pb en la región FR (Vélez-Arango 2009).

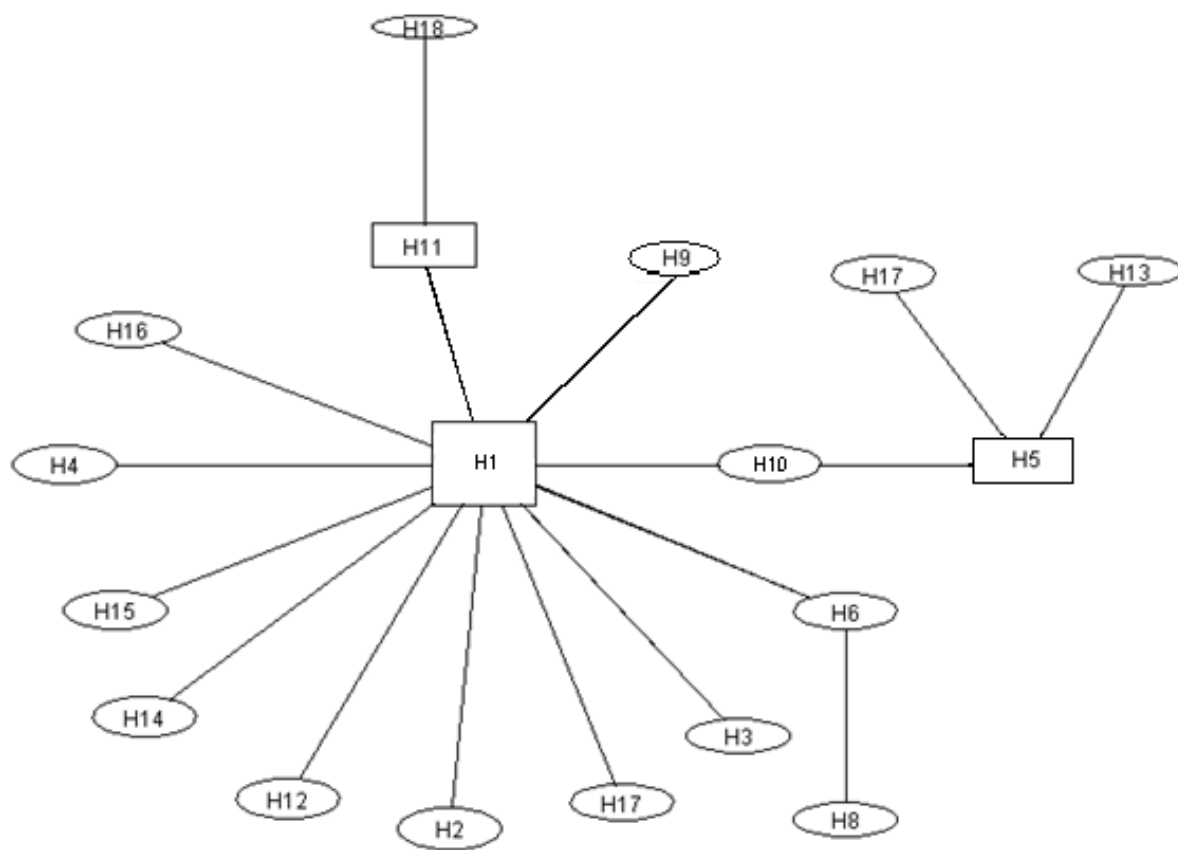
Este árbol muestra que, en general, existe una asociación de secuencias basada en el origen mitocondrial anteriormente descrito, debido a que asocia haplotipos cuyo origen materno es del biotipo arroz y por otro lado asocia haplotipos de origen materno del biotipo maíz. Para evidenciar esta asociación se encontraron, por ejemplo, agrupaciones de secuencias tales como las de los haplotipos 21, 23, 40, 26, 24, 22, 9, 28, 39, 43 y 45 las cuales tienen un origen materno proveniente del biotipo de arroz y secuencias de haplotipos tales como 41, 20 y 6, 13, 34, 16 y 19 (a excepción del haplotipo 10) que tienen como origen materno el biotipo de maíz. Así

mismo, se encontraron agrupaciones de secuencias tales como las de los haplotipos 45, 5, 12, 35, 42, 8, 3 y 32 que presentan orígenes maternos entre mezclados de ambos biotipos de *S. frugiperda*.



**Fig. 5.** Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining y la distancia HKY (Hasegawa, Kishino y Yano 1985) basado en 40 secuencias del gen *COI* en muestras del departamento de Tolima y las plantas hospederas donde fueron colectadas (BA: Biotipo Arroz, BM: Biotipo Maíz, H++: híbrido positivo, H- -: híbrido negativo; Mz = Maíz, Az = Arroz, Sg = Sorgo y Alg = Algodón).

Las redes de expansión mínima del Tolima soportan lo analizado para la frecuencia con la que se encuentra cada haplotipo por cultivo, estableciendo uniones basadas en distancias genéticas entre las unidad taxonómicas (OTUS) compuestas por cada haplotipo (Fig. 6). La unidad taxonómica más grande que fue la más frecuente, está representada de igual manera por el haplotipo 1, seguido del haplotipo 5 y 11. Aunque el haplotipo 10 no se muestra como uno de los más frecuentes, si se unen en la red al haplotipo 5 debido a que los dos haplotipos tienen origen mitocondrial del biotipo de arroz. Las demás unidades presentaron una frecuencia baja, comparada con la de los anterior haplotipos



**Fig. 6.** Red de expansión mínima basada en 40 secuencias del gen mitocondrial *COI* en muestras de Tolima.

Los resultados arrojados por el AMOVA muestran que *S. frugiperda* no presenta una estructuración genética y por lo tanto los haplotipos se mueven libremente entre los cultivos analizados (Tabla 7).

**Tabla 7.** Análisis de Varianza Molecular realizado en 40 secuencias de ADN de *S. frugiperda* del departamento de Tolima.

<b>Fuente De variación</b>	<b>gl</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componentes de Varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
Entre cultivos	3	1.5	0	0
Dentro de cultivos	36	18.0	0.5	100
Total	39	19.5	0.5	
Índice de Fijación		<b>F<sub>ST</sub>= 0.000001</b>	<b>p &gt; 0.005</b>	

Respecto al número de migrantes existentes de *S. frugiperda* en el Tolima, se determinó que, a partir de la fórmula  $F_{ST} = 1 / (1 + 2Nm)$ , el número de migrantes es 49.9, lo que significa que se requiere un mínimo de 50 individuos para que las poblaciones de haplotipos de *S. frugiperda* se homogenicen entre los cultivos analizados en este estudio. En el trabajo realizado por Vélez-Arango (2009), también se calculó el número de migrantes con los marcadores *COI* y *FR*, generando valores muy similares. En esta tesis, la autora también encontró valores diferentes del número de migrantes entre cultivos, ya que la migración fue muy baja entre los cultivos de maíz, algodón respecto al cultivo de arroz. Este trabajo difiere con el de Vélez-Arango (2009), debido a que en ese trabajo, la autora tuvo en cuenta una mayor cantidad de muestras de arroz, lo cual puede explicar la diferencia entre los valores de número de migrantes encontrados en este trabajo. Además, la unidad de diferenciación genética usada por Vélez-Arango (2009) son los alelos de los marcadores moleculares mencionados, mientras que en el presente trabajo la unidad de diferenciación genética de las poblaciones son los nucleótidos de un fragmento del gen *COI* que permitieron la identificación de los haplotipos de *S. frugiperda*.



## 7.2. Haplotipos *Spodoptera frugiperda* en Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca

Para el análisis entre los departamentos analizados, se obtuvieron un total de 102 secuencias de 528 pares de bases correspondientes a la región 5' del gen *citocromo oxidasa I*. Estas secuencias se obtuvieron de muestras de *S. frugiperda* colectadas en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca. Adicionalmente, se tomaron nueve secuencias reportadas en el GenBank para realizar las comparaciones entre las poblaciones colombianas y las norteamericanas (Tabla 8 y 9).

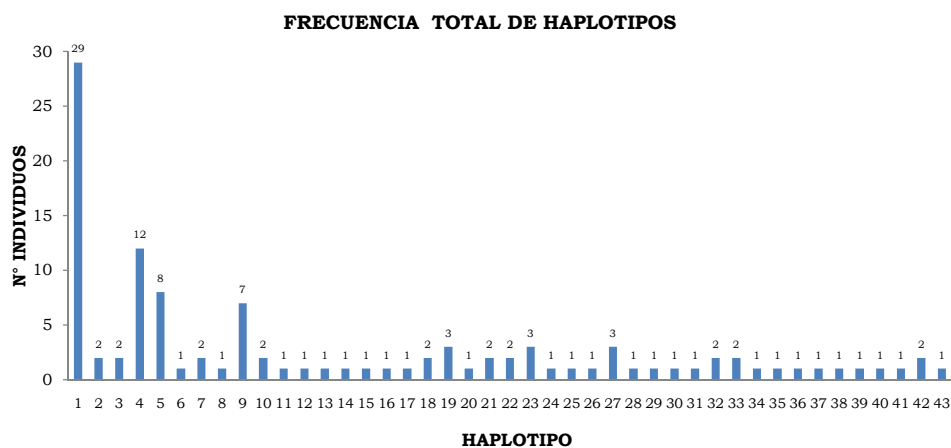
**Tabla 8.** Número de larvas de *S. frugiperda* y cultivos de muestreo en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca.

DEPARTAMENTO	CULTIVO	Nº INDIVIDUOS
Tolima	Algodón	18
	Arroz	12
	Maíz	6
	Sorgo	4
Meta	Maíz	19
	Arroz	4
	Sorgo	4
Antioquia	Pasto	2
	Maíz	6
Córdoba	Algodón	12
	Maíz	7
	Sorgo	4
Valle del Cauca	Algodón	3
	Maíz	1
<b>TOTAL</b>		<b>102</b>

**Tabla 9.** Secuencias de *S. frugiperda* obtenidas del GenBank de poblaciones de Estados Unidos (FL=Florida, AR=Arkansas, MP = Mississippi, LA= Los Ángeles).

GenBank	Localidad	Clase	Nº individuos
SFU72977	E.U	Biotipo Arroz	1
SFU72974	E.U	Biotipo Maíz	1
AY714298	FL-AR-MP-LA	Biotipo Maíz	1
AY714299	FL	Biotipo Maíz	1
AY714300	FL	Biotipo Maíz	1
AY714301	FL	Biotipo Arroz	1
AY714302	FL-AR	Biotipo Arroz	1
AY714303	FL-AR	Biotipo Arroz	1
AY714304	FL	Biotipo Arroz	1
<b>TOTAL</b>			<b>9</b>

La frecuencia promedio de las bases nucleotídicas fue A = 40.5, C = 14.7, G = 12.4 y T = 32.4. El número de haplotipos obtenido fue de 43 (Tabla 4), siendo el haplotipo 1 el más frecuente (29/111), seguido del haplotipo 4 (12/111), el haplotipo 5 (8/111) y finalmente el haplotipo 9 (7/111). Los haplotipos 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 43 fueron los menos frecuentes (1/111 cada uno) (Fig. 7).



**Fig. 7.** Número total de haplotipos de *S. frugiperda* encontrados en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima, Valle del Cauca y en las poblaciones de Estados Unidos.

En la tabla 10 se pueden observar los cambios nucleotídicos en los seis sitios polimórficos en estas secuencias: 2, 60, 150, 162, 199 y 456. En estos sitios polimórficos se encontró que hubo dos cambios nucleotídicos en el sitio polimórfico 2 (T – G – C), los demás fueron cambios únicos. Un cambio A – T, dos cambios A – G, un cambio de T – A y un cambio de C – T. En estas secuencias ocurrieron un total de tres transiciones y cuatro transversiones.

**Tabla 10.** Sitios polimórficos y cambios nucleotídicos encontrados en los 43 haplotipos analizados de las muestras en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima, Valle del Cauca y en las poblaciones de Estados Unidos.

HAPLOTIPO	SITIOS POLIMORFICOS					
	2	60	150	162	199	456
1	T	A	A	T	A	C
2	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.
8	G	.	.	.	.	.
9	.	.	.	.	.	.
10	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.
12	.	.	G	.	.	.
13	.	.	.	.	.	.
14	.	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.
16	.	.	.	.	.	.
17	C	.	.	.	.	.
18	.	.	.	.	.	.
19	.	.	.	.	.	.
20	.	.	.	.	.	.
21	.	.	.	.	.	.
22	.	.	.	.	.	.
23	.	.	.	.	.	.
24	.	.	.	.	.	.
25	.	.	.	.	.	.
26	.	.	.	A	.	.
27	.	.	.	.	.	.

28	.	.	.	.	.	.
29	.	.	.	.	.	.
30	.	.	.	.	.	.
31	.	.	.	.	G	.
32	.	.	.	.	.	.
33	.	.	.	.	.	.
34	.	.	.	.	.	.
35	.	.	.	.	.	.
36	.	.	.	.	.	.
37	.	.	.	.	.	.
38	.	.	.	.	.	.
39	.	T	.	.	.	.
40	.	.	.	.	.	.
41	.	.	.	.	.	.
42	.	.	.	.	.	.
43	.	.	.	.	.	T

En la tabla 11 y en la figura 8, se puede observar que dentro de los haplotipos con mayor frecuencia, el haplotipo 1 se presenta – de manera más abundante - en los departamentos de Tolima, seguido de Meta y Córdoba en los cultivos de algodón y en el departamento del Meta en cultivos de maíz, sin embargo, se debe aclarar que este haplotipo también se encuentra en los demás cultivos analizados y en los restantes departamentos (a excepción de Estados Unidos) aunque en menor frecuencia. El haplotipo 4 se presenta de forma más abundante en el departamento del Tolima en los cultivos de arroz; también se localiza menos frecuentemente en los departamentos de Antioquia y Córdoba en cultivos de algodón y maíz. El haplotipo 5 se encuentra de forma más abundante en el Meta, pero también se halló en el Tolima, Córdoba y Valle del Cauca. Este haplotipo se encontró principalmente en los cultivos de maíz y algodón, siendo más abundante en el primer cultivo. Finalmente, el haplotipo 9 se encuentra en los cultivos de arroz y maíz en los departamentos de Tolima, Meta, Antioquia y Córdoba.

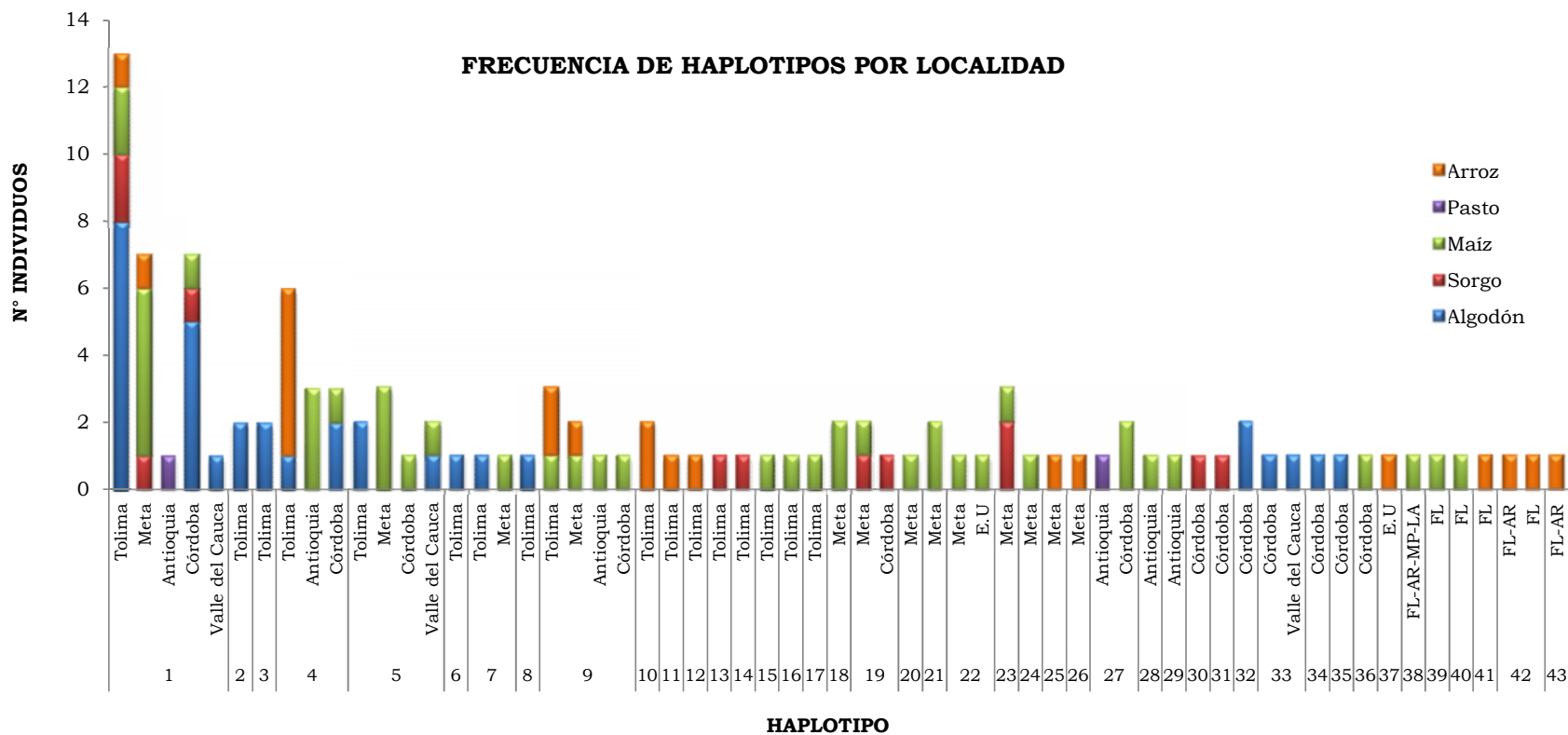
**Tabla 11.** Haplotipos encontrados dentro de los biotipos de *S. frugiperda* en Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima, Valle del Cauca y en las poblaciones de Estados Unidos.

Haplotipo	Nº individuos	Localidad	Cultivo	Muestra				
1	29	Tolima	Algodón	1				
				2				
				5				
				6				
				9				
				12				
				13				
				16				
				Meta	Arroz	26		
						Sorgo	31	
							32	
						Maíz	37	
							38	
						Antioquia	Maíz	42
								46
								47
		51						
		53						
		Córdoba	Arroz					61
								Sorgo
		Valle Cauca	Pasto			69		
				Sorgo	77			
					80			
					83			
				Tolima	Algodón	85		
						88		
						89		
						98		
						Algodón	99	
10								
2	2	Tolima	Algodón			3		
				11				
3	2	Tolima	Algodón	4				
				7				
4	12	Tolima	Algodón	20				
				22				
				27				
				27				

				29
				30
		Antioquia	Maíz	70
				72
				74
		Córdoba	Algodón	90
				91
			Maíz	96
5	8	Tolima	Algodón	8
				14
		Meta	Maíz	45
				48
				58
		Córdoba	Maíz	94
		Valle Cauca	Algodón	101
			Maíz	102
6	1	Tolima	Algodón	15
7	2	Tolima	Algodón	17
		Meta	Maíz	50
8	1	Tolima	Algodón	18
9	7	Tolima	Arroz	19
				21
			Maíz	39
		Meta	Maíz	44
			Arroz	60
		Antioquia	Maíz	75
		Córdoba	Maíz	95
10	2	Tolima	Arroz	23
				28
11	1	Tolima	Arroz	24
12	1	Tolima	Arroz	25
13	1	Tolima	Sorgo	33
14	1	Tolima	Sorgo	34
15	1	Tolima	Maíz	35
16	1	Tolima	Maíz	36
17	1	Tolima	Maíz	40
18	2	Meta	Maíz	41
				43
19	3	Meta	Maíz	49
			Sorgo	67
		Córdoba	Sorgo	78
20	1	Meta	Maíz	52
21	2	Meta	Maíz	54

				55
22	2	Meta	Maíz	56
		U.E	Maíz	SFU72974
23	3	Meta	Maíz	57
		Meta	Sorgo	65
				66
24	1	Meta	Maíz	59
25	1	Meta	Arroz	62
26	1	Meta	Arroz	63
27	3	Antioquia	Pasto	68
		Córdoba	Maíz	92
				97
28	1	Antioquia	Maíz	71
29	1	Antioquia	Maíz	73
30	1	Córdoba	Sorgo	76
31	1	Córdoba	Sorgo	79
32	2	Córdoba	Algodón	81
				86
33	2	Córdoba	Algodón	82
		Valle Cauca	Algodón	100
34	1	Córdoba	Algodón	84
35	1	Córdoba	Algodón	87
36	1	Córdoba	Maíz	93
37	1	U.E	Arroz	SFU72977
38	1	FL-AR-MP-LA	Maíz	AY714298 H1
39	1	FL	Maíz	AY714299 H2
40	1	FL	Maíz	AY714300 H3
41	1	FL	Arroz	AY714301 H1
42	2	FL-AR	Arroz	AY714302 H2
		FL	Arroz	AY714304 H4
43	1	FL-AR	Arroz	AY714303 H3

---



**Fig. 8.** Distribución de haplotipos de *S. frugiperda* por cultivo muestreado en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima, Valle del Cauca y en las poblaciones de Estados Unidos.



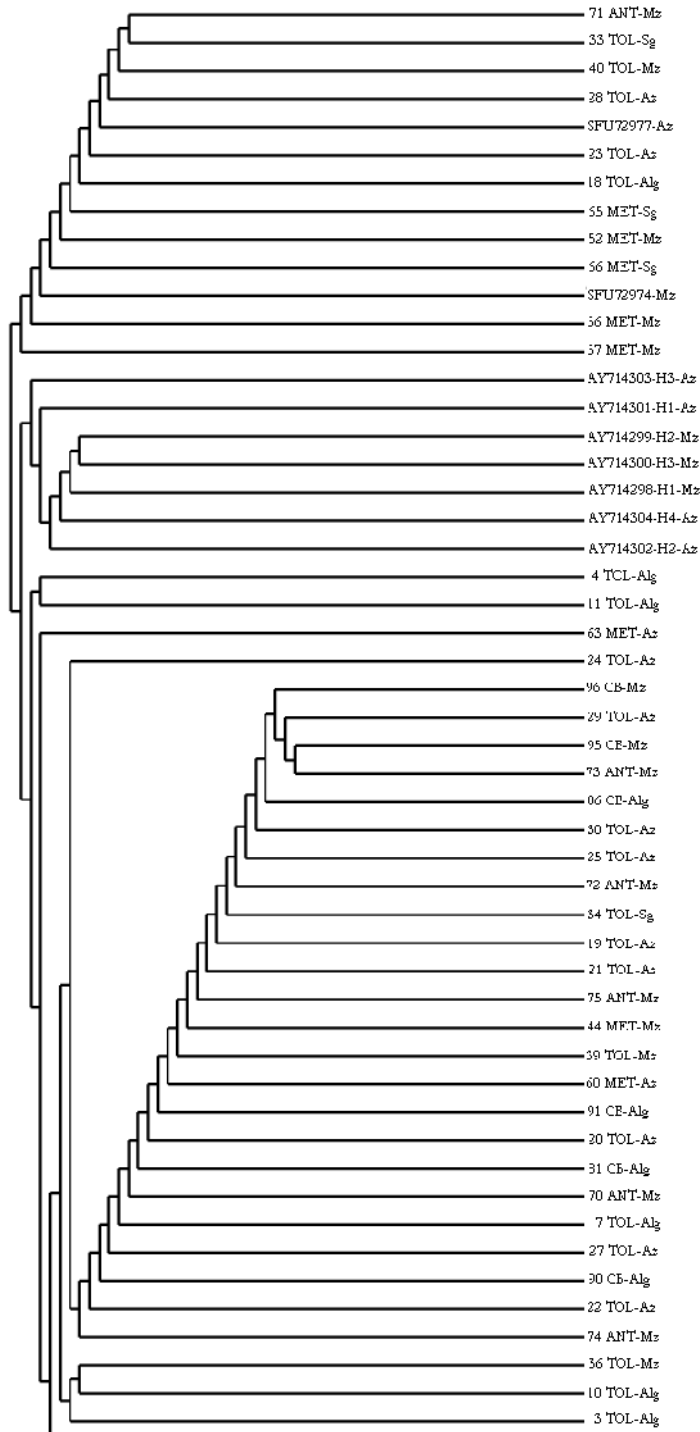
Los valores de  $\pi$ ,  $h$ ,  $Hd$  y  $\theta$  se encuentran resumidos en la Tabla 12 y tal como se determinó para el Tolima, el tamaño efectivo de la población de *S. frugiperda* de estas poblaciones es 1.889.100 individuos, asumiendo una tasa de mutación de  $\mu = 1 \times 10^{-7}$  (Nei y Kumar 2000).

**Tabla 12.** Polimorfismo de ADN encontrado en los diferentes departamentos analizados en Colombia y en las poblaciones de Estados Unidos ( $h$  = número de haplotipos,  $Hd$  = diversidad haplotípica,  $S$  = número de sitios segregantes,  $\pi$  = diversidad nucleotídica,  $\theta$  = polimorfismo nucleotídico - número promedio de diferencias pareadas en una población).

PARES BASES	$h$	$Hd$	$S$	$\Pi$	$\Theta$
528	43	0.912	363	0.18956	0.18891

Para el árbol de Neighbor - Joining obtenido de las secuencias de *S. frugiperda* colectadas en los diferentes departamentos de Colombia y las secuencias de Estados Unidos, obtenidas del GenBank, las 111 muestras mostraron tener una tasa de sustitución nucleotídica que se ajusta al modelo de distancia de HKY con el programa jModeltest basado en el criterio BIC (BIC 6195.3533,  $-\ln L = 2392.4033$ ) (Fig. 9).

El árbol producido muestra que no hay una división clara entre las secuencias colombianas y las secuencias obtenidas del GenBank de las poblaciones norteamericanas. Las secuencias norteamericanas, aunque se encuentran agrupadas en un solo conjunto (a excepción de la muestra SFU72977 arroz, que se encuentra más alejada genéticamente del resto de las muestras norteamericanas), se ubican en la parte superior del árbol entre mezcladas con secuencias colombianas. Dentro del árbol, tampoco se evidencia ninguna agrupación evidente entre las secuencias analizadas por departamento o por cultivo dentro de los departamentos.



**Fig. 9.** Árbol filogenético utilizando Neighbor-Joining y la distancia HKY basado en 111 secuencias del gen *COI* de las diferentes poblaciones colombianas y norteamericanas y las plantas hospederas donde fueron colectadas (TOL =Tolima, MET= Meta, CB = Córdoba, ANT = Antioquia, VC = Valle del Cauca; Mz = Maíz, Az = Arroz, Sg = Sorgo, Alg = Algodón, Pto = Pasto, AY714299 a AY714304 y SFU72974 – SFU72977 = muestras norteamericanas).

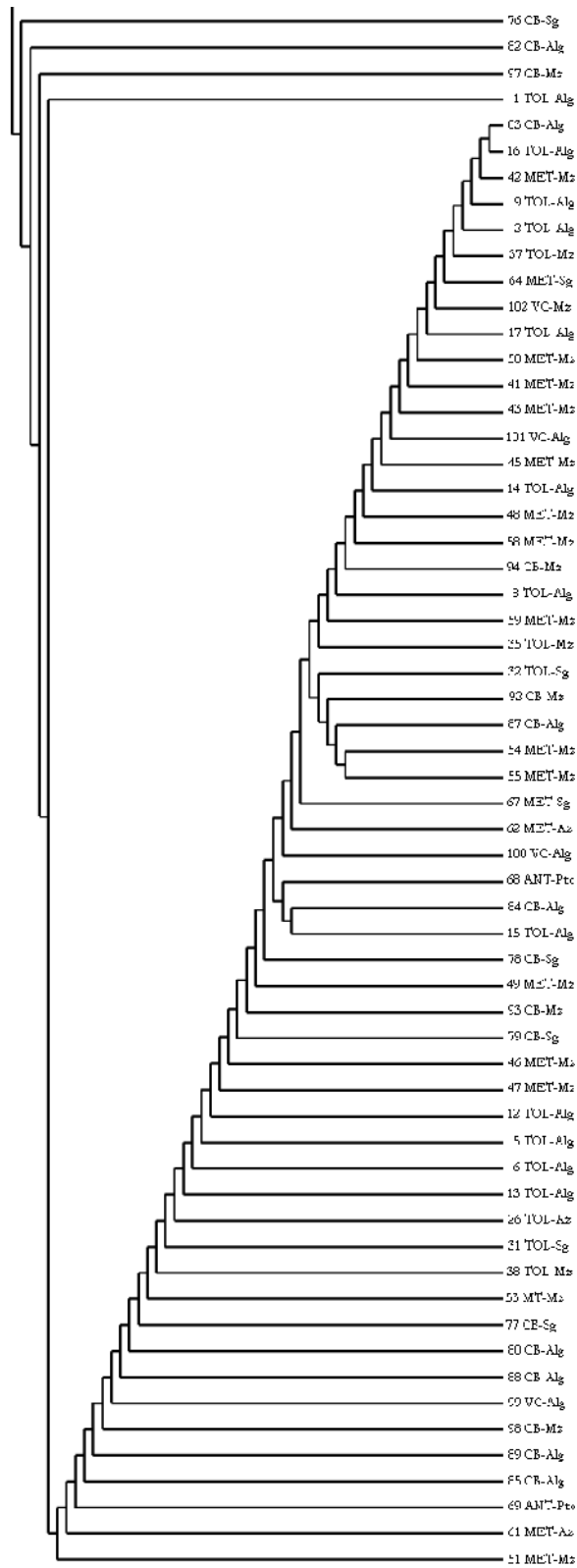
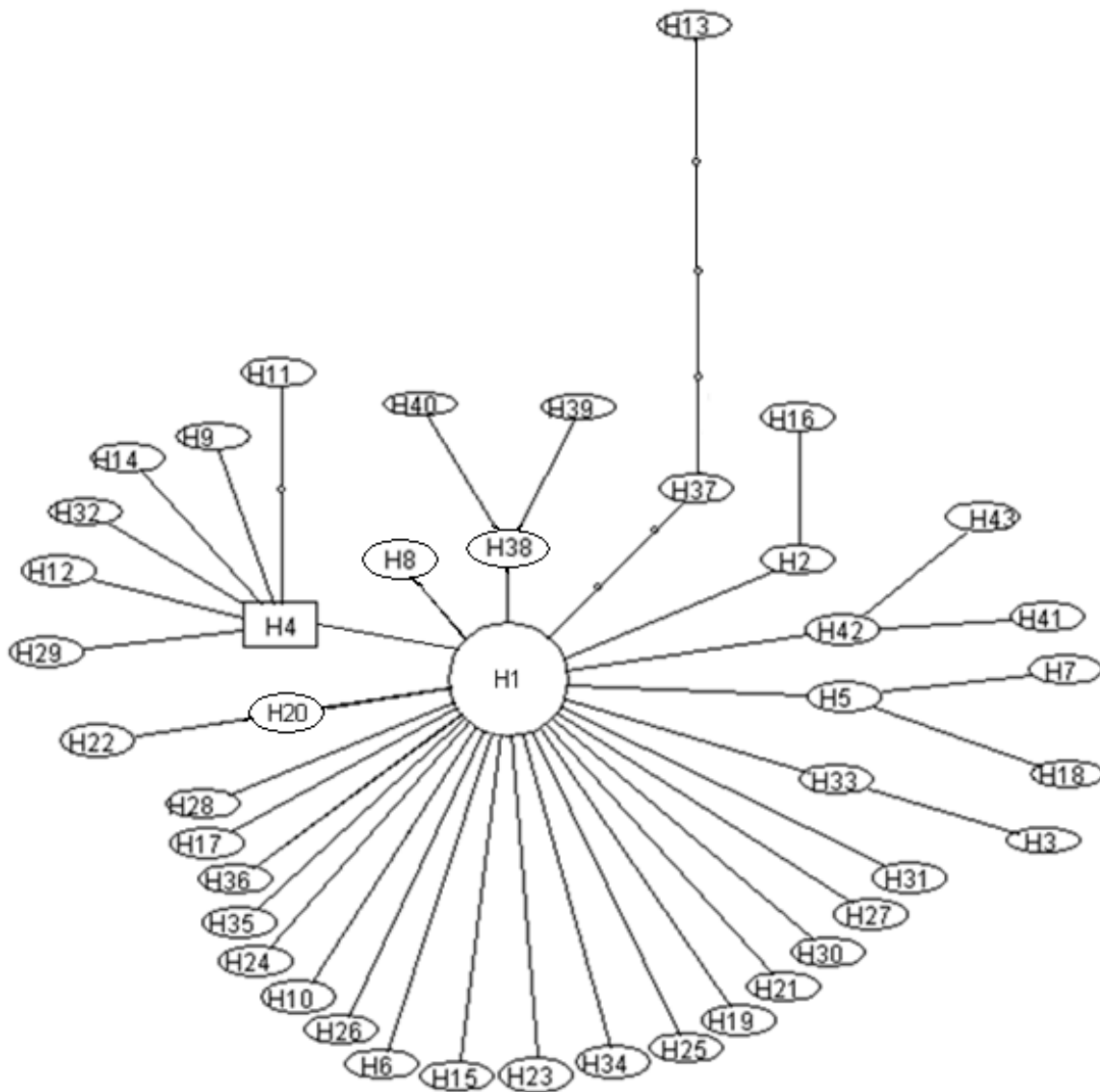


Fig. 9. Continuación

La red de expansión mínima para las secuencias de los departamentos de Colombia y las secuencias de Estados Unidos mostró resultados similares a los obtenidos a la red de expansión mínima del Tolima y al análisis de frecuencia de los haplotipos por cultivo (Fig. 10). Sin embargo, los análisis de la red solo mostraron a los haplotipos 1 y 4 como los más frecuentes y evidenciaron la ausencia de haplotipos que posiblemente no fueron muestreados en el análisis (círculos pequeños de la red) debido al tamaño de la muestra de algunos de los departamentos.



**Fig. 10.** Red de expansión mínima basada en 111 secuencias del gen *COI* en muestras de Colombia y Estados Unidos.

En el análisis de los datos de la prueba de neutralidad de Tajima-Nei (Tabla 13) se encontró que únicamente las secuencias dentro del departamento de Antioquia no son neutrales; esto debido posiblemente a la colecta exclusiva del cultivo de pasto que se realizó en este departamento, generando un exceso de haplotipos de este cultivo y una completa ausencia de los demás haplotipos presentes en los restantes cultivos muestreados. A pesar de haberse encontrado secuencias no neutrales en este departamento, se pudo determinar que en conjunto, las secuencias de las seis poblaciones analizadas se ajustan a los supuestos de evolución por medio de procesos de azar.

**Tabla 13.** Datos de la prueba de neutralidad de Tajima-Nei para las poblaciones analizadas de Colombia y Estados Unidos.

	TOLIMA	META	ANTIOQUIA	CORDOBA	VALLE DEL CAUCA	E.U	PROMEDIO
Tamaño de la muestra	40	27	8	23	4	9	18.5
D (Tajima-Nei)	-0.025	0.835	-1.742	0.45	0.591	0.319	0.0714
<i>P</i>	0.52	0.835	<b>0.003</b>	0.712	0.822	0.673	0.6058

Los resultados arrojados para el AMOVA que incluyeron muestras de los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima, Valle del Cauca y Estados Unidos, demuestran que hay estructuración genética entre estos dos países, ya que el valor de  $F_{ST}$  obtenido fue significativo ( $F_{ST} = 0.76812$ ,  $P < 0.001$ ) (Tabla 14). Esto implica que no existe flujo genético entre los dos países, o que es tan limitado que no permite la homogenización genética entre sus poblaciones.

**Tabla 14.** Análisis de Varianza Molecular realizado en 111 secuencias de ADN de *S. frugiperda* con poblaciones colombianas y norteamericanas.

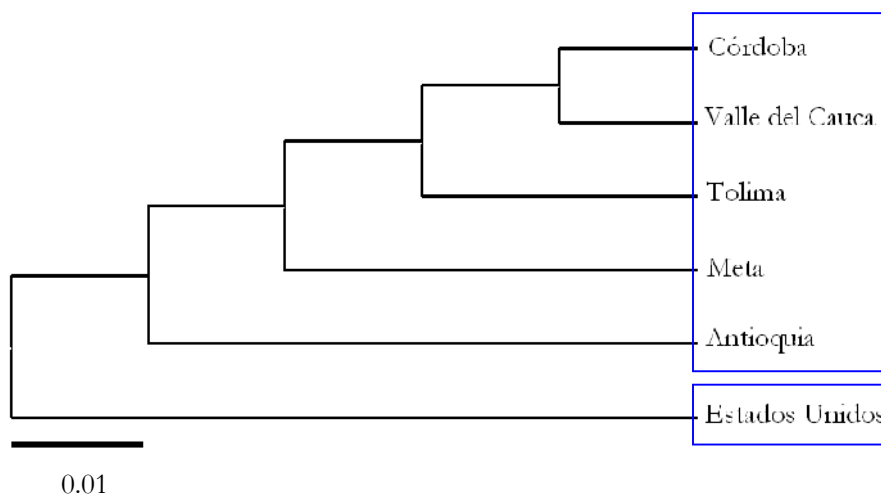
FUENTE DE VARIACIÓN	gl	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE VARIANZA	PORCENTAJE DE VARIACIÓN
Entre departamentos	1	1672.172	98.90881	76.37
Dentro de departamentos/ entre cultivos	4	162.464	0.57834	0.45
Dentro de departamentos	105	3153.4	30.03290	23.19
Total	110	4988.090	129.52005	
Índice de Fijación		<b>F<sub>ST</sub> = 0.76812</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	

Respecto al número de migrantes existentes de *S. frugiperda* en las poblaciones investigadas, se determinó que, a partir de la fórmula  $F_{ST} = 1 / (1 + 2Nm)$ , el número de migrantes es 11.59, lo que significa que se requiere un mínimo de 12 individuos para que las poblaciones de haplotipos de *S. frugiperda* se homogenicen entre las poblaciones analizadas en este estudio.

Finalmente, en la tabla 15 y la figura 11 se muestran los valores de los análisis de  $F_{ST}$  obtenidos entre parejas de poblaciones analizadas. El análisis se realizó teniendo en cuenta que las secuencias colombianas se agruparon dentro de cada uno de los departamentos de donde fueron obtenidas y las secuencias de Estados Unidos fueron agrupadas dentro de una sola población. Estos valores de  $F_{ST}$ , muestran claramente que las poblaciones de Estados Unidos son las que se encuentran más alejadas – genéticamente- de las poblaciones colombianas. Las poblaciones de Córdoba y Antioquia muestran una distancia genética considerablemente alta (con respecto a la encontrada entre Estado Unidos y las poblaciones colombianas); sin embargo, se debe tener en cuenta que estas diferencias pueden estar siendo afectadas por el número de muestras utilizadas en el departamento de Antioquia en comparación con las utilizadas dentro de los demás departamentos.

**Tabla 15.** Distancias genéticas pareadas basadas en  $F_{ST}$  entre las poblaciones colombinas y norteamericanas

	Tolima	Meta	Antioquia	Córdoba	Valle del Cauca	Estados Unidos
Tolima	0					
Meta	0.01061	0				
Antioquia	0.05638	0.03082	0			
Córdoba	0.05902	0.12342	0.17974	0		
Valle del Cauca	0.04126	0.02074	0.01944	0.02011	0	
Estados Unidos	<b>0.72962</b>	<b>0.66114</b>	<b>0.68997</b>	<b>0.88883</b>	<b>0.77249</b>	0



**Fig. 11.** Árbol de Neighbor-Joining de las poblaciones colombianas y norteamericanas basado en valores de  $F_{ST}$  como medidas de distancia genética.

## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizaron sitios polimórficos de un fragmento del extremo 5' del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (*COI*) de *S. frugiperda* para identificar los haplotipos presentes dentro de los biotipos de esta especie, a partir de colectas de larvas llevadas a cabo en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca, siendo el departamento del Tolima analizado con mayor detalle debido a que los biotipos de *S. frugiperda* y sus respectivos híbridos fueron identificados con anterioridad en una tesis de maestría en entomología realizada por Vélez-Arango (2009), lo cual permite realizar comparaciones de distribución de haplotipos de cada biotipo de este insecto para este departamento. En general las comparaciones realizadas en este trabajo, se basaron en la frecuencia con la que se encuentran los haplotipos colombianos en cinco cultivos: maíz, sorgo, algodón, arroz y pasto. En ésta caracterización se encontró que la mayoría de las secuencias analizadas pertenecían al haplotipo 1, tanto para el Tolima como para los demás departamentos de Colombia. El haplotipo 5, el cual es el segundo haplotipo más abundante, se encuentra más frecuente en el departamento del Tolima pero también se encuentra en el departamento de Antioquia y a diferencia del haplotipo 1, este haplotipo es casi exclusivo del cultivo de arroz, mientras que el haplotipo 1 se encontró principalmente en los cultivos de algodón, maíz y sorgo, demostrando que éste haplotipo representa al biotipo de maíz de *S. frugiperda* ya que en el trabajo realizado previamente por Vélez-Arango et al. (2008) se demostró que el biotipo de maíz se encuentra asociado a estos tres cultivos principalmente.

Resultados similares fueron encontrados por Lewter et al. (2006), ya que los autores observaron que existían tres haplotipos dentro del biotipo maíz que eran los más frecuentes en los Estados Unidos (CS-h1, CS-h2 y CS-h4) y un haplotipo menos frecuente (CS-h3). Los haplotipos CS-h2 y CS-h4 se encontraron más comúnmente en sorgo y maíz, el haplotipo CS-h1 más frecuente en sorgo y poco en maíz y el haplotipo CS-h3 casi exclusivo en el cultivo de sorgo. Nagoshi et al. (2007a), también observaron que la frecuencia de distribución de los haplotipos mencionados era muy diferente con respecto a las poblaciones brasileras ya que, los haplotipos CS-h1 y CS-h2 se encontraron en algodón, sorgo y maíz, mientras que el haplotipo CS-h4 se encontró en muy baja frecuencia y solamente en sorgo y maíz; el haplotipo CS-h3 no se localizó en las



poblaciones de Brasil. Estos resultados demuestran que los haplotipos CS-h1, CS-h2 y CS-h4 son haplotipos compartidos entre los Estados Unidos y Brasil, difiriendo cada uno en su patrón de distribución y frecuencia sobre su planta hospedera.

Para el caso de Colombia, después del haplotipo 1 – como el más frecuente, se encontró el haplotipo 4 en cultivos de arroz, el haplotipo 5 en cultivos de maíz y el haplotipo 9 en cultivos de maíz y arroz. A pesar que estos haplotipos colombianos se encuentran en la mayoría de los cultivos analizados por Lewter et al. (2006) y Nagoshi et al. (2007 a, b) en Estados Unidos y Brasil la conformación nucleotídica de las secuencias es diferente a la conformación de las secuencias colombianas y por ende en este trabajo no se encontró asociación de los haplotipos CS-h1, CS-h2, CS-h3 y CS-h4 con los haplotipos más frecuentemente encontrados para Colombia.

Según la tabla 10, el haplotipo 22 encontrado en el departamento del Meta es idéntico al haplotipo de Estados Unidos - SFU72974 -, significando que algunas poblaciones colombianas podrían estar en contacto con las poblaciones norteamericanas o que simplemente este haplotipo representa una secuencia ancestral del insecto que se preserva en nuestro país. Se debe tener en cuenta que este haplotipo está compuesto por un solo espécimen en el departamento del Meta y aunque fue colectado en el mismo cultivo de donde proviene la muestra de Estado Unidos – cultivo de maíz, podrían encontrarse algunas relaciones diferentes si se aumenta el tamaño de la muestra en esta localidad. Sin embargo, es importante evidenciar que la posible existencia de similitud genética entre las poblaciones de este insecto de América del Norte y América de sur, fue descrita por Nagoshi et al. (2007 b), quienes encontraron composiciones genéticas de algunos haplotipos similares cuando analizaron las poblaciones de *S. frugiperda* en Estados Unidos y Brasil.

La topología del árbol de Neighbor - Joining encontrada en el análisis de las muestras del Tolima, demuestra que una gran cantidad de individuos secuenciados se agrupan por su origen mitocondrial, es decir, individuos genotipificados por Vélez -Arango (2009) como biotipos de maíz e híbridos tipo H++ que comparten el origen materno del biotipo de maíz e individuos genotipificados como biotipos de arroz e híbridos tipo H - - que comparten el origen materno del biotipo de arroz. Adicionalmente, los haplotipos encontrados en este

departamento no mostraron una asociación a su planta hospedera en el árbol y por ello se dificultó encontrar agrupaciones de haplotipos relacionadas con el tipo de cultivo en donde fueron muestreadas. El árbol de Neighbor – Joining generado con las secuencias colombianas y norteamericanas no generó ninguna agrupación por tipo de cultivo o por departamento. Es importante resaltar que, las secuencias colombianas (teniendo en cuenta todos los departamentos) se agruparon aleatoriamente en el árbol de Neighbor Joining, a diferencia de las secuencias de los Estados Unidos, las cuales se agruparon en solo clado, junto con algunas secuencias de diferentes localidades colombianas (Tolima y Meta, particularmente).

Dentro de los departamentos analizados, se encontró que el Tolima es el departamento que mayor número de haplotipos únicos tienen (nueve) y seguido por Córdoba (5), Meta (4) y Antioquia (2). El Valle del Cauca al ser el único departamento sin haplotipos exclusivos podría representar una zona de Colombia en la que el flujo de individuos de *S. frugiperda* es alto al compartir haplotipos con los demás departamentos.

Las redes de expansión mínima de los haplotipos del Tolima y de los haplotipos colombianos y norteamericanos, reflejaron resultados similares a los obtenidos en el análisis de frecuencia de los haplotipos por cultivo y localidad al mostrar que los haplotipos 1, 5 y 11 (para Tolima) y los haplotipos 1 y 4 (para Colombia y Estados Unidos) son los más frecuentes. Sin embargo, cabe señalar que la red generada para Colombia y Estados Unidos mostro haplotipos que no fueron observados dentro del análisis, debido posiblemente al tamaño de la muestra de algunos departamentos o al déficit de cultivos analizados dentro de ciertas localidades. A pesar de esto, los resultados corroboran de manera precisa, la importancia de tener en cuenta haplotipos como el haplotipo 1 y 5 en los programas de monitoreo del insecto, ya que - a partir de análisis diferentes -, se muestran como los más frecuentes dentro del grupo de haplotipos encontrados en los cinco cultivos analizados.

Los resultados generales de este trabajo demuestran que hay migración de haplotipos de *S. frugiperda* en diferentes cultivos de Colombia y entre distintos departamentos (principalmente del haplotipo). En el estudio de estructura genética de poblaciones, el número de migrantes obtenido fue de 49.9 y 11.59 (para Tolima y Colombia, respectivamente); lo que indica que existe un flujo relativo de migrantes entre los cultivos y entre

los departamentos analizados en este estudio que permiten una rápida homogenización de las poblaciones de haplotipos colombianos.

Debido a la alta migración que presentan los haplotipos de *S. frugiperda*, no se encontró un valor significativo para el estadístico  $F_{ST}$  en el departamento del Tolima, lo cual indica que sus poblaciones (cultivos analizados) no se encuentran genéticamente estructuradas, implicando que los haplotipos de esta especie se mueven libremente entre los cultivos permitiendo homogenización de sus poblaciones. Por el contrario, Vélez-Arango (2009) encontró estructuración genética entre los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* para el marcador mitocondrial (*COI*) y para el marcador nuclear (*FR*). Adicionalmente, la autora analizó el número de migrantes entre cultivos ( $N_m$ ) demostrando que los individuos del biotipo de maíz se mueven libremente entre los cultivos de maíz, algodón y sorgo y restrictivamente en el cultivo de arroz, a diferencia de los individuos del biotipo de arroz los cuales se mueven más libremente entre cultivos de arroz y menos libremente en los otros cultivos (Vélez-Arango 2009). El libre movimiento de los individuos del biotipo de maíz entre los cultivos de maíz, algodón y sorgo encontrado por Vélez-Arango (2009), fue corroborado con los resultados obtenidos - para el departamento del Tolima - en éste trabajo, en el cual se encontró al haplotipo 1 como el haplotipo más frecuente, el cual migra en los tres cultivos mencionados con anterioridad, representando el biotipo de maíz identificado por Vélez-Arango (2009).

De forma contraria a lo encontrado en el Tolima, los resultados encontrados al analizar las poblaciones de los demás departamentos colombianos con las poblaciones norteamericanas, demostraron que la migración de *S. frugiperda* de América del Norte hacia América del Sur es tan limitada, que se genera una fuerte estructuración genética entre las poblaciones colombianas y las poblaciones de estos haplotipos en Estados Unidos. Lo anterior, permite corroborar lo planteado por Nagoshi et al. (2007 a, b), quienes sugieren la existencia de aislamiento geográfico entre las poblaciones de este insecto, generando una especificidad geográfica más que especificidad por la planta hospedera.

La distribución geográfica de *S. frugiperda* en todo el hemisferio occidental, se puede presentar como otro ejemplo de zonas de solapamiento (coexistencia) e hibridación de dos entidades biológicas que presentan

diferenciación genética y aislamiento reproductivo (Harrison 1993). Esto se explica dado que sus biotipos presentan asociación a diferentes plantas hospederas haciendo que su distribución sea en parches. Desde este punto de vista, el biotipo de maíz se encuentra distribuido a manera de parches en los cultivos de algodón, maíz y sorgo, mientras que el biotipo de arroz se encuentra en cultivos de arroz y maíz (Vélez-Arango 2009). Este caso de solapamiento o hibridación no es único, ya que en la naturaleza existen otros insectos que también producen este tipo de zonas de coexistencia e hibridación, tal como el caso de *Allonemobius fasciatus* y *Allonemobius socius* (Orthoptera: Gryllidae) en los Estados Unidos (Howard 1986, Howard y Warning 1991, Howard et al. 1993), en donde *A. fasciatus* es típico de zonas de suelo con humedad microtermal mientras que *A. socius* ocupa lugares de suelo con humedad mesotermal, haciendo que este insecto produzca parches en las zonas costeras en los Estados Unidos; a diferencia de *S. frugiperda* que se encuentra en una gran cantidad de cultivos en el hemisferio occidental. Otro ejemplo presente en la naturaleza, es la zona de hibridación entre *Chorthippus brunneus* y *Chorthippus jacobsi* (Orthoptera: Acrididae) en las montañas Cantábricas del norte de España, debido a que ambas especies de saltamontes se encuentran distribuidas en parches. En esta zona, *C. brunneus* es más abundante en los valles mientras que *C. jacobsi* es más abundante en las montañas (Saldamando et al. 2005 a y b). Estas dos especies de saltamontes también presentan una amplia distribución en Europa, pero a diferencia de *S. frugiperda* - que se encuentra en el hemisferio occidental -, *C. jacobsi* es casi exclusivo de España.

Por otro lado, las barreras de aislamiento reproductivo en *A. socius* y *A. fasciatus* y de *C. brunneus* y *C. jacobsi* al parecer son menos desarrolladas entre ellas respecto a *S. frugiperda*, ya que se ha encontrado una gran cantidad de híbridos entre estas dos especies de ortópteros. En el caso de *S. frugiperda*, a pesar de encontrarse cierta hibridación en la naturaleza, sus barreras de aislamiento reproductivo han sido importantes en el proceso de diferenciación genética entre sus biotipos, debido a que tienen barreras precigóticas de tipo comportamental (Pashley y Martin 1987), temporal (Pashley et al. 1992) y ecológico (Prowell et al. 2004), demostrándose que la selección natural está en contra de la hibridación de sus dos biotipos; mientras que en el caso de *A. socius* y *A. fasciatus* y de *C. brunneus* y *C. jacobsi*, las especies de *Allonemobius* solo presentan barreras postcigóticas de fertilización y no presentan aislamiento precigótico (Howard y Warning 1991, Howard et al. 1993) y las

especies de *Chorthippus* no presentan aislamiento postcigótico (Saldamando et al. 2005 a) pero si presentan aislamiento precigótico comportamental (Bailey et al. 2004) y ecológico (Bailey 2001, Saldamando 2004).

El valor encontrado para el índice de fijación -  $F_{ST}$  - en las poblaciones de haplotipos colombianos de *S. frugiperda* fue de 0.76812; éste valor es superior a los valores de  $F_{ST}$  reportados en algunas investigaciones dentro de los que se encuentran los datos obtenidos por Malausa et al. (2007) en la polilla *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) en Francia, la cual también se caracteriza por presentar asociación a plantas hospederas dentro de las que se encuentra la artemisia (*Artemisia vulgaris*), lúpulo (*Humulus lupulus*), ají dulce (*Capsicum frutescens*) y maíz. Los valores reportados por estos autores fueron de 0.05 entre los cultivos de maíz y artemisia, 0.08 entre los cultivos de maíz y lúpulo y 0.05 entre los cultivos de maíz y ají dulce. En el caso de *Helicoverpa zea* y *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) de Australia, China, India, Pakistan, Burkina Faso y Uganda, el valor obtenido de  $F_{ST}$  fue de 0.003112 (Behere et al. 2007). Estos autores argumentan que este valor tan bajo de  $F_{ST}$ , sugiere una alta movilidad de estas dos especies de insectos entre los países analizados, lo cual también es soportado por los valores de diversidad nucleotídica que también son bajos. El valor de  $F_{ST}$  para estas dos especies fue significativo, aunque mucho menor comparado con el valor de *S. frugiperda*. El gen analizado para *S. frugiperda* y *H. zea* y *H. armigera* fue el gen mitocondrial *COI*, mientras que para *O. nubilalis* los genes analizados fueron genes nucleares entre los que se encuentran *Tpi*, *Ket*, *Pbp* y *Mpi*, que son aloenzimas. En el caso del complejo de especies de la polilla *Tegeticula yuccasella* (Lepidoptera: Prodoxidae) en Nuevo México, Colorado, Uta, Arizona y California, el valor de  $F_{ST}$  obtenido fue de 0.228 utilizando el gen *COI* (Leebenes-Mack et al. 1998). En este caso, los autores analizaron una zona de hibridación entre dos especies de cultivos de yuca encontrando que además de encontrar estructura genética basados en un gen mitocondrial, también existe – aunque más baja- estructura genética al evaluar un gen nuclear ( $F_{ST} = 0.043$ ). Debido a estos resultados, los autores concluyen que existe un considerable flujo de genes y proponen que las barreras geográficas que interrumpen el patrón migratorio de la polilla es una limitante muy importante que afecta los cultivos de yuca que son polinizados exclusivamente por esta especie de lepidóptero.

Por otro lado, con relación a los valores de diversidad nucleotídica, polimorfismo nucleotídico y número de haplotipos encontrados en *S. frugiperda*, tanto para el Tolima ( $H = 18$ ,  $Hd = 0.926$ ,  $\pi = 0.14967$ ,  $\Theta = 0.16196$ ) como para Colombia ( $H = 43$ ,  $Hd = 0.912$ ,  $\pi = 0.18956$ ,  $\Theta = 0.18891$ ) fueron superiores a los valores obtenidos por Malausa et al. (2007) en *O. nubilalis*, ya que estos fueron valores de  $H = 28$ ,  $Hd = 0.74$ ,  $\pi = 0.00166$ ,  $\theta = 0.00358$  (gen *Tpi*);  $H = 23$ ,  $Hd = 0.893$ ,  $\pi = 0.00407$ ,  $\theta = 0.00650$  (gen *Ket*);  $H = 38$ ,  $Hd = 0.940$ ,  $\pi = 0.02101$ ,  $\theta = 0.02164$  (*Pbp*);  $H = 17$ ,  $Hd = 0.902$ ,  $\pi = 0.04935$ ,  $\theta = 0.003151$  (*Mpi*). Esto demuestra que la tasa de mutación en los genes mitocondriales es superior a la tasa de mutación de los genes nucleares, ya que - en general - los valores de *S. frugiperda* fueron más altos comparados con los valores obtenidos para *O. nubilalis*.

Finalmente, el tamaño efectivo ( $N_e$ ) de la población de *S. frugiperda*, se determinó que varía entre  $N_e = 1.600.000$  a  $1.900.000$  individuos, teniendo en cuenta los valores de  $\theta = 0.1619$  y  $\theta = 0.18891$ , respectivamente. Estos valores fueron muy altos comparados con los valores obtenidos para *O. nubilalis* los cuales fueron entre  $N_e = 150.000$  a  $200.000$  individuos. Esto quizá se deba a los métodos utilizados para la obtención de este estimador, ya que en este trabajo se reemplazó el valor de  $\theta$  a partir de la fórmula  $\theta = 2N_e\mu$  mientras que en el caso de *O. nubilalis* se utilizó un método de máxima verosimilitud para su estimación, incorporado en el programa IM (Isolation Model) (Hey y Nielsen 2004).

## 9. CONCLUSIONES

1. Se identificaron 18 haplotipos de *S. frugiperda* en el departamento del Tolima y 43 haplotipos en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca indicando que la diversidad haplotípica de *S. frugiperda* aumenta a medida que se amplía su rango de distribución geográfica en el país.
2. El árbol de Neighbor - Joining para el departamento del Tolima refleja que la asociación de los haplotipos de *S. frugiperda* se produce por el origen materno mitocondrial de los dos biotipos de esta especie, más que por la asociación a sus hospederos.
3. El haplotipo 1 encontrado en los departamentos tenidos en cuenta para este trabajo, se encontró principalmente en los cultivos de algodón, maíz y sorgo, los cuales son los cultivos en donde se encuentran con mayor frecuencia individuos del biotipo de maíz de esta especie. Esto significa que, muy posiblemente, este biotipo presenta mayor capacidad de dispersión en comparación con el biotipo de arroz.
4. El árbol de Neighbor - Joining con las muestras del Tolima no mostró agrupaciones que relacionaran especificidad por planta hospedera. Para las muestras colombianas con las norteamericanas, la topología encontrada evidenció una tendencia de distribución de los haplotipos de *S. frugiperda* que responde a cierta especificidad geográfica existente entre las poblaciones de Colombia y Estados Unidos, ya que se encontró que las secuencias de los haplotipos norteamericanos se unieron en un solo grupo genético, rodeadas por secuencias de poblaciones colombianas, las cuales no presentan especificidad geográfica o por planta hospedera y obedece a agrupaciones por similitud genética.

5. Se determinó que los haplotipos de *S. frugiperda* no producen poblaciones genéticamente estructuradas para los cultivos analizados dentro del departamento del Tolima. Sin embargo, se encontró estructuración genética al realizar comparaciones entre los departamentos colombianos con las poblaciones norteamericanas, demostrando que no existe un flujo genético considerable que permita que las poblaciones de este insecto se homogenicen a lo largo de su rango de distribución.
  
6. La realización de este tipo de estudios es importante debido a que en Estados Unidos se ha encontrado que el biotipo de maíz tiene una mayor capacidad de dispersión, comparada con la capacidad del biotipo de arroz; lo cual se corrobora en este estudio. Esto significa que la secuenciación de *S. frugiperda* es requerida en nuestro país para implementarla como herramienta en los programas de monitoreo de este insecto.
  
7. El alto número efectivo ( $N_e$ ) encontrado para *S. frugiperda* en este estudio demuestra que se deben realizar buenas estrategias de control de este insecto en la naturaleza, ya que representa casi ocho veces el tamaño efectivo de especies como *O. nubilalis*. Este alto número también podría reflejar una adaptación eficaz de la especie en los cultivos muestreados implicando el uso de diferentes estrategias de manejo del insecto enfocadas hacia el control de sus biotipos, los cuales han mostrado tener diferente comportamiento de resistencia a insecticidas y a diferentes cepas de *B. thuringensis*.



## 10. RECOMENDACIONES Y FUTURAS DIRECCIONES

1. Es recomendable secuenciar el gen *COI* a partir de larvas de *S. frugiperda* colectadas en los mismos departamentos analizados en este estudio teniendo en cuenta diferentes periodos del año para determinar si los haplotipos cambian su frecuencia en los cultivos muestreados, tal como ocurre con las poblaciones del haplotipo CS-h3 de Estados Unidos en cultivos de sorgo, las cuales fluctúan durante el mismo año.
2. Es recomendable analizar las secuencias de un gen nuclear en *S. frugiperda* para identificar los híbridos entre estos dos biotipos y determinar el papel que juega la introgresión de genes de un biotipo a otro.
3. Es importante tener en cuenta el uso de técnicas moleculares que garanticen la correcta amplificación del gen de importancia, tal como la clonación; ya que esta permite tener mayor fidelidad en los resultados de las muestras secuenciadas.

## 11. REFERENCIAS CITADAS

- ADAMCZYK, J. R., J. J. HOLLOWAY, J. W. LEONARD Y J. B. GRAVES. 1997. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic *Bt* cotton. *Journal of Cotton Science*. 1(1): 21-28.
- AGUDELO-SILVA, F. 1986. Naturally occurring pathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected on corn in Venezuela. *Florida Entomologist*. 69(4): 768-769.
- AKAIKE, H. 1974. "A new look at the statistical model identification". *IEEE Transactions on Automatic Control*. 19:716--722.
- ÁLVAREZ, L. R. Y F. GARCÍA. 1995. Comportamiento parasítico de *Telenomus* sp. en *Spodoptera frugiperda*. *Revista Colombiana de Entomología*. 21(4): 191-196.
- ASHLEY, T. R. 1979. Classification and Distribution of Fall Armyworm parasites. *Florida Entomologist*. 62(2): 114-123.
- ASHLEY, T.R. 1986. Geographical distribution y parasitization levels for parasitoids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Florida Entomologist*. 69: 516-524.
- ASHLEY, T. R.; BARFIELD, T. H.; WADDILL, V. H. Y E. R. MITCHEL. 1987. Parasitization of Fall Armyworm larvae on volunteer corn, bermudagrass, and paragrass. *Florida Entomologist*. 66(2): 267-271
- AVISE, J.C., J. ARNOLD, R.M. BALL, E. BERMINGHAM, T. LAMB, J.E. NEIGEL, C.A. REEB Y N.C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 489 – 522.
- BALLARD, J. W. y M. C. WITHLOCK. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. 13: 729–744.

- BARFIELD, C. S., J. L. STIMAC Y M. A. KELLER. 1980. State-of-the-art for predicting damaging infestations of fall armyworm. *Florida Entomologist*. 63(4): 364-375.
- BAILEY, R. I. 2001. Coexistence in a mosaic overlap zone in *Chorthippus* grasshoppers. Ph.D. thesis. University of Leeds. UK. 258p
- BAILEY, R. I., C. D. THOMAS, R. K. BUTLIN. 2004. Premating barriers to gene exchange and their implications in a mosaic hybrid zone between *Chorthippus brunneus* and *Chorthippus jacobsi*. *Journal of Evolutionary Biology*. 17: 108-119.
- BEHERE, G. T., W.T. TAY, D.A. RUSSELL, D.G. HECKEL, B.R. APPLETON, K.R. KRANTHI Y P. BATTERHAM. 2007. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. *BMC Evolutionary Biology*. 7, 117.
- BLACK W. C. Y N.M. DUTEAU. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: Crampton JM, Beard CB, Louis C, editors. *The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*, Chapman & Hall. pp. 361–373.
- BUSATO, G. R., A. D. GRÜTZMACHER, A. C. DE OLIVEIRA, E. A. VIEIRA, P. D. ZIMMER, M. M. KOPP, J.D.M. BYEIRA Y T. R. MAGALHANES. 2004. Analysis of the molecular structure and diversity of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to the corn and rice crops in Rio Grye do Sul state, Brazil. *Neotropical Entomology*. 33: 709-716.
- BUSTILLO, A. E. Y F. J. POSADA. 1986. Patogenicidad de un aislamiento de *Nomuraea rileyi* sobre larvas del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. *Revista Colombiana de Entomología*. 12(1): 5-15.
- CAMINERA, J. 2000. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). The University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. (UF/IFAS).

CHENNA R, H. SUGAWARA, T. KOIKE, R. LOPEZ, T.J. GIBSON, D.C. HIGGINS Y J.D. THOMPSON. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 31, 3497-3500.

CLARK, P. L., J. MOLINA-OCHOA, S. MARTINELLI, S. R. SKODA, D. J. ISENHOUR, D. J. LEE, J. T. KRUMM Y J. E. FOSTER. 2007. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. *Journal of Insect Science*. 7 (5): 1536 – 2442.

CLEMENT, M., D. POSADA, D. Y K. A. CRANDALL. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9(10): 1657 – 1660.

COYNE, J. A Y A. ORR. 2004. Speciation. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. United States of America. p. 125-175.

DEREEPER, A., V. GUIGNON, G. BLANC, S. AUDIC, S. BUFFET, F. CHEVENET, J. F. DUFAYARD, S. GUINDON, V. LEFORT, M. LESCOT, J. M. CLAVERIE y O. GASCUEL. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*. 2008 Jul 1; 36 (Web Server Issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19. ([PubMed](#))

DIEHL, S. R. Y G. L. BUSH. 1984. An Evolutionary and Applied Perspective of Insect Biotypes. *Annals of the Entomological Society*. 29: 471- 504.

DRÈS, M. Y J. MALLET. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Science*. 357: 471-492.

EXCOFFIER, L. 2001. Analysis of population subdivision, p. 271-307.

EXCOFFIER, L., P. E. SMOUSE Y 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.

- FORMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ Y R. VRIJENHOEK. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial *cytochrome oxidase* subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294 – 299.
- FOULDS, L.R., M. D. HENDY Y D. PENNY. 1979. A graph theoretic approach to the development of minimal phylogenetic trees. *Journal of Molecular Evolution*. 13, 127–149
- FREELAND, J. 2005. *Molecular Ecology*. Ed. Jonh Wiley & Sons. West Sussex. Enlgy.
- FRÉZAL, L. Y R. LEBLOIS. 2008. Four years of DNA Barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*. 8: 727 – 736.
- GARCÍA, F., M.T. MOSQUERA, C. VARGAS, Y L. A. ROJAS. 2002. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) plaga del maíz y otros cultivos en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 28: 53-60.
- GARDNER, W. A., N. RAYMOND Y R. D. SCHWEHR. 1984. The potential of microbial agents in managing populations of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*. 67(3): 325-332.
- GROOT, A. T., M. MARR, G. SCHOLF, S. LORENZ, A. SVATOS, Y D. G. HECKEL. 2008. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. *Frontiers in Zoology*. 5:20.
- GUINDON, S Y O. GASCUEL. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology*. 52: 696-704.
- HALL, T. A. 1999. Bioedit. A user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
- HARTL, D. L. Y A. G. CLARK. 1997. Principles of population genetics. Editorial Sinauer Associates Publishers.
- HARRISON, R. G. 1993. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford Univesity press, Inc.

- HASEGAWA, M., H. KISHINO Y T. YANO. 1985. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 22: 160–174.
- HEDRICK, P. W. 2004. Genetics of populations. Jones and Barlett Publishers. Sudbury Massachusetts.
- HEY, J. Y R. NIELSEN. 2004 Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167: 747–760.
- HOWARD, D. J. 1986. A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution*. 40: 34-43.
- HOWARD, D. J. Y G. L. WARING. 1991. Topographic diversity, zone width, and the strength of reproductive isolation in a zone of overlap and hybridisation. *Evolution*. 45: 1120-1135.
- HOWARD, D. J., G. L. WARING, C. A. TIBBETS Y P. G. GREGORY. 1993. Survival of hybrids in a mosaic hybrid zone. *Evolution*. 47: 789-800.
- HUDSON, R. R., M. SLATKIN Y W. P. MADDISON. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA Sequence Data. *Genetics*. 132: 583-589.
- HURST, D.D. Y F.M. JIGGINS. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the royal Society*. 272: 1525 – 1534.
- JUKES, T. H. Y C.R. CANTOR. 1969. Evolution of Protein Molecules, Academic Press, New York. pp. 21–132.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111–120.

- KNOWLTON, N. Y. L. A. WEIGHT. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society B*. 265: 2257 – 2263
- KUMAR, S, J. DUDLEY, M. NEI Y M. TAMURA. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 9: 299-306.
- LARKIN, M. A, G. BLACKSHIELDS, N. P. BROWN, R. CHENNA, P. A. MCGETTIGAN, H. MCWILLIAM, F. VALENTIN, I. M. WALLACE, A. WILM, R. LOPEZ, J. D. THOMPSON, T. J. GIBSON Y D. G. HIGGINS. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23, 2947-2948.
- LEEBENS-MACK, J., O. PELLMYR Y M. BROCK. 1998. Host specificity and the genetic structure of two yucca moths species in a yucca hybrid zone. *Evolution*. 52(5), 1376-1382.
- LEVY, H.C., A. GARCIA-MARUNIAK Y J. E. MARUNIAK. 2002. Strain Identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase subunit I gene. *Florida Entomologist*. 85: 186–190.
- LEWTER, J. A., A. L. SZALANSKI, R. N. NAGOSHI, R. L. MEAGUER, C. B. OWENS Y R. G. LUTTRELL. 2006. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*. 89(1): 63-67. 2006.
- LI, C.C. 1976. Population Genetics. Boxwood, Pacific Grove, California
- LIBRADO, P. Y J. ROZAS. 2009. DnaSP V5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- LÓPEZ-EDWARDS, M., J. HERNÁNDEZ-MENDOZA, L. PESCADOR-RUBIO, A. MOLINA-OCHOA, J. R. LEZMA-GUTIERREZ, HAMM, J. J Y B. R. WISEMAN. 1999. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. *Florida Entomologist*. 82: 254-262.

- LU, Y. J., M. J. ADANG, D. J. EISENHOUR Y G. D. KOCHERT. 1992. Restriction fragment length polymorphism analysis of genetic variation in North American populations of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Ecology*. 1: 199-208.
- LU, Y. J., G. D. KOCHERT, D. J. ISENHOUR, Y M. J. ADANG. 1994. Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Molecular Biology*. 3: 123-130.
- LU, Y. J. Y M. J. ADANG. 1996. Distinguishing fall army worm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. *Florida Entomologist*. 79: 48-55.
- LUGINBILL, P. 1928. The fall armyworm. U.S. *Department of Agriculture Technical Bulletin*. 34: 1-91.
- LYNCH, M. Y T.J. CREASE. 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution*. 7: 377-394.
- MALAUSSA, T., L. LENIAUD, J. MARTIN, P. AUDIOT, D. BOURGUET, S. PONSARD, S. F. LEE, R. G. HARRISON Y E. DOPMAN. 2007. Molecular differentiation at nuclear loci in French host races of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics*. 176(4), 2343-55.
- MALLET, J. 2001. Gene flow. Chapter 16. *Insect movement: Mechanism and consequences*. Ed. WOINWOD I.P., D.R. REYNOLDS Y C.D. THOMAS.
- MARTINELLI, S., P. L. CLARK, M. I. ZUCCHI, M. C. SILVA-FILHO, J. E. FOSTER Y C. OMOTO. 2007. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton field in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*. 97: 225-231.
- MASTERS, A. R., S. B. MALCOM Y L. P. BROWER. 1998. Monarch Butterfly (*Danaus plexippus*) thermoregulatory behavior and adaptations for overwintering in Mexico. *Ecology*. 69: 458-467
- McMICHAEL, M. Y D. P. PROWELL. 1999. Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Annals of the Entomological Society of America*. 92: 175-181.



- MEAGHER, R. L. Y M. GALLO-MEAGHER. 2003. Identifying host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Florida using mitochondrial markers. *Florida Entomologist*.86: 450-455.
- MEAGHER, R. L. Y R. N. NAGOSHI. 2004. Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in southern Florida. *Ecological Entomology*. 29: 614-620.
- MEDINA, M. C., P. D. CAMACHO, J. E. LUQUE Y A. SIABATTO. 1988. Ciclo de vida y descripción de *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae), Parásito de *Spodoptera* spp. *Revista Colombiana de Entomología*. 14(1): 13-21.
- MORILLO, F. Y A. NOTZ. 2001. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a la lambdacihalotrina y metomil. *Entomotropica*. 16(2): 79-87.
- NAGOSHI, R. D. Y R. L. MEAGHER. 2003 a. FR Tandem-Repeat Sequence in Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains. *Annals of the Entomological Society of America*. 96(3): 329-335.
- NAGOSHI, R. D. Y R. L. MEAGHER. 2003 b. Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the world indicate limitations in inter strain mating. *Insect Molecular Biology*. 12(5): 453-456.
- NAGOSHI, R. N. Y R. L. MEAGHER. 2004. Seasonal distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in agricultural and turf grass habitats. *Environmental Entomology*.33: 881-889.
- NAGOSHI, R. N., R. L. MEAGHER, J. J. ADAMCZYK, S. K. BRAMAN, R. L. BRYENBURG Y G. NUESSELY. 2006. New restriction fragment length polymorphisms in the cytochrome oxidase I gene facilitate host strain identification of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*. 99: 671- 677.
- NAGOSHI, R. N., P. SILVIE, R. L. MEAGHER JR., J. LOPEZ Y V. MACHADO. 2007 a. Identification and comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. *Annals of the Entomological Society of America*. 100: 394- 402.

NAGOSHI, R. N., P. SILVIE Y R. L. MEAGHER. 2007 b. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. *Journal of Economic Entomology*. 100(3): 954-961.

NAGOSHI, R. N., R. L. MEAGHER, K. FLANDERS, J. GORE, R. JACKSON, J. LOPEZ, J. S. ARMSTRONG, G. D BUNTIN, C. SANSONE Y R. LEONARD. 2008. Using haplotypes to monitor the migration of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Texas and Florida. *Journal of Economic Entomology*. 101(3): 742-749.

NEI, M. Y S. KUMMAR. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press.

PAIR, S. D., J. R. RAULSTON, D. R. RUMMEL, J. K. WESTBROOK, W. W. WOLF, A. N. SPARKS Y M. F. SCHUSTER. 1987. Development and production of corn earworm and fall armyworm in the Texas high plains: evidence for reverse fall migration. *Southwestern Entomologist*. 12: 89-99.

PASHLEY, D. P. 1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? *Annals of the Entomological Society of America*. 79: 898-904.

PASHLEY, D. P. 1988 a. The current status of fall armyworm host strains. *Florida Entomologist*. 71: 227-234.

PASHLEY, D. P. 1988 b. Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of fall armyworm. *Evolution*. 42: 93-102.

PASHLEY, D. P. Y J. A. MARTIN. 1987. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*. 80: 731-733.

PASHLEY, D. P., A.M. HAMMOND Y T. N. HARDY. 1992. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*. 85: 400-405.

PASHLEY, D. P., HARDY, T. N. Y A. M. HAMMOND. 1995. Host effects on developmental and reproductive traits in the armyworm strain (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*. 88: 748-755.

- PITRE, H. N. 1980. Relationships of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida, Honduras, Jamaica, and Mississippi: susceptibility to insecticides with reference to migration. *Florida Entomologist*. 71(1): 56-61.
- POSADA D. 2008. jModeltest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25 (7): 1253 – 1256.
- POSADA, D. Y T. R. BUCKLEY. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio test. *Systematic Biology*. 53 (5): 793 – 808.
- POSADA, D. Y K. A. CRANDALL. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology*. 50: 580-601.
- POSADA, D. Y K. A. CRANDALL. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14: 817 – 818.
- PROWELL, D. P., M. MCMICHAEL Y J. F. SILVAIN. 2004. Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*. 97: 1034-1044.
- QUISENBERRY, S. S. Y F. WHITFORD. 1988. Evaluation of bermudagrass resistance to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): influence of host strain and dietary conditioning. *Journal of Economic Entomology*. 81: 1463-1468.
- SALDAMANDO, C. I. 2004. Reproductive isolation in a hybrid zone between *Chorthippus brunneus* and *C. jacobsi* in Northern Spain. PhD thesis. University of Leeds, UK. 230p.
- SALDAMANDO, C. I., H. TATSUTA Y R. K. BUTLIN. 2005 a. Hybrids between *Chorthippus brunneus* and *C. jacobsi* (Orthoptera: Acrididae) do not show endogenous postzygotic isolation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 84: 195-203.

- SALDAMANDO, C. I., S. MIYAGUCHI, H. TATSUTA, H. KISHINO, J. BRIDLE Y R. K. BUTLIN. 2005  
b. Inheritance of song and stridulatory peg number divergence between *Chorthippus brunneus* and *C. jacobsi*, two naturally hybridising grasshopper species (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Evolutionary Biology*.18:703-712
- SARASTE, M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 23: 331 – 366.
- SCHNEIDER, S., D. ROESSLI, Y L. EXCOFFIER. 2000. Arlequin: A software for population genetic data. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SCHWARZ, G. 1978. "Estimating the Dimension of a Model" *Annals of Statistics*. 6: 461-464.
- SPARKS, A. N. 1979. A Review of the Biology of the Fall Armyworm. *Florida Entomologist*. 62(2): 82-87.
- TAJIMA, F. Y M. NEI. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 1: 269 - 285
- TEMPLETON, A. R. 2006. Populations genetics and microevolutionary theory. Chapter 1: Scope and Basic Premises of Population Genetics. Eds. John Wiley & Sons, Inc. p 700.
- TODD, E. L. Y R. W. POOLE. 1980. Keys and Illustrations for the Armyworm Moths of the Noctuid genus *Spodoptera* Guenee from the Western Hemisphere. *Annals of the Entomological Society of America*. 73: 722-738.
- TORRES, L. Y A. M. COTES. 2005. Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad y actividad biocontroladora de *Nomuraea rileyi* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 31(2): 133-138.
- VEENSTRA, K. H., D. P. PROWELL Y J. A. OTTEA. 1995. Host plant adaptation in fall armyworm host strains: comparison of food consumption, utilization, and detoxication enzyme activities. *Annals of Entomological Society of America*. 88: 80-91.
- VÉLEZ, R. 1997. Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: bionomía y manejo integrado. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. p. 275-284.

- VÉLEZ-ARANGO, A. M. 2009. Caracterización molecular y diferenciación genética de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivos de maíz, arroz y algodón del valle cálido alto del magdalena. Tesis de Magíster en Ciencias - Entomología. P 89.
- VÉLEZ-ARANGO, A. M., R. E. ARANGO, D. VILLANUEVA, E. AGUILERA Y C. I. SALDAMANDO. 2008. Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*. 34: 145-150.
- WHITFORD, F., S. S. QUISENBERRY, T. J. RILEY, Y J. W. LEE. 1988. Oviposition preference, mating compatibility, and development of two fall armyworm strains. *Florida Entomologist*. 71: 234-243.
- WHITFORD, F., S. S. QUISENBERRY, Y D. J. MOELLENBECK. 1992. Nutritional response by rice and corn fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains to dietary component substitution in artificial diets. *Journal of Economical Entomology*. 85: 1491- 1496.
- WILLIAMS S.T. Y N. KNOWLTON. 2001. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. *Molecular biology and Ecology*. 18: 1484 – 1493.
- WISEMAN, B. R. Y F. M. DAVIS. 1979. Plant Resistance to the Fall Armyworm. *Florida Entomologist*. 62(2): 123-129.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals in Eugenetics*. 1: 323-334
- YANG, Z. 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. *Journal of Molecular Evolution*. 39:105-111.
- YOUNG, J. R. 1979. Fall armyworm: control with insecticides. *Florida Entomologist*. 62: 130-133.
- ZHANG D. X. Y G. M. HEWITT. 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology* 25: 99 – 120.