

**ANÁLISIS DE POBLACIONES DE *PRODIPLOSIS LONGIFILA* (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE) SEPARADAS ALTITUDINALMENTE, MEDIANTE SECUENCIAS DE ADN MITOCONDRIAL**

**Sandra Marcela Velasco Cuervo**

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.  
correo electrónico: sandravelasco911012@gmail.com*

**Nelson Toro Perea**

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.  
correo electrónico: nelson.toro@correounivalle.edu.co*

**RESUMEN**

*Prodiplosis longifila* (Gagné) es una de las principales plagas del tomate en Colombia, una de las hortalizas más importantes de consumo y comercialización en el país. *P. longifila* presenta un amplio rango de distribución en Colombia, sin embargo, es posible que algunas variables asociadas al cambio en el gradiente altitudinal, podrían causar diferenciación entre poblaciones, como ocurre en otras especies de insectos terrestres, lo cual podría detectarse usando códigos de barras de ADN. Con el objetivo de detectar posibles haplogrupos atribuidos al gradiente altitudinal, se analizaron siete pares de localidades cercanas geográficamente, pero separadas altitudinalmente. El análisis del gen COI en especímenes de *P. longifila* mostró mediante el Análisis de Varianza Molecular que la mayor proporción de la varianza se debe a la variación intrapoblacional, y los valores de FST cercanos a cero ( $P > 0,05$ ) indican que no existe una estructura genética significativa entre poblaciones separadas altitudinalmente. Los análisis de distancia genética (K2P), mostraron valores interpopulacionales bajos entre 0,09% y 0,69% similares a los encontrados dentro de poblaciones. Finalmente, los análisis de agrupamiento confirman que no existen grupos atribuibles a regiones altas o bajas. En conclusión, los datos revelan que la altitud no tiene un efecto sobre la diferenciación poblacional de *P. longifila*, las cuales pueden mantener un alto flujo génico a pesar de la variación ambiental. Lo anterior explicaría porque este insecto-plaga tiene un amplio rango de distribución que podría estar asociado con la actividad antropogénica y probablemente con su alta capacidad adaptativa.

*Palabras clave: Citocromo c oxidasa I, Estructura Poblacional, Haplogrupos, Solanum lycopersicum.*

**ABSTRACT**

*Prodiplosis longifila* (Gagne) is one of the main pests of tomatoes in Colombia, one of the most important commercial crops for consumption. *P. longifila* has a wide range of distribution in Colombia. It is possible that some variables associated with the altitudinal gradient could be the cause of variations among populations, such as it those observed in other terrestrial insects. Such variations can then be detected with the use of DNA barcoding. With the objective of detecting possible haplogroups attributed to altitudinal zones, seven pairs of geographically adjacent but altitudinally separated populations were analyzed. The analysis of the COI gene in *P. longifila* specimens demonstrated through the Analysis of Molecular Variance that the majority of the variance was found within populations. The FST values were around zero ( $P > 0.5$ ) indicating that there is not significant genetic structure between populations separated by altitudinal gradients. The analysis of genetic difference (K2P), showed low interpopulational values between 0,09% and 0,69%, similar to values found within individual populations. Finally, the clustering analyses confirmed that there are no groups specific to high or low altitude. In conclusion, the data reveal that altitude has not effect on the differentiation of populations of *P. longifila*, which are able to maintain a high gen flow regardless of environmental factors. This would explain why this insect-pest has such a wide altitude range of distribution possibly associated with anthropogenic activity and its strong adaptive ability.

*Key words: Cytochrome c oxidase, Population Estructure, Haplogroups, Solanum lycopersicum.*

**INTRODUCCIÓN**

En Colombia, *Solanum lycopersicum* es la principal especie hortícola del país y su fruto es la estructura comercialmente valiosa que se constituye en un producto

de alto potencial de exportación, clave para la generación de empleo rural. Sin embargo, la producción de tomate de mesa en varias regiones de Colombia se encuentra limitada por el daño ocasionado por varias

especies de insectos plagas, entre las que se encuentran el barrendero del fruto *Neuleucinoides elegantilis* (Gene) (Lepidoptera: Crambidae), el cogollero *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), y el tostón *Prodiplosis longifila* (Gagné) ([www.ccci.org.co](http://www.ccci.org.co)).

*Prodiplosis longifila* Gagné, 1986 (Citado por Peña *et al.* 1989) está clasificada en la familia Cecidomyiidae (Diptera), que como familia comprende especies en su mayoría fitófagos, formadores de agallas. Inicialmente se reportó que *P. longifila* se alimentaba en flores de lima (*Citrus x aurantifolia*) en Florida (Estados Unidos). En Colombia, Perú y Ecuador se ha reportado como plaga del tomate, papa, alfalfa y otros cultivos de estos países. Las larvas destruyen completamente los ovarios de las flores y pueden causar abscisión prematura de las mismas (Peña *et al.* 1989). Según Delgado *et al.* (1999) desde 1994 se ha observado un incremento notable de las poblaciones de *Prodiplosis longifila*, hasta adquirir el “status” de un insecto de importancia económica o plaga clave para los cultivos debido a que afecta los rendimientos y la productividad. De acuerdo con Manzano MR (comunicación personal), el tostón es una de las plagas que más causa daño en los cultivos de tomate en nuestro país y otros países como Ecuador. La investigadora Manzano ha obtenido información a partir de una muestra de tomates, cosechados en un lote comercial de Palmira (Valle del Cauca), donde encontró que más del 50% de los frutos mostraban daño ocasionado por insectos, de los cuales el 10,6% fue atribuido a *Scrobipalpula absoluta* y el 42,9% daño por *Prodiplosis longifila* (datos no publicados). Desde las primeras explosiones poblacionales del insecto se ha tratado de controlarlo con el uso de agroquímicos de amplio espectro (Delgado *et al.* 1999). Sin embargo, debido a la falta de un mejor conocimiento de la biología de la especie, es poco lo que se ha podido avanzar en el manejo y el control biológico de esta plaga, por lo tanto, debe considerarse de carácter prioritario dirigir estudios que permitan recopilar información sobre este insecto, desde diferentes campos, como la morfología, la ecología y la genética, y su relación con el hospedero y el ambiente.

Hasta el momento, la descripción del insecto ha sido realizada mediante caracteres morfológicos de la genitalia del macho, sin embargo, de acuerdo con Calvert *et al.* (2005), los caracteres morfológicos pueden variar con respecto a los factores ambientales dentro de una sola especie (biotipos ó ecotipos), o ser tan convergente y críptico entre especies estrechamente relacionadas que los análisis moleculares pueden resultar útiles para delimitarlas o diferenciar, por ejemplo, haplogrupos asociados a factores ambientales. Estudios encami-

nados a evaluar la diversidad genética dentro de una especie y su relación con un gradiente altitudinal, han demostrado que este factor tiene un impacto importante sobre las especies en la formación de biotipos e incluso, a largo plazo, en eventos de especiación. Según Blanckenhorn (1997), en comparación con otros parámetros como la latitud, la variación altitudinal se produce en distancias mucho más cortas.

Entre las técnicas moleculares más usadas para identificar y separar especies estrechamente relacionadas y resolver complejos de especies, está el análisis con código de barras usando el gen de la citocromo oxidasa I (COI). El gen COI ubicado en el genoma mitocondrial presenta regiones que evolucionan a diferentes tasas, teniendo sitios altamente conservados y otros con una variabilidad considerable, lo que soporta la popularidad del ADN mitocondrial animal y más exactamente del gen COI como una herramienta molecular de alta resolución para resolver filogenias intraespecíficas como también, de taxones divergentes muy antiguos a niveles taxonómicos superiores (Lunt *et al.* 1996). La técnica del código de barras permite comparar las secuencias nucleótido a nucleótido y con base en un umbral de divergencia (evaluado porcentualmente) permite establecer que tan diferentes son los individuos. Según varios reportes encontrados para diferentes taxones de animales su utilidad como marcador ha sido reportado en comparaciones entre Phyla (Hebert *et al.* 2003a), artrópodos (Opell 2006), insectos (Hebert *et al.* 2003b; Hebert *et al.* 2004) y específicamente dípteros (Smith *et al.* 2005; Meier *et al.* 2006).

Bálint *et al.* (2011) estudiaron la “biodiversidad críptica” de 7 especies de Trochoptera (*Chaetopterygopsis maclachlani*, *Drusus discolor*, *Drusus romanicus*, *Hydropsyche tenuis*, *Rhyacophila aquitana*, *Rhyacophila carpathica* y *Rhyacophila pubescens*), Ephemeroptera (*Ameletus inopinatus*) y Plecoptera (*Arcynopteryx compacta*) en los Montes Alpinos (Europa) a grandes altitudes (microclimas fríos) con base en datos obtenidos a partir del análisis de la región mitocondrial COI, encontrando “Unidades Evolutivas Significativas” (ESU, por su siglas en inglés) para 5 de las especies evaluadas con un umbral de divergencia de secuencias del 2%. Lo anterior evidencia como los análisis con el gen COI permiten dilucidar las relaciones que existen entre los individuos entre y dentro de cada población, y por ende, se considera que permitiría entender las relaciones actuales en poblaciones de *P. longifila*.

En nuestro estudio el análisis de secuencias del gen COI en poblaciones de *P. longifila* constituye un primer acercamiento hacia el conocimiento de la diversidad genética de esta plaga en poblaciones del insecto que afectan cultivos de tomate cercanos geográficamente,

pero que se encuentran bajo la influencia de factores ambientales determinados por un gradiente altitudinal. La detección de haplogrupos o, en caso contrario, la ausencia de ellos permite entender la estructura genética de las poblaciones de *P. longifila* a nivel altitudinal; las características del gen COI permiten evaluar la diversidad genética de estas poblaciones al compararlas de manera pareada (a una distancia geográfica cercana) y comprender a nivel altitudinal lo que esta ocurriendo entre ellas, de tal manera que se pueda inferir si el gradiente altitudinal, en este caso, es un factor que da lugar o no a variantes genéticas. Estos resultados, complementarios a la morfología, ecología y comportamiento del insecto podrían aplicarse en futuros programas de control para esta plaga, que causa grandes pérdidas en la producción de *S. lycopersicum* en el país, cuyo fruto constituye una estructura comercialmente valiosa con un alto potencial de exportación.

El presente estudio evaluó la existencia de haplogrupos en *P. longifila*, asociados a un gradiente altitudinal en cultivos de tomate de Colombia y Ecuador. Para esto, se emplearon técnicas moleculares y se analizaron secuencias del gen mitocondrial COI.

## MÉTODOS

**Área de estudio.** Se muestrearon en total 11 poblaciones de *Prodiplosis longifila*, dos ubicadas en la provincia de Imbabura en Ecuador y nueve en los departamentos de Santander, Caldas y dos regiones del

Valle del Cauca (Sur y Norte) en Colombia. Para este estudio se seleccionaron poblaciones por provincia, departamento o región separadas por un gradiente altitudinal pero con distancias geográficas cortas con el objetivo de descartar la posible variación genética que se pudiera presentar por este último factor. Todas las áreas de estudio tenían como cultivo principal el tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*) de diversas variedades. Los datos de altitud, posición geográfica y variación altitudinal entre las localidades comparadas se muestra en la Tabla 1.

**Fase de campo.** El muestreo fue realizado por el Grupo de Investigación de Interacciones Triteróficas de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira.

La recolecta de especímenes de *P. longifila* se realizó en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) Tabla 1, a partir de plantas seleccionadas al azar. Los insectos (en diferentes estados de desarrollo) se recolectaron por medio de aspirador bucal. Las pupas se conservaron en una cámara ambiental en la Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira, hasta que emergieron los adultos. La determinación morfológica de la especie se realizó de acuerdo con Gagné (1986), por observación de caracteres morfológicos al microscopio.

**Fase de laboratorio.** Las técnicas moleculares se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular en la Universidad del Valle.

**Tabla 1.** Posición geográfica y altura sobre el nivel del mar de cada localidad de procedencia de las muestras de *P. longifila* diferencia altitudinal entre pares de localidades comparadas.

País (Departamento ó Provincia)	Localidad	msnm (m)	Posición Geográfica	Diferencia de altura (m)
Ecuador (Imbabura)	Ibarra	1464	00°27'45,4"N,078°00'34,7"W	189
	Chota	1653	00°34'04,1"N,078°08'01,0"W	
Colombia (Valle del Cauca - Sur)	Palmira	949	03°37'30"N,076°24'39,5"W	242
	Restrepo	1182	03°45'01,4"N,076°34'06,8"W	
Colombia (Caldas)	Palestina	1531	05°00'30,1"N,075°37'42,4"W	244
	Aguadas	1775	05°36'26,0"N,075°29'03,3"W	
	Manizales	1261	05°01'24,6"N,075°34'56,0"W	279
	Palestina	1531	05°00'30,1"N,075°37'42,4"W	
	Manizales	1261	05°01'24,6"N,075°34'56,0"W	514
	Aguadas	1775	05°36'26,0"N,075°29'03,3"W	
Colombia (Valle del Cauca - Norte)	Bolívar	953	04°15'13,1"N,076°13'24,6"W	559
	El Dovio	1515	04°31'26,3"N,076°13'10,1"W	
Colombia (Santander)	San Gil	1080	06°30'26,1"N,073°07'35,8"W	670
	Curití	1750	06°37'15,4"N,073°01'57,7"W	

Se emplearon la cabeza, el tórax y las patas de individuos adultos de *Prodiplosis longifila* para realizar la extracción de ADN, con el kit comercial DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN), y de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se emplearon entre cinco y diez individuos por localidad de muestreo para un total de 115 individuos. La cuantificación del ADN se realizó con fluorímetro (NanoDrop).

Para la obtención de la región mitocondrial COI, se empleó la pareja de cebadores LCO1490/ HCO2198. Esta región incluye las partes más variables del gen COI siendo adecuada para estudios intra-específicos (Folmer *et al.* 1994). El coctel de amplificación fue modificado a partir de Ruiz *et al.* (2010), para un total de 25  $\mu$ l por cada reacción con 1X de Buffer PCR, 0,05mM de dNTPs, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2U de Taq ADN polimerasa, 0,25  $\mu$ M de cada cebador y 5  $\mu$ l de ADN (con una concentración promedio de 4ng/ $\mu$ l). El perfil térmico (modificado a partir de Folmer *et al.* 1994) fue: desnaturalización inicial a 92 °C por cinco minutos, 35 ciclos a 94 °C por treinta segundos, alineamiento a 52 °C por un minuto y extensión a 72 °C por un minuto, y una extensión final a 72 °C por cinco minutos. La visualización de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5X (tris-borato 0,045M, EDTA 0,001M) a 100V por 30 minutos, con tinción de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml y visualizados con transiluminador de luz ultravioleta.

La secuenciación de los fragmentos fue directa y bidireccional y se realizó a través de un proveedor especializado (MACROGEN).

**Análisis de datos.** Las secuencias obtenidas después de la amplificación fueron editadas manualmente con el software Sequencher (GenCode) y alineadas mediante el software Clustal X2 (Larkin *et al.* 2007). La distancia genética entre pares de secuencias se obtuvo usando el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura de dos parámetros (K2P). Árboles filogenéticos fueron construidos con base en el método de agrupamiento por Neighbor-Joining a partir de las distancias genéticas (K2P) calculadas entre pares de poblaciones separadas por un gradiente altitudinal usando el software MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). El grupo externo utilizado para enraizar el árbol fue el género *Dasineura* sp. (Diptera: Cecidomyiidae). El soporte estadístico de los nodos de la topología fue evaluado mediante 1050 “bootstraps”, correspondiente a un intervalo de confianza del 95 % (Singh & Xie 2010).

Se estimó el porcentaje de sitios polimórficos y la diversidad y frecuencia haplotípica de las poblaciones comparadas usando el software Arlequin

3.1 (Excoffier *et al.* 2005). La estructura genética fue evaluada mediante el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), para cada par de poblaciones comparadas con dos niveles de jerarquía, entre y dentro de poblaciones, también se calcularon los valores de FST correspondientes entre pares de poblaciones usando Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

## RESULTADOS

El uso de las técnicas de amplificación y de secuenciación permitieron caracterizar una región del gen COI correspondiente a 658 p.b. con un total de ocho haplotipos diferentes en todos los individuos muestreados (Apéndice 1).

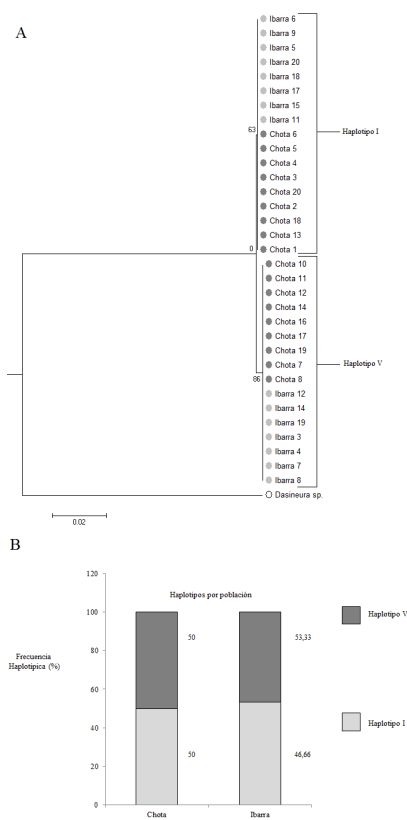
Las distancias genéticas promedio intra e interpopulacionales obtenidas con K2P estuvieron por debajo del 1%. Dentro de poblaciones los valores estuvieron entre 0,05% y 0,37% y entre poblaciones varió entre 0,09% y 0,69% (Tabla 2). Solamente 1,52% de los sitios fueron polimórficos (10 sitios en 658 p.b.) de los cuales el 70% fueron transiciones (7 cambios nucleotídicos) y 30% transversiones (3 cambios nucleotídicos) (Apéndice 1). La similitud de las frecuencias haplotípicas al comparar pares de localidades dependió básicamente de los haplotipos compartidos y únicos por localidad, siendo muy similar la frecuencia de cada haplotipo entre las poblaciones de Chota e Ibarra y Palmira y Restrepo (Fig. 1b, Fig. 2b).

Con respecto a las topologías entre pares de localidades no se presentaron agrupamientos que pudieran atribuirse al gradiente altitudinal. En el caso de Chota-Ibarra y Palmira-Restrepo las poblaciones comparadas, de manera pareada, tenían los mismos haplotipos, en el caso de Chota-Ibarra (Fig. 1b) los haplotipos I y V únicos para Ecuador, y para Palmira-Restrepo (Fig. 2b) los haplotipos II y VII con frecuencias muy similares, los agrupamientos encontrados en las topologías contienen individuos pertenecientes a ambas localidades para ambas comparaciones (Fig. 1a, Fig. 2a). Entre Palestina y Aguadas (Fig. 3a) se observa un haplotipo único para Palestina representado por un solo individuo, por ende con una frecuencia muy baja (Fig. 3b) que forma un clado aparte en la topología, pero tal haplotipo es compartido con la localidad de Manizales y mucho mejor representado en esa topología. Entre Manizales y Palestina (Fig. 4a) tampoco se ven agrupamientos atribuibles al gradiente altitudinal, y el haplotipo más altamente representado tiene frecuencias similares para ambas poblaciones (Fig. 4b). Entre Manizales y Aguadas (Fig. 5a) tampoco se registran agrupamientos atribuibles a

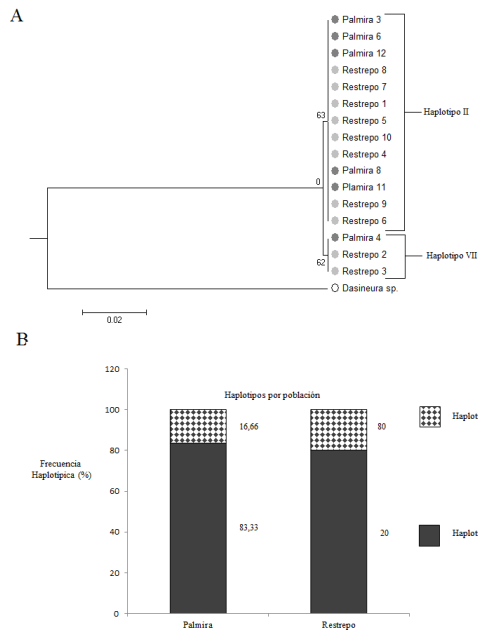
**Tabla 2.** Distancias genéticas promedio con base en el modelo de sustitución nucleotídica K2P con desviación estándar dentro y entre pares de poblaciones de *P. longifila* separadas altitudinalmente.

Pais (Departamento ó Provincia)	Localidad	Distancia Genética Intrapoblacional Promedio KP2( %)	Desviación Estándar	Distancia Genética Interpoblacional Promedio KP2( %)	Desviación Estándar
Ecuador (Imbabura)	Ibarra	0,18	0,0033	0,69	0,0031
	Chota	0,17	0,0032		
Colombia (Valle del Cauca - Sur)	Palmira	0,10	0,0012	0,09	0,0006
	Restrepo	0,10	0,0012		
Colombia (Caldas)	Palestina	0,13	0,0007	0,24	0,0014
	Aguadas	0,16	0,0010		
	Manizales	0,23	0,0014	0,18	0,0010
	Palestina	0,13	0,0007		
	Manizales	0,23	0,0014		
Colombia (Valle del Cauca - Norte)	Bolívar	0,14	0,0009	0,21	0,0013
	El Dovio	0,25	0,0014		
Colombia (Santander)	San Gil	0,05	0,0005	0,27	0,0013
	Curití	0,37	0,0018		

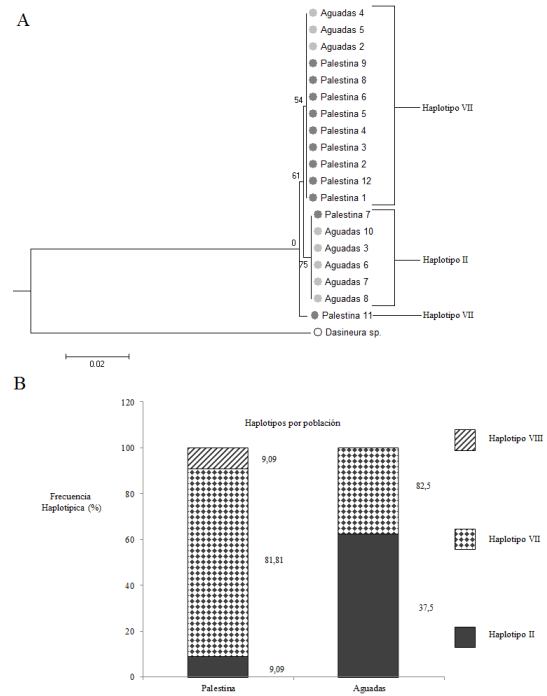
la altura sobre el nivel del mar, y solo hay un clado que representa un haplotipo único para Manizales, y se observan frecuencias haplotípicas contrastantes para los haplotipos compartidos (Fig. 5b), de tal manera que los haplotipos compartidos son más frecuentes en una de las poblaciones que en la otra. La filogenia obtenida para El Dovio-Bolívar (Fig. 6a) muestran resultados similares a los anteriormente descritos, donde no se evidencian agrupamientos asociados al gradiente altitudinal, ya que el haplotipo único encontrado para el Dovio es compartido con otras localidades a diferentes distancias geográficas y que son registradas tanto a alturas similares (Palestina) como con otras poblaciones ubicadas a menor altura (Manizales); las frecuencias haplotípicas de los haplotipos compartidos (Fig. 6b) son más similares en el Dovio que en Bolívar, donde hay más representación para el haplotipo II. Finalmente la topología para Curití y San Gil (Fig. 7a) muestran un haplotipo compartido y un haplotipo único para cada localidad, evidenciado en tres clados diferentes de los cuales se podría considerar que corresponden a grupos atribuibles a la altura sobre el nivel del mar (Fig. 7b), pero debido a la baja representatividad de individuos se recomendaría un muestreo más robusto, de tal manera que las frecuencias para los haplotipos únicos pudieran ser mejor representadas para afirmar que existen grupos asociados a la altura, lo que no se confirma con los análisis estadísticos.



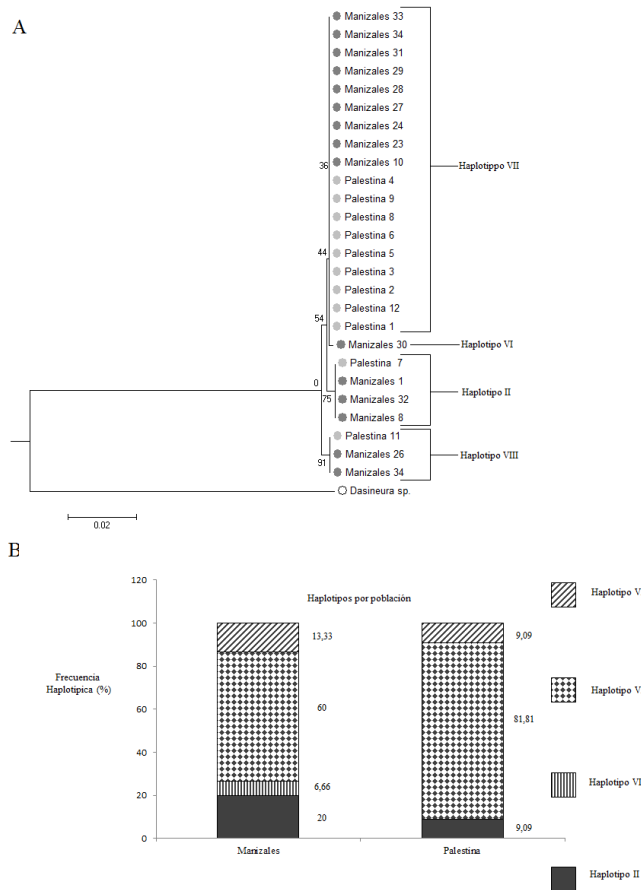
**Figura 1.** Comparación de las topologías y frecuencias haplotípicas entre las localidades de Chota e Ibarra (Provincia de Imbabura - Ecuador). **(A)** Topología con base en agrupamiento por Neighbor-Joining y el modelo de sustitución nucleotídica K2P, y clados con los haplotipos II Y V; **(B)** Frecuencias haplotípicas. Se observa una composición haplotípica idéntica para las localidades de Ibarra y Chota, con frecuencias del haplotipo I del 53,33% para Ibarra y 50% para Chota. Para el caso del haplotipo V, también se reportan frecuencias similares para cada localidad, siendo 46,66% para Ibarra y 50% para Chota.



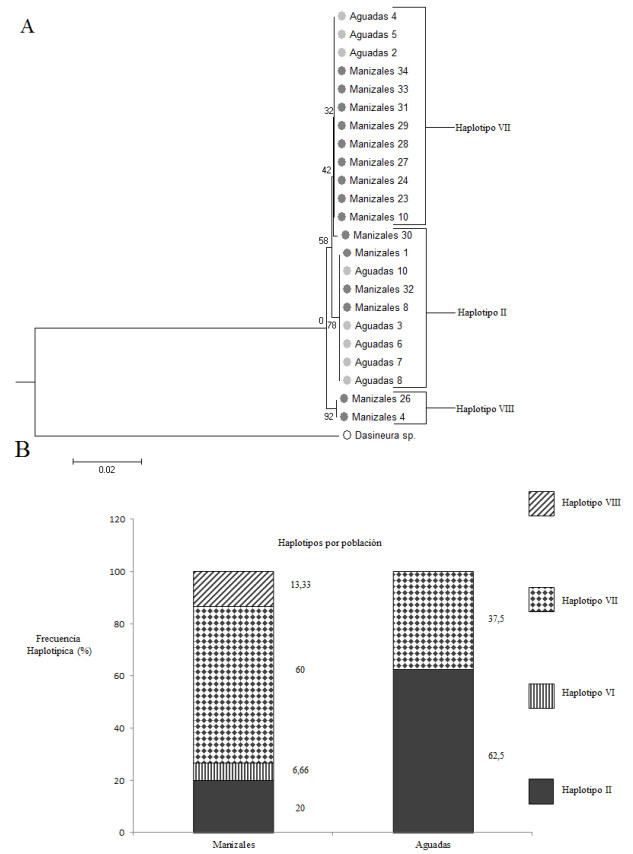
**Figura 2.** Comparación de las topologías y frecuencias haplotípicas entre las localidades de Palmira y Restrepo (Valle del Cauca Sur - Colombia). **(A)** Topología con base en agrupamiento por Neighbor-Joining y el modelo de sustitución nucleotídica K2P, y clados con los haplotipos II y VII; **(B)** Frecuencias haplotípicas. Se observa la misma composición haplotípica para ambas poblaciones, siendo el haplotipo II más frecuente, con una representación del 83,33% en Palmira y 80% en Restrepo; El haplotipo VII se encuentra en una menor frecuencia, de 16,66% en Palmira y 20% en Restrepo.



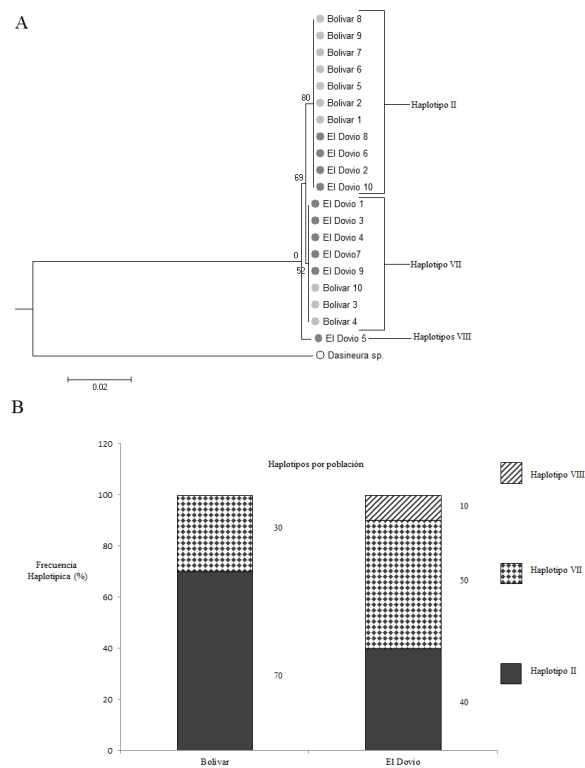
**Figura 3.** Comparación de las topologías y frecuencias haplotípicas entre las localidades de Palestina y Aguadas (Caldas - Colombia). **(A)** Topología con base en agrupamiento por Neighbor-Joining y el modelo de sustitución nucleotídica K2P, y clados con los haplotipos II, VII y VIII; **(B)** Frecuencias haplotípicas. La composición haplotípica no es igual entre el par de poblaciones comparadas, se reportan para la localidad de Palestina frecuencias de 9,09% para el haplotipo II, 81,81% para el haplotipo VII y 9,09% para el haplotipo VIII; para la localidad de Aguadas se reportan frecuencias de 62,5% para el haplotipo II y 37,5% para el haplotipo VII.



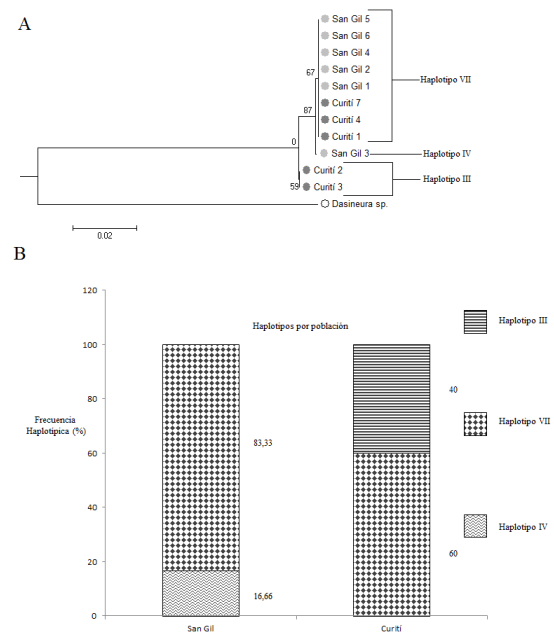
**Figura 4.** Comparación de las topologías y frecuencias haplotípicas entre las localidades de Manizales y Palestina (Caldas - Colombia). **(A)** Topología con base en agrupamiento por Neighbor-Joining y el modelo de sustitución nucleotídica K2P, y clados con los haplotipos II, VI, VII y VIII; **(B)** Frecuencias haplotípicas. La composición haplotípica no es igual entre las poblaciones de Manizales y Palestina, pero el haplotipo VII es el más frecuente en ambas, con valores de 60% y 81,81% respectivamente. Se reporta para Manizales frecuencias de 20% para el haplotipo II y 6,66% para el haplotipo VI; para Palestina se reportan frecuencias de 9,09% tanto para el haplotipo II como el VIII.



**Figura 5.** Comparación de las topologías y frecuencias haplotípicas entre las localidades de Manizales y Aguadas (Caldas - Colombia). **(A)** Topología con base en agrupamiento por Neighbor-Joining y el modelo de sustitución nucleotídica K2P, y clados con los haplotipos II, VII y VIII; **(B)** Frecuencias haplotípicas. La composición haplotípica no es igual entre los pares de poblaciones comparadas, se reporta para Manizales frecuencias de 20% para el haplotipo II, 6,66% para el haplotipo VI y 60% para el haplotipo VII; para la población de Aguadas se reportan frecuencias de 62,5% para el haplotipo II y 37,5% para el haplotipo VII.



**Figura 6.** Comparación de las topologías y frecuencias haplotípicas entre las localidades de Bolívar y El Dovio (Valle del Cauca Norte - Colombia). (A) Topología con base en agrupamiento por Neighbor-Joining y el modelo de sustitución nucleotídica K2Py clados con los haplotipos II, VII y VIII; (B) Frecuencias haplotípicas. La composición haplotípica no es igual para las localidades de Bolívar y El Dovio, se reportaron frecuencias haplotípicas de 70% para el haplotipo II y 30% para el haplotipo VII en la población de Bolívar, y frecuencias de 40% para el haplotipo II, 50 % para el haplotipo VII y 10% para el haplotipo VII en la población de El Dovio.



**Figura 7.** Comparación de las topologías y frecuencias haplotípicas entre las localidades de San Gil y Curití (Santander - Colombia). (A) Topología con base en agrupamiento por Neighbor-Joining y el modelo de sustitución nucleotídica K2P, y clados con los haplotipos III, IV y VII; (B) Frecuencias haplotípicas. La composición haplotípica es la mas disimil entre todos los pares de poblaciones comparadas. Se observa que el haplotipo VII es el más frecuente en ambas poblaciones con una frecuencia de 83,33% en San Gil y 60% en Curití. Se reporta un haplotipo único para cada población, en San Gil el haplotipo IV con una frecuencia de 16,66% y en Curití el haplotipo III con una frecuencia de 40%.

**Tabla 3.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para cada par de localidades comparadas, FST y p-valor. Se evalúa la estructura genética de las poblaciones compradas y los valores de FST muestran una estructura genética débil e incluso en algunos casos ausente.

País (Departamento ó Provincia)	Localidad (msnm)	Porcentaje de Variación (%)		FST	P-VALOR
		Entre poblaciones	Dentro de cada población		
Ecuador (Imbabura)	Ibarra (1464)	-5,30	105,30	-0,05304	0,91789+- 0,00759
	Chota (1653)				
Colombia (Valle del Cauca - Sur)	Palmira (949)	-14,96	114,96	-0,14961	1+- 0,00000
	Restrepo (1182)				
Colombia(Caldas)	Palestina (1531)	8,31	91,69	0,08315	0,32747+- 0,01387
	Aguadas (1775)				
	Manizales (1261)	-5,56	105,56	-0,05564	0,83388+- 0,01256
	Palestina (1531)				
Colombia (Valle del Cauca - Norte)	Manizales (1261)	16,93	83,07	0,16931	0,08016+- 0,00989
	Aguadas (1775)				
Colombia (Valle del Cauca - Norte)	Bolívar (953)	5,80	94,20	0,054797	0,34897+- 0,01668
	El Dovio (1515)				
Colombia (Santander)	San Gil (1080)	25,93	74,07	0,25931	0,1652+- 0,01069
	Curití (1750)				



Los análisis de varianza molecular (Tabla 3) mostraron, en todos los casos, que el mayor porcentaje de variación se debe a la variación que existe dentro de cada población más que a la que existe entre poblaciones, debido a que en la mayoría de los casos la composición haplotípica de las poblaciones comparadas es igual. En los casos donde se presenta una mayor diferencia en altitud entre las poblaciones o donde existen haplotipos únicos por localidad, se observan porcentajes de variación dentro de poblaciones menores que los casos donde la composición haplotípica entre poblaciones es igual, pero en todos los casos el componente de variación intrapoblacional explica la mayor parte de los resultados. En el caso de Curití y San Gil, se reporta el porcentaje de variación genética entre poblaciones más alto en comparación con las otras parejas analizadas, y el porcentaje de variación dentro de cada población más bajo entre todas las comparaciones realizadas, lo que soporta que en un momento dado las diferencias altitudinales entre las poblaciones podrían estar causando diferenciación genética. Los valores de  $F_{ST}$  encontrados para todos los pares de poblaciones comparadas (Tabla 3) revelaron una estructura genética débil entre las poblaciones comparadas y confirman que no existen diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre poblaciones.

## DISCUSIÓN

La técnica del código de barras de ADN con base en el gen de la citocromo oxidasa I, demostró ser una herramienta eficiente para analizar la relación entre los individuos y las poblaciones bajo estudio, usando modelos de distancia genética y agrupamientos. Se pudo evidenciar con este trabajo que el gradiente altitudinal no está dando lugar a variantes genéticas en respuesta a las condiciones ambientales, es decir que los individuos de *P. longifila* incluidos en este estudio pertenecen a una sola unidad taxonómica que afecta los cultivos de tomate independientemente de la altitud. Esto se puede afirmar con base en lo propuesto por Hebert *et al.* (2004), quienes determinaron que valores estimados de 1-3% de divergencia en el ADN mitocondrial sugieren variación intraespecífica y valores mayores al 3% podrían estar delimitando especies (presencia de especies crípticas). Las medidas de distancia genética interpoblacional obtenidas en este estudio estuvieron por debajo del 1%, por lo que la variación genética encontrada corresponde a variación intraespecífica según los valores reportados por Hebert *et al.* (2004). Así mismo, al comparar los datos con otros autores que reportan unidades evolutivamente significativas (ESUs) con una divergencia del 2% (Bálint *et al.* 2011), se evidencia que no existe una diversidad críptica entre las poblaciones analizadas y que los

haplotipos no están restringidos geográficamente a una zona altitudinal entre pares de poblaciones separadas en este gradiente, por lo que se sugiere que existe un intercambio génico constante entre las poblaciones, indicando que *P. longifila* podría estar adaptada a las condiciones ambientales determinadas por el gradiente altitudinal, y que por ende este no es un factor determinante en la diferenciación genética de poblaciones de *P. longifila* en cultivos de tomate. Otros autores, además, señalan que la divergencia entre individuos (insectos) co-específicos debe ser en promedio del 0,25% (evaluado en una especie de Lepidóptero) (Hebert *et al.* 2004; Vences *et al.* 2005; Lanteri 2007). En este estudio la mayoría de las distancias genéticas obtenidas dentro de poblaciones estuvo por debajo de 0,25%, (con excepción de Curití con 0,37%). En el caso de las distancias genéticas interpoblacionales los datos obtenidos también son muy similares al valor reportado por Hebert *et al.* (2004) (0,25%), y aunque se reportó un valor superior (0,69%) para las poblaciones de Chota-Ibarra, está dentro de los valores estándar estimados para la variación intraespecífica y además los análisis estadísticos confirman que no existe diferenciación genética significativa entre estas dos poblaciones.

Estudios taxonómicos realizados con la técnica de códigos de barras de ADN y con complejos de especies también se han conducido en algunos casos al reconocimiento de especies crípticas (McGovern & Hellberg 2003, Hebert *et al.* 2004) o subespecies con distintas preferencias de huéspedes y rangos geográficos, cuya potencialidad de alcanzar el status de plagas o de controlar organismos invasores podría ser diferente (Drew & Hancock 1994, Smith *et al.* 2005). En este caso entonces *Prodiplosis longifila* es una plaga cuya variación interpoblacional promedio (KP2) está por debajo del 1% y de los diversos umbrales propuestos para analizar la diversidad críptica, e incluso de haplogrupos atribuibles a un factor de diferenciación determinante, por lo que con respecto a las implicaciones agrícolas, la misma unidad taxonómica (la misma especie) está atacando los diferentes cultivos de tomate a diversas altitudes. Lo anterior está soportado por los resultados obtenidos por la investigadora Manzano MR (datos no publicados) donde los individuos analizados no presentaron variaciones morfológicas, además de que el daño visto en los cultivos era el mismo.

Los datos estadísticos confirman que no hay diferenciación genética entre pares de poblaciones separadas altitudinalmente. En todos los casos la mayor parte de la variación fue atribuida a las diferencias intrapoblacionales, e incluso los análisis arrojaron componentes de varianza y valores de  $F_{ST}$  negativos, lo que ocurre debido a la ausencia de estructura genética, ya que el

verdadero parámetro a estimar es cero. Por lo tanto, si la expectativa del estimador es cero, puede ocurrir que los componentes de varianza sean ligeramente positivos o negativos como se obtuvo en este estudio. Estos valores de FST se deben a que los haplotipos encontrados en las poblaciones comparadas están más relacionados que los haplotipos de la misma población. Lo anterior puede explicarse en la amplia distribución de *P. longifila* en el gradiente altitudinal y el intercambio génico constante que mantienen las poblaciones, lo cual se confirmó con los resultados obtenidos en las topologías y en los análisis de varianza molecular, que revelaron una estructura genética débil no significativa estadísticamente. Estos resultados muestran un claro panorama del efecto del transporte indiscriminado de plántulas de tomate en el país, que es probablemente la principal razón de que no exista una diferenciación genética significativa entre poblaciones de *P. longifila* separadas altitudinalmente. Perilla *et al.* (2011) aseguran que la producción de tomate en Colombia se ha caracterizado en los últimos años por un buen ritmo de crecimiento, como resultado del mejoramiento de los circuitos comerciales y la tecnificación de los cultivos. Siendo así, el transporte de plántulas de tomate, a partir de los mayores centros de producción como Valle del Cauca, Cundinamarca y Boyacá hacia el resto del país debe ser un factor determinante en el transporte de larvas de *Prodidiplosis longifila*, de tal manera que la plaga se ha expandido a todos los pisos térmicos donde hay cultivos de tomate y por tal motivo, no han experimentado un proceso de diferenciación. El transporte de las plántulas vivas provee un mecanismo fácil para la dispersión de muchas plagas, especialmente de insectos, cochinillas, áfidos de las plantas, escarabajos, nematodos, y estados pupales de muchos otros insectos (Hill 2008). Entre los ejemplos más conocidos del efecto antropogénico en la dispersión de insectos plaga, está la mosca de Hess (*Mayetiola destructor*) que ha sido transportada desde Europa a Norteamérica en el trigo, y ahora es plaga de otras plantas del género *Citrus* y sus frutos (Hill 2008). De esta manera, el modo de dispersión de *P. longifila* también estaría fuertemente relacionado con el efecto antropogénico, ya que las especies de la familia Cecidomyiidae, tienen rangos de dispersión cortos reportados para diferentes especies, como es el caso de *Contarinia sorghicola* cuyo coeficiente estimado de difusión sugiere que las hembras se dispersan a una tasa de 90m<sup>2</sup>/h (Lampo & Medialdea 1991). En reportes para *Mayetiola destructor* se sugiere que las hembras pueden hacer las ovoposiciones en parches de cultivo desde 1 a 27 metros (Withers *et al.* 1997). Con base en estos reportes se confirma que la principal causa de que no exista una diferenciación genética entre pares de poblaciones separadas altitudinalmente es el transporte antropogénico del hospedero. Está característica, junto

con la alta capacidad adaptativa de la especie, entonces podría estar facilitando la rápida diseminación de la plaga dentro del país y probablemente en otros países como en Ecuador, donde los datos obtenidos muestran que tampoco existe una diferenciación genética entre poblaciones separadas altitudinalmente como Chota e Ibarra (poblaciones comparadas en este país). Con base en estos datos y los reportados por la investigadora Manzano, se propondría que el control tanto químico como biológico que se pudiera desarrollar, estaría dirigido a implementar las mismas estrategias en poblaciones geográficamente cercanas, pero separadas por un gradiente altitudinal, ya que los resultados obtenidos sugieren la presencia de una misma unidad taxonómica afecta los cultivos de tomate dentro de un gradiente altitudinal en las localidades incluidas en este estudio.

Sin embargo, ya que no se encontró una diferenciación genética significativa entre los pares de poblaciones analizadas, se recomienda el uso de otros marcadores para complementar la técnica del código de barras, como son los ITSs nucleares, que permiten obtener nuevos estimadores de diversidad y estructura genética con base en un marcador de herencia biparental, que podría aplicarse en algunos casos como Santander donde se encontró que existían haplotipos únicos para cada población. Además, se sugiere realizar un muestreo más robusto que incluya más individuos para verificar si se está llevando a cabo un evento de diferenciación incipiente entre estas poblaciones.

En conclusión al comparar poblaciones de *Prodidiplosis longifila* dentro de un gradiente altitudinal, no existe variación genética significativa y los individuos presentan una variación interpoblacional por debajo del 1%, con lo que se puede afirmar que la plaga para cultivos de tomate separados altitudinalmente, en Colombia y una provincia de Ecuador pertenecen a una sola unidad taxonómica. No se encontró la existencia de haplogrupos en *P. longifila* asociados al gradiente altitudinal en cultivos de tomate en las poblaciones de Colombia y Ecuador evaluadas, lo que fue posible determinar mediante la técnica de código de barras de ADN con el gen COI, resultando útil para entender la estructura genética de las poblaciones, que en esta investigación fue débil y en algunos casos ausente. Por otra parte, la amplia distribución altitudinal de la plaga implica que el efecto antropogénico es fuerte sobre la dispersión de la misma, ya que su carácter territorial no le permitiría alcanzar rangos de distribución amplios, y junto con la capacidad adaptativa de la especie, este insecto-plaga podría seguir distribuyéndose a diversas altitudes donde se cultive tomate. Es importante seguir profundizando en aspectos ecogenéticos, taxonómicos, ecológicos y etológicos de este insecto para controlar

su distribución tanto altitudinal como latitudinalmente a través de un manejo integral de los cultivos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Grupo de Investigación en Estudios Ecológicos y de Biología Molecular de la Universidad del Valle y en especial al profesor Nelson Toro Perea por su acompañamiento y conocimientos aportados durante el proceso de realización de esta investigación, a la doctora María Fernanda Castillo por su acompañamiento permanente durante el desarrollo del proyecto, su asesoría en las técnicas moleculares y ayuda crítica, a la estudiante de maestría Diana Duque por su acompañamiento constante y sus conocimientos aportados en biología molecular y entomología y a la

estudiante de Biología Lizeth Espinosa por su apoyo en la ejecución de las técnicas. Un agradecimiento especial al Laboratorio de Biología Molecular de la Sección de Genética por el espacio físico y académico para desarrollar este proyecto. También agradezco al Grupo de Investigación de Interacciones Tritróficas de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira, especialmente a la doctora María del Rosario Manzano por su colaboración y sus conocimientos en entomología y por su dirección de colecta en campo, a Luis Miguel Hernández Mahecha y a Yoan Camilo Guzmán por la recolección de los especímenes objeto de estudio. Agradezco al doctor Raymond Gagné por su ayuda experta en la identificación de *Prodiplosis longifila*. Finalmente agradezco al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) por la cofinanciación de este proyecto.

## LITERATURA CITADA

- Bálint, M., Domisch, S., Engelhardt, C.H.M., Haase, P., Lehrian, S., Sauer, J., Theissing, K., Pauls, S.U. and Nowak, C. (2011), “Cryptic biodiversity loss linked to global climate change”, *Nature Climate Change*, Vol. 1, pp. 313-318.
- Blanckenhorn, W.U. (1997), “Altitudinal life history variation in the dung flies *Scathophaga stercoraria* and *Sepsis cynipsea*”, *Oecologia*, Vol. 109, pp. 342-352.
- Blaxter, M.L. (2004). “The promise of the DNA taxonomy”, *Phil. Trans. R. Soc. B*, Vol. 359, pp. 669–680.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R. and Abebe, E. (2005), “Defining operational taxonomic units using DNA barcode data”, *Phil. Trans. R. Soc. B*, Vol. 360, pp. 1935–1943.
- Calvert, L., Villareal, N. and Frohlich, D. (2005), “Using Molecular Techniques to Analyse Whitefly Species and Biotypes in Latin America”, in Anderson, P.K. and Morales, F. (Ed.), *Whitefly and Whitefly-Borne Viruses in the Tropics: Building a Knowledge Base for Global Action*, Centro Internacional de Agricultura Tropical, pp. 251-262
- Delgado, A., Mesa, N.C., Estrada, E.I. and Zuluaga, J.I. (1999), “Evaluación de diferentes productos para el manejo de *Prodiplosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae) en un cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) del Valle del Cauca”, *Revista Colombiana de Entomología*, Vol. 25, pp. 137-142.
- Drew, R.A. and Hancock, A.L. (1994), “The *Bactorea dorsalis* complex of fruit flies in Asia”, *Bull. Entomol. Res. Suppl. Series*, Vol. 2: pp. 1-68.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. (2005), “Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis”, *Evolutionary Bioinformatics Online*, Vol. 1: pp. 47-50.
- Felsenstein, J. (1978), “The number of evolutionary trees”, *Systematic Zoology*, Vol. 27 No.1, pp. 27–33.
- Floyd, R., Abebe, E., Papera, A. and Blaxter, M. (2002), “Molecular barcodes for soil nematode identification”, *Molecular Ecology*, Vol. 11, pp. 839–850.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. (1994), “DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates”, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, Vol. 3 No.5, pp. 294-299.
- Gagné, R.J. (1986), “Revision of *Prodiplosis* (Diptera: Cecidomyiidae) with descriptions of three new species”, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, Vol. 79, pp. 235-245.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R. (2003a), “Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species”, *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)*, Vol. 270, pp. S96–S99.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard, J.R. (2003b), “Biological identifications through DNA barcodes”, *Proc. R. Soc. Lond. B*, Vol. 270, pp. 313-321.

- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. and Hallwachs, W. (2004), "Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 101 No.41, pp. 14812-14817.
- Hill, D.S. (2008), *Pests of Crops in Warmer Climates and Their Control.*, Ed. Springer, Reino Unido.
- Lampo, M. and Medialdea, V. (1994), "Dispersal pattern of the sorghum midge (Diptera: Cecidomyiidae) in sorghum plots", *Environmental Entomology*, Vol. 23 No.3, pp. 551-555.
- Lanteri, A.A.(2007), "Código de Barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología", *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, Vol. 66 No.3-4, pp. 15-25.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007), "Clustal W and Clustal X version 2.0.", *Bioinformatics*, Vol. 23, pp.2947-2948.
- Lunt, D.H., Zhang, D.-X., Szymura, J.M. and Hewitt, G.M. (1996), "The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies", *Insect Molecular Biology*, Vol. 5 No.3, pp. 153-165.
- McGovern, T.M. and Hellberg, M.E. (2003), "Cryptic species, cryptic endosymbionts, and geographical variation in chemical defenses in the bryozoan *Bugula neritina*", *Molecular Ecology*, Vol. 12, pp. 1207-1215.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G. and Ng, P.K.L. (2006), "DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success", *Syst. Biol.*, Vol. 55 No.5, pp. 715-728.
- Opell, B.D.(2006), "Molecular Phylogenetic Evidence for the Parallel Evolution of Rock Ecomorphs in the New Zealand Orb-Weaving Spider *Waitkera waitakerensis* (Family Uloboridae)", *The Journal of Arachnology*, Vol. 34, pp. 467-475.
- Peña, J.E., Gagné, R. and Duncan, R. (1989), "Biology and Characterization of *Prodiplosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae) on Lime in Florida", *Florida Entomologist*, Vol. 72 No.3, pp. 444-450.
- Perilla, A., Rodríguez, L.F. and Bermúdez, L.T. (2011), "Estudio técnico.económico del sistema de producción de tomate bajo invernadero en Guateque, Sutatenza y Tenza (Boyacá)", *Revista Colombiana de Ciencias Hortícola*, Vol. 5 No.2, pp. 220-232.
- Singh, K. and Xie, M. 2010, "Bootstrap Method", in Peterson, P., Baker, E. and McGaw, B. (Ed.), *International Encyclopedia of Education*, Third Edition, pp. 46-51.
- Smith, M.A., Woodley, N.E., Janzen, D.H., Hallwachs, W. and Hebert, P.N.D. (2005), "DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae)", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 103 No.10, pp. 3657-3662.
- Ruiz, F., Linton, Y. M., Ponsonby, D. J., Conn, J. E., Herrera, M., Quiñones, M. L., Vélez, I. D., and Wilkerson, R. C. 2010, "Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 105 No.7, pp. 899-903.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R.M. and Vieites, D.R. (2005), "Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges", *Phil. Trans. R. Soc. B*, Vol. 360, pp. 1859-1868.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011), "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods", *Molecular Biology and Evolution* (submitted), Vol. 28 No.10, p.p. 2731-2739.
- Withers, T.M., Harris, M.O. and Madie, C. (1997), "Dispersal of mated female hessian flies (Diptera: Cecidomyiidae) in field arrays of host and nonhost plants", *Environmental Entomology*, Vol. 26 No.6, pp. 1247-1257.

**Tabla 1.** Alineamiento de haplotipos del gen COI de 115 muestras de *P. longifila*, los números en la parte superior indican la posición de los cambios nucleotídicos (en p.b.) a lo largo de un fragmento de 658 p.b., los puntos indican bases idénticas para el haplotipo referencia (Haplotipo VII - Más frecuente). (Transversiones indicadas en negrita).

Secuencia de Referencia/ Haplotipo	Frecuencia No. (%)	Posición									
		1	11	106	212	235	307	337	352	484	595
		A	T	T	C	T	G	A	T	T	C
I	14,91	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
II	28,94	.	.	<b>C</b>	.	<b>C</b>	.	.	<b>A</b>	.	.
III	1,75	.	.	.	.	.	A	.	.	<b>A</b>	T
IV	0,87	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
V	14,03	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VI	0,87	.	<b>G</b>	.	.	.	.	.	.	.	.
VII	34,21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VIII	3,5	.	.	.	.	.	A	<b>G</b>	<b>A</b>	.	.