

INFLUENCIA DE LA CORDILLERA CENTRAL COLOMBIANA EN LA ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Prodiplosis longifila* (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE)

Lizethe Lorena Espinosa Sánchez
Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia
Correo electrónico: liz.espinosa01@gmail.com

Nelson Toro Perea
Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia
Correo electrónico: nelson.toro@correounivalle.edu.co

RESUMEN

Prodiplosis longifila Gagné (Diptera: Cecidomyiidae) ha sido reportada como una de las principales plagas que afecta al cultivo de tomate en Colombia, puede generar pérdidas de hasta el 100% y tiene una amplia distribución en el país. Además, es posible que las barreras geográficas estén determinando la diferenciación genética entre sus poblaciones, por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la Cordillera Central como posible barrera geográfica en el flujo genético entre poblaciones de *P. longifila*. Para tal fin, se hizo un análisis molecular utilizando un fragmento del gen mitocondrial de la Citocromo Oxidasa I (COI) en poblaciones localizadas al occidente y oriente colombiano, con la Cordillera Central como barrera geográfica. La distancia genética entre poblaciones se determinó usando el modelo de Kimura-2-parámetros (K2P), y agrupamientos por Neighbor-Joining (NJ) y Máxima Verosimilitud (ML). La estructura genética fue evaluada mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en tres niveles de jerarquía. En total, se analizaron 215 secuencias de 658pb, encontrándose una distancia genética entre los grupos oriente-occidente de 0,2%, similar a la distancia dentro de los grupos (0,1% - 0,2%). Los agrupamientos (por NJ y ML) no indicaron diferencias entre los grupos geográficos y la mayor parte de la variación (60%) se debe a la variación dentro de las poblaciones, concluyéndose que las poblaciones a ambos lados de la Cordillera Central no se diferencian genéticamente, evidenciando que el flujo genético es constante, posiblemente debido al efecto de factores antropogénicos.

Palabras clave: Barreras geográficas, Código de barras, COI, diferencias genéticas, plaga, tomate de mesa, *Prodiplosis longifila*

Abstract

Prodiplosis longifila Gagné (Diptera: Cecidomyiidae) has been reported as a major pest affecting tomato crops in Colombia, it has a wide distribution in the country and can generate crop losses of up to 100%. In spite of its wide distribution, possibly the geographic barriers could be determinant of genetic differentiation between populations. The aim doing this study was to assess the influence of Cordillera Central of the Andes, as a geographic barrier, in the gene flow between populations of *P. Longifila*. A sequence analysis obtained from a fragment of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I (COI), in western and eastern populations of *P. longifila* in Colombia, with the presence of Cordillera Central as a geographic barrier was carried out. The genetic distance between populations was calculated using Kimura 2 parameter model and Neighbor-Joining (NJ) and Maximun Likelihood (ML) clustering methods. Genetic structure was determined using a Analysis of Molecular Variance (AMOVA). In total, 215 sequences of 658 bp were analysed, showing a genetic distance of 0,2% between western and eastern groups, similar to the genetic distance within these groups (0,1% - 0,2%). NJ and ML clusterings did not show differences between the geographic groups and the AMOVA revealed higher genetic variation percentage (60%) within populations. In conclusion, populations located on both sides of the Cordillera Central are not genetically different, showing that gene flow is constant between populations, possibly because of the influence of anthropogenic factors

Keywords: Barcoding, COI, genetic differences, geographic barriers, pest, tomato, *Prodiplosis longifila*

INTRODUCCIÓN

El tomate de mesa *Solanum lycopersicum* es la hortaliza más importante del mundo, tanto para el consumo fresco como para la industria (Casas 2008). En Colombia, el cultivo de tomate está ampliamente distribuido a través del país, siendo cultivado en 19 departamentos. Su producción se concentra en los departamentos de Cundinamarca, Norte de Santander, Valle de Cauca, Boyacá, Huila, Antioquia, Risaralda y Caldas (Miranda *et al.* 2009)

El cultivo de tomate presenta una variedad de problemas fitosanitarios entre los que se encuentra el insecto plaga *Prodiplosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae), que aunque, según productores, puede causar hasta el 100% de daño en cultivos del Valle del Cauca, es la plaga menos estudiada en el país. *P. longifila* fue encontrado inicialmente por “Rainwater” en 1934 en Florida (EEUU) atacando algodón silvestre (Valarezo *et al.* 2003). Sin embargo, los adultos solo fueron descritos e identificados hasta 1986 en cultivos de cítricos por R.J Gagné, (Peña & Mead 1998).

En Colombia, en 1987, se encontró daño en brotes de tomate que consistía en la deformación de las hojas terminales que luego se necrosaban. El insecto que producía este daño fue identificado como *P. longifila* por Gagné. Sin embargo, *P. longifila* solo fue reportada como una plaga de importancia económica en el país en 1994, especialmente en tomate (Mena, 2012). La presencia de esta plaga ha sido confirmada en Colombia, Ecuador y Perú y el daño se produce debido a las larvas en cogollos y tejidos tiernos (Valarezo *et al.*, 2003). Una vez comienza la floración, el insecto penetra los botones florales ocasionando su caída e impidiendo la formación de frutos. Además, ocasiona daños y deteriora frutos en desarrollo al consumirlos, dejando cicatrices y deformaciones (Mena, 2012). Según Delgado (1998) (citado por Mena 2012), el manejo de este insecto en cultivos de tomate en Colombia se ha llevado a cabo utilizando indiscriminadamente insecticidas químicos que producen una alta contaminación en el ambiente y residuos en los alimentos, lo cual hace que las opciones de manejo para esta plaga sean limitadas y que por ende no se haya podido desarrollar un plan efectivo para controlarla y así disminuir las pérdidas económicas en los cultivos de tomate. Por este motivo, es de vital importancia aplicar los métodos actuales en identificación de especies, como las herramientas moleculares, que permitirían detectar diferencias genéticas entre poblaciones de *P. longifila*. De esta manera, el código de barras de ADN sería una herramienta útil que permitiría aumentar el conocimiento que se tiene sobre este insecto, sobre todo a nivel genético, lo cual ayudaría en un futuro a desarrollar un manejo integrado de la plaga, considerando que la información obtenida con ayuda de las técnicas moleculares puede contribuir en la identificación de variantes genéticas resultantes de un proceso de diferenciación poblacional. Además, el código de

barras de ADN puede ser aplicado en la identificación rápida y precisa de la plaga en estadios inmaduros (Lima *et al* 2008), con el propósito de establecer planes de control tempranos.

Teniendo en cuenta que una barrera geográfica puede impedir el flujo de genes entre poblaciones, se espera que con el tiempo dichas poblaciones evolucionen separadamente y por ende, se diferencien genéticamente (Pierce 2009), por lo tanto, se puede plantear que la Cordillera Central de los Andes en Colombia, podría jugar un papel importante como barrera geográfica afectando la diferenciación genética entre poblaciones de *Prodiplosis longifila*, lo cual podría ser detectable mediante el uso de técnicas moleculares como el código de barras de ADN. Este código es una técnica utilizada para realizar la identificación de organismos mediante el análisis de las secuencias de un fragmento corto y estandarizado de ADN genómico. Hebert *et al.* (2003) propusieron esta técnica al usar un juego de cebadores para amplificar una región de 648 pares de bases (pb) de la subunidad I del gen mitocondrial de la Citocromo c Oxidasa (COI) que sería suficiente para realizar una identificación rápida y precisa de una amplia variedad de especímenes. La región COI ha mostrado un buen poder de discriminación para la mayoría de grupos animales (Jinbo *et al* 2011).

Además, al ser un marcador mitocondrial, el COI en combinación con el poder de la PCR ha complementado, en gran medida, los análisis evolutivos y ha permitido a los biólogos estudiar casi cada animal metazoo de manera rápida a niveles moleculares y poblacionales (Zhang & Hewitt 1996). El ADN mitocondrial (mtADN) animal tiene varias características notables, entre las que cabe destacar, su genoma pequeño con una estructura y organización simples, su presencia ubicua en casi todos los animales, su alto número de copias por lo que es fácil de aislar y es una molécula mosaico con regiones de ADN que evolucionan más rápido o más lento unas que otras lo que permite el diseño de cebadores conservados (Zhang & Hewitt 1996). Otra ventaja, es que el mtADN tiene un alto nivel de variabilidad y una alta tasa de mutación, en comparación con el ADN nuclear (Buburuzan *et al* 2007). Así, la relativamente alta, pero comparativamente conservada tasa de evolución de la secuencia del ADN mitocondrial ha hecho que COI sea el marcador escogido para animales (Evans & Paulay 2012).

De esta manera, teniendo en cuenta que el fragmento del gen mitocondrial COI tiene una variación genética suficiente para poder realizar estudios poblacionales en animales, se ha propuesto como objetivo principal de este trabajo, evaluar la influencia de la Cordillera Central como barrera geográfica en el flujo génico entre poblaciones de *P. longifila*, mediante la técnica del código de barras de ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

La primera fase del proyecto incluyó el trabajo de campo realizado por el grupo de investigación de Interacciones Tritróficas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira en el cual, se recolectaron larvas de *P. longifila* en cultivos de tomate en los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda, Caldas, Santander, Cundinamarca y Huila. De las larvas recolectadas emergieron adultos que fueron identificados morfológicamente con ayuda de un taxónomo experto. Se conformaron dos grupos poblacionales denominados grupo occidental, constituido por poblaciones de *P. longifila* de la vertiente occidental de la cordillera central (con muestras de cultivos de tomate de Valle del Cauca, Risaralda y Caldas) y un grupo oriental, constituido por poblaciones de *P. longifila* de la vertiente oriental de la cordillera central (con muestras de cultivos de tomate de Huila, Cundinamarca y Santander), resaltando la presencia de la Cordillera Central como barrera geográfica. En la Tabla 1 se indican el número de individuos utilizados en el estudio y la ubicación de los sitios de muestreo.

Una vez emergieron los adultos, estos fueron conservados en etanol al 90%. La segunda fase de trabajo incluyó el análisis del gen COI, la cual se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Sección de Genética de la Universidad del Valle. La extracción de ADN fue realizada utilizando cabeza, tórax y patas de cada espécimen mediante el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue de Qiagen, siguiendo las recomendaciones del proveedor. El ADN obtenido fue evaluado cualitativa y cuantitativamente mediante espectrofotometría a 260 nm determinando la pureza mediante la relación 260nm/280nm en un espectrofotómetro NanoDrop2000 (v1.0, Thermo Scientific). Mediante una reacción de PCR se amplificó un fragmento del gen mitocondrial de la Citocromo Oxidasa I (COI) usando los cebadores universales LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al* 1994) cuyas secuencias son las siguientes:

LCO1490: 5'-ggtaacaatacataaagatattgg-3' y

HCO2198: 5'-tgatttttggtcaccctgaagtta -3'

Las condiciones con las que se realizó la PCR fueron las siguientes: Buffer PCR 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0,05 mM, primer LCO1490 0,25 μM, primer HCO2198 0,25 μM, Taq Polimerasa 1U total y ADN 5 μL de una concentración aproximada de 3ng/ μL, para un volumen total por muestra de 25 μL.

El perfil térmico para la amplificación fue el siguiente: 92°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto (Los pasos 2 a 4 se repiten 34 veces más para un total de 35 ciclos) y 72°C de extensión final por 5 minutos. La visualización de los productos amplificados se hizo en gel de agarosa al 1.5% con bromuro

de etidio y se usó un transiluminador de UV. Se utilizó un marcador de peso de 100 p.b para determinar el tamaño de los fragmentos.

La secuenciación de los fragmentos amplificados se realizó de manera directa y bidireccional utilizando los servicios de un proveedor (MACROGEN, USA). Posteriormente, las secuencias fueron editadas usando el programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code) y alineadas con el programa Clustal X 2.1 (Thompson *et al* 1997). Con el programa MEGA 5.1 (Tamura *et al* 2011) se calculó la distancia entre pares de secuencias usando el modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros (K2P). Este mismo modelo se usó para construir un agrupamiento por Neighbor-Joining (NJ). El programa Modeltest (Posada & Crandall 1998) se empleó para obtener el mejor modelo de sustitución que ajusta a los datos para construir un árbol bajo el criterio de Máxima Verosimilitud (ML) usando el programa MEGA 5.1(Tamura *et al* 2011). La consistencia de los nodos de los agrupamientos fue evaluada mediante 1050 “bootstraps”. Un individuo de la familia Cecidomyiidae, del género *Dasineura* fue incluido como grupo externo dentro de los análisis de agrupamiento. La estructura genética fue evaluada mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en tres niveles de jerarquía FCT (entre grupos), FSC (entre poblaciones dentro de grupos) y FST (dentro de poblaciones) mediante el programa Arlequín 3.5.1 (Excoffier & Lischer 2010) . Además, se construyó una red de haplotipos basado en el algoritmo de unión media (MJ) utilizando el programa Network 4.6.1.1 (Bandelt *et al.* 1999)

RESULTADOS

I. **Haplotipos y frecuencia.** El tamaño del fragmento obtenido a partir del gen COI, después de la amplificación por PCR, fue de 658pb y los análisis correspondientes fueron realizados en 215 secuencias, 161 pertenecientes al Grupo Occidental y 54 pertenecientes al Grupo Oriental. En total, se encontraron 10 haplotipos y 13 sitios polimórficos en la secuencia del fragmento del gen COI amplificado, cuatro de los cuales indican transversiones (en las posiciones 15, 22, 352 y 484 pb), y nueve transiciones (Tabla 2). De los 13 sitios polimórficos, nueve son parsimoniosamente informativos. La composición nucleotídica de la totalidad de las secuencias mostró que la secuencia de COI es rica en adenina y timina, con un porcentaje de 74,9% de A+T, y 25,1% de C+G. Los haplotipos 1 y 2 fueron los más frecuentes, representando cerca del 90% de todos los individuos de *P. longifila* estudiados. Cabe mencionar que el haplotipo 1 fue el único que se encontró en ambos grupos poblacionales, mientras que los demás haplotipos se hallaron en solo uno de los dos grupos poblacionales. La presencia de los haplotipos encontrados en solo un grupo, en la mayoría de los casos, se restringió a poblaciones de *P. longifila* encontradas en uno o dos departamentos (Fig. 1 y Tabla 2). La red de haplotipos obtenida (Fig. 2) indicó nuevamente que los

haplotipos 1 y 2 fueron los más abundantes y que solamente el haplotipo 1 fue encontrado en ambos grupos poblacionales (occidental y oriental), también, esta red permite sugerir que del haplotipo 1 se están derivando los demás haplotipos que tienen menor frecuencia.

II. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). El AMOVA mostró que el mayor porcentaje de variación (cerca del 60%) se encontró dentro de las poblaciones que componen cada grupo, es decir, la variación que hay dentro de las poblaciones de *P. longifila* en cada una de las vertientes de la cordillera central. Además, el índice FCT con un valor de 0,23 sugiere una débil estructura poblacional no significativa ($P > 0.05$) (Tabla 3). En contraste, la estructura entre poblaciones dentro de grupos y dentro de poblaciones mostró valores altamente significativos, siendo la estructura intrapoblacional la más alta con un valor de 0.4 (Tabla 3).

III. Distancias genéticas según modelo Kimura 2 parámetros (K2P) y agrupamientos por Neighbor-Joining (NJ) y Máxima Verosimilitud (ML). Según el modelo K2P, el promedio de las distancias genéticas encontradas dentro de cada grupo poblacional fue de 0,2% para el grupo occidental y de 0,1% para el grupo oriental, valores similares al encontrado para las distancias genéticas entre grupos (Tabla 4). Para obtener el agrupamiento por ML, se encontró que el mejor modelo de sustitución nucleotídica que se ajustaba a los datos fue el de Hasegawa, Kishino y Yano (*HKY*), teniendo en cuenta esto, los agrupamientos por NJ y ML arrojaron una topología idéntica, en la cual se puede observar que los individuos de *P. longifila* de ambos grupos poblacionales no fueron discriminados según su posición, a lado y lado, de la cordillera central, por lo tanto, no fue posible distinguir dos clados bien diferenciados que correspondieran al grupo occidental y al grupo oriental, en lugar de esto, los individuos pertenecientes a los dos grupos poblacionales se entremezclaron indiscriminadamente (Fig. 3 y Fig. 4).

DISCUSION

De manera general, los análisis realizados mostraron un patrón consistente, en el cual la Cordillera Central no ha sido un factor determinante en la diferenciación de la especie *P. longifila*. El AMOVA reveló que la mayor parte de variación en las secuencias es explicada por la variación que hay dentro de las poblaciones que hacen parte de cada grupo (Occidental y Oriental), mostrando así, que un porcentaje menor de dicha variación puede atribuirse a las diferencias que hay entre los dos grupos poblacionales, lo que sugiere, que estamos frente a una población panmíctica sin evidencia de eventos de diferenciación. Este hallazgo, también se soporta en el valor del índice FCT, el cual no fue significativo. La baja diferenciación genética también fue evidenciada por los porcentajes de distancias genéticas encontrados usando el modelo K2P, según los cuales las distancias genéticas obtenidas por la comparación de pares

de secuencias entre individuos de los dos grupos, cuyo promedio fue de 0,2%, mostraron valores casi idénticos a los encontrados entre pares de individuos de un mismo grupo. De esta manera, los porcentajes de distancia genética obtenidos para *P. longifila* están por debajo del umbral de 3% propuesto por Hebert *et al* (2003) para diferenciar o delimitar especies de insectos. Según lo reportado por estos investigadores en su estudio de lepidópteros, los valores de divergencia entre especies son usualmente mayores que 3%, por lo que este valor se usa como un umbral para el diagnóstico de especies. Siendo así, se puede afirmar que todos los individuos utilizados en este estudio pertenecen a una sola especie, validando la información obtenida a partir de la identificación morfológica convencional que identificó los organismos bajo estudio como *P. longifila*. En otro estudio realizado en aves, Hebert *et al* (2004) explican que el umbral de divergencia debe ser lo suficientemente alto como para separar especímenes que muy posiblemente pertenecen a diferentes especies y debido a que los patrones de variación intraespecífica e interespecífica en COI parecen similares en varios grupos animales, como lo mencionan Grant & Bowen (1998) en sardinas; Hebert *et al* (2003) en lepidópteros y Hogg & Hebert (2004) en Colémbolos (citados por Hebert *et al* 2004), un umbral estándar debe ser de 10 veces la variación intraespecífica promedio del grupo bajo estudio. En nuestro caso, tenemos un 0,2% de promedio entre grupos, por lo tanto, el umbral para discriminar entre especies sería de 2%. En cualquiera de los casos, considerando un umbral de 2% o 3%, los resultados de nuestro estudio confirman que los individuos analizados pertenecen a la misma especie.

Las topologías obtenidas en los agrupamientos por NJ y ML, confirman una vez más que no existe diferenciación significativa entre los grupos occidental y oriental. El método de NJ empleado en este estudio tiene la ventaja de su velocidad y de un desempeño fuerte cuando las divergencias en las secuencias son bajas, de tal manera que usualmente es apropiado para recuperar filogenias intra e interespecíficas (Hebert *et al* 2004). Por otra parte, el método de ML tiene la ventaja de usar modelos complejos de sustitución, en este caso el modelo HKY, para acercarse a la realidad biológica y además posee un marco poderoso para estimar parámetros y probar hipótesis (Yang & Rannala 2012), razones por las cuales se emplearon ambos métodos para respaldar los análisis.

Cabe mencionar, que aunque todos los análisis realizados indican que no hay una diferenciación genética significativa entre las poblaciones de *P. longifila* estudiadas, se puede destacar la presencia de haplotipos privados encontrados en solo uno de los dos grupos poblacionales y que presentan frecuencias bajas que permiten sugerir que se están originando nuevas variantes genéticas, a partir del haplotipo más abundante, como lo mostró la red de haplotipos. Esto sirve como evidencia de que se están formando nuevos haplotipos a ambos lados de la Cordillera

Central, todos ellos generados a partir del haplotipo 1, que sería el haplotipo ancestral. Sin embargo, no hay una estructura poblacional fuerte aún, puesto que la formación de estos haplotipos de baja frecuencia es un evento reciente y no se han fijado todavía en las poblaciones, pero aún así resultan importantes para sugerir que se podría iniciar un proceso de diferenciación en esta especie que podría ser detectada en un futuro. De esta manera, los haplotipos con menor frecuencia pueden estar indicando focos de aislamiento, pero como lo confirman todos los análisis expuestos, no son lo suficientemente diferentes genéticamente como para señalar la existencia de una estructura poblacional fuerte en poblaciones de *P. longifila* que afectan los cultivos de tomate en nuestro país, por lo que se puede decir que la Cordillera Central de los Andes no representa una barrera geográfica efectiva en la diferenciación genética de poblaciones del insecto que se encuentran a ambos lados de la Cordillera, como usualmente ha sucedido con otros insectos plaga bajo la influencia de barreras geográficas. Así por ejemplo, un estudio llevado a cabo por Díaz *et al* (2011) sugiere que la presencia de barreras geográficas como la cordillera de los Andes y los ríos Magdalena y Cauca, podrían determinar procesos de especiación reciente en *N. elegantalis* y por ende se podría detectar diferenciación genética en poblaciones diversas de esta plaga. Para esta especie se realizó un análisis de divergencia intraespecífica usando el fragmento del gen mitocondrial COI que reveló la presencia de cuatro haplotipos para esta especie en Colombia (Díaz *et al* 2011). El haplotipo que presentó mayor divergencia genética se ubicó en la cordillera central donde se cultiva la mayor área de solanáceas en el país, lo que sugiere una especie incipiente, resultado del aislamiento geográfico y de la presión de selección por el uso de insecticidas (Suarez-Barón *et al* 2009). Este resultado encontrado en *N. elegantalis* contrasta con la falta de diferenciación genética encontrada en las poblaciones de *P. longifila* en este estudio, lo cual deja entrever nuevamente que hay una falta de control sobre esta plaga. El alto intercambio genético que ocurre entre poblaciones de *P. longifila* puede deberse a factores antropogénicos sumados a la alta capacidad adaptativa del insecto plaga a las diferentes condiciones de los cultivos del tomate. Si sabemos que en los últimos años, la producción de tomate en Colombia se ha caracterizado por un buen ritmo de crecimiento, y que esto se da como resultado del mejoramiento de los circuitos comerciales y la tecnificación de los cultivos, además de una importante demanda del tomate en el mercado Nacional (Perilla *et al* 2011) se puede sugerir que el transporte de plántulas de tomate por todo el país está contribuyendo a la propagación incontrolada de este insecto plaga. Por lo tanto, se considera necesario y de vital importancia, empezar a plantear un manejo integrado de este insecto, que empiece desde el manejo apropiado del cultivo de tomate para evitar que las plántulas que se transporten estén infestadas con el insecto plaga y que además se aplique un control

fitosanitario adecuado para así, reducir al máximo las pérdidas económicas debido al daño en los cultivos de tomate ocasionados por *P. longifila*.

Se puede concluir entonces que el método de código de barras de ADN que utiliza un fragmento de 658 pb del gen mitocondrial COI resultó adecuado para realizar estudios moleculares a nivel poblacional y para detectar divergencias intraespecíficas en poblaciones del insecto plaga *P. longifila* en Colombia. Además, esta técnica conduce a señalar que la Cordillera Central de los Andes no representa una barrera geográfica efectiva que contribuya en la diferenciación genética de poblaciones separadas del insecto, y esto puede deberse principalmente a actividades humanas de transporte y manipulación de plántulas de tomate. Sin embargo, es necesario señalar la presencia de haplotipos que tienen baja frecuencia y que en un futuro podrían resultar importantes en un proceso de diferenciación genética que se estaría llevando a cabo en la especie *P. longifila*.

Agradecimientos

Al profesor Nelson Toro por todo el conocimiento brindado, a la doctora María Fernanda Castillo, a las estudiantes del grupo de investigación de estudios Ecogenéticos y Biología Molecular de la Universidad del Valle, Diana Duque y Sandra Velasco, por toda su ayuda en las técnicas empleadas y análisis de datos. A la profesora María del Rosario Manzano y los estudiantes Luis Miguel Hernández y Yoan Camilo Guzmán del grupo de investigación de Interacciones Tritróficas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, por su trabajo en campo e identificación morfológica y al taxónomo Raymond Gagné por su ayuda experta en la identificación morfológica de *P. longifila*. Finalmente, gracias a la Universidad del Valle, a la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira y a COLCIENCIAS por su apoyo financiero.

Literatura citada

Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48

Buburuzan, L., Gorgan, L. D., Bara, I.I. 2007. Types of DNA used in speciation and phylogeny studies. *Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, TOM VIII*

Casas, N.E. 2008. Obtención de un método de infestación artificial con el pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lep: Crambidae), para la determinación de la resistencia genética en *Solanum* spp. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Delgado, A. (1998). *Biología y evaluación de métodos de manejo de Prodidiplosis longifila Gagné (Diptera: Cecidomyiidae) en un cultivo de tomate Lycopersicon esculentum del Valle del Cauca*, Trabajo de grado Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

- Díaz, A.E., Solis, A., Brochero, H.L. 2011. Distribución geográfica de *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera: Crambidae) en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 37 (1): 71-76
- Evans, N., Paulay, G. 2012. DNA Barcodes: Methods in Molecular Biology. Volume 858, Part 2, Pages 47-77. Springer
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mo. Mar. Biol. Biotechnol.* 3(5) : 294-299.
- Grant W.S., Bowen B.W.1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered* 89: 415-427.
- Hebert, P.D., Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 270, 313-321.
- Hebert, P.D., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M. 2004. Identification of Birds through DNA barcodes. *PLOS Biology*. Vol 2. Num. 10: 1657-1663
- Hogg I.D., Hebert P.D. 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian arctic, using DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 82(5), 749- 754.
- Jinbo, U., Kato, T., Ito, M. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science* 14, 107-124
- Lima, J., Floyd, R., Hanner, R.H. 2008. DNA barcoding and its relevance to pests, plants and biological control. En *XI International Symposium on the Processing Tomato* 823. Pp. 41-48
- Mena, Y.M. (2012). *Evaluación de la resistencia a Prodiplosis longifila Gagné (Diptera: Cecidomyiidae) en materiales segregantes de tomate cultivado y accesiones silvestres de Solanum habrochaites Knapp y Spooner var glabratum*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- Miranda, D., G. Fischer, C. Carranza, M. Rodríguez, O.Lanchero and J.C. Barrientos. 2009. Characterization of productive systems of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in producing zones of Colombia. *Acta Hort.* 821, 35-46.
- Peña, J.E., Mead, F.W. 1998. Citrus Gall Midge, *Prodiplosis longifila*Gagné (Insecta:Diptera: Cecidomyiidae). University of Florida
- Perilla, A., Rodríguez, L.F., 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 HORTÍCOLAS* Vol. 5 No. 2 pp. 220-232
- Pierce, B.A. 2009. Genética un enfoque conceptual. Ed. Médica Panamericana. Tercera Edición. 832 pp.
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*. Vol 14 no 9. pp: 817-818
- Suarez-Baron, H.; Gallego, G; Diaz A.; Tohme J. 2009. Uso del código de barras de ADN para identificar posibles biotipos del perforador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae), una importante

plaga de frutas solanáceas Andinas. Resúmenes XXXVI Congreso de SOCOLEN, Julio 29 al 31, Medellín - Antioquia.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.

Thompson, J.D., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. 1997. The Clustal-X windows interface. Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 25 (24): 4876-4882.

Valarezo, O., Cañarte, E., Navarrete, B., Arias, M. 2003. *Prodiplosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae) principal plaga del tomate en el Ecuador. INIAP. Manual 51. 79 pp.

Yang, Z., Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics*

Zhang, D-X., Hewitt, G.M. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *TREE* vol 11. No 6: 247-25

Tabla 1. Poblaciones muestreadas de *Prodioplosis longifila* en cultivos de tomate en Colombia, localidad, coordenadas geográficas y número de individuos analizados de cada población.

Grupo	Departamento	Municipio, Corregimiento	Coordenadas	Número de individuos analizados
Occidental	Valle	Palmira, Rozo	3°37'30" N 76°24'39.5" W	6
		El Dovio, Matecaña	04°29'57.9" N 076°13'16.4" W	9
		El Dovio, La Cabaña	04° 31' 49" N 076° 12' 19,2" W	10
		El Dovio, El Dovio	04°30'11.9" N 076°14' 10.1" W	16
		EL Dovio, El Crucero	04°31'26.3" N 076°13'10.1" W	10
		Bolívar, La Herradura	04°76'43.1" N 076°73'05.0" W	11
		Bolívar, Trujillo	04°15'13.1" N 076°13'24.6" W	10
		Vijes, Hortalizas		
		Gourmet	0.3°45'15.9" N 076°24'52.4" W	6
		Restrepo, Vía Pavas		
	Restrepo (Rio Grande)	03 ° 45'01.4" N 076° 34'06.8" W	10	
	Tenerife, Regaderos	3 ° 38 ' N 76 ° 06' W	13	
	Risaralda	Sta. Rosa de Cabal, Manzanillo	04°55'13,6" N 075°39'04,6" W	12
	Caldas	Palestina, Curazao (La Parroquia)	05°00'30,1" N 075°37'42,4" W	11
		Palestina, Curazao	05°00'14,4" N 075°37'41,2" W	5
Manizales , Las Pavas		05°01'24,6" N 075°34'56,0" W	18	
Aguadas, La Coca (El Vergel)		05°38'06,3" N 075°29'06,2" W	5	
Aguadas, El Edén		05°36'26,0" N 075°29'03,3" W	9	
Oriental	Santander	Lebrija, La Laguna	07°06'02.6" N 073°12'54.7" W	4
		Curití, Pescaderito	06°37'15.4" N 073°01'57.7" W	5
		Socorro, Árbol Solo San Gil, Mata de Guadua	06°26'22.9" N 073°13'48,7" W	6
	Cundinamarca	Caqueza, Girón de Resguardo	04°25'19.2" N 073°56'41.8" W	3
		Fusagasugá, Usathama	04°23'35.8" N 074°23'07.7" W	10
	Huila	Garzón, Majo	02°13'54,1" N 075°36'04,5" W	3
		Pitalito, Casco Urbano	01°50'45,9" N 076°04'41,0" W	14
		Pitalito, Solarte	01° 50'22,4" N 076°03'32,8" W	3

Tabla 2. Número de haplotipos, posición de los sitios polimórficos en la secuencia del gen COI de *Prodiplosis longifila* y presencia de los haplotipos en los grupos occidental y oriental

Haplotipo No.	Posición (pb)														Presencia
	15	22	86	106	212	229	235	271	307	337	352	484	595		
1	T	T	T	T	C	G	T	T	G	A	T	T	C	Grupo Occidental y Oriental	
2	.	.	.	C	.	.	C	Grupo Occidental	
3	C	Grupo Oriental (Santander y Cundinamarca)	
4	A	G	A	.	.	Grupo Occidental	
5	.	.	C	Grupo Occidental (Valle)	
6	A	Grupo Occidental (Valle)	
7	A	G	Grupo Oriental (Huila)	
8	A	.	A	A	T	Grupo Oriental (Santander)	
9	T	Grupo Oriental (Santander)	
10	.	G	Grupo Occidental (Caldas)	

Tabla 3. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre grupos, dentro de grupos y dentro de poblaciones de *Prodiplosis longifila* con su respectivo valor P.

Fuente de Variación	Porcentaje de variación	Índice	Valor	Valor P
1. Entre grupos (Occidental-Oriental)	23.33	FCT	0,23	0,099
2. Entre poblaciones dentro de grupos (Entre Valle, Risaralda y Caldas y entre Huila , Cundinamarca y Santander)	16.67	FSC	0,22	<0,001
3. Dentro de poblaciones (dentro de Valle, Risaralda, Caldas, Huila, Cundinamarca y Santander)	60.01	Fst	0,4	<0,001

Tabla 4. Distancias genéticas promedio entre pares de secuencias del gen COI entre y dentro de grupos de poblaciones de *Prodiplosis longifila* utilizando el modelo K2P y su respectivo error estándar promedio (ES)

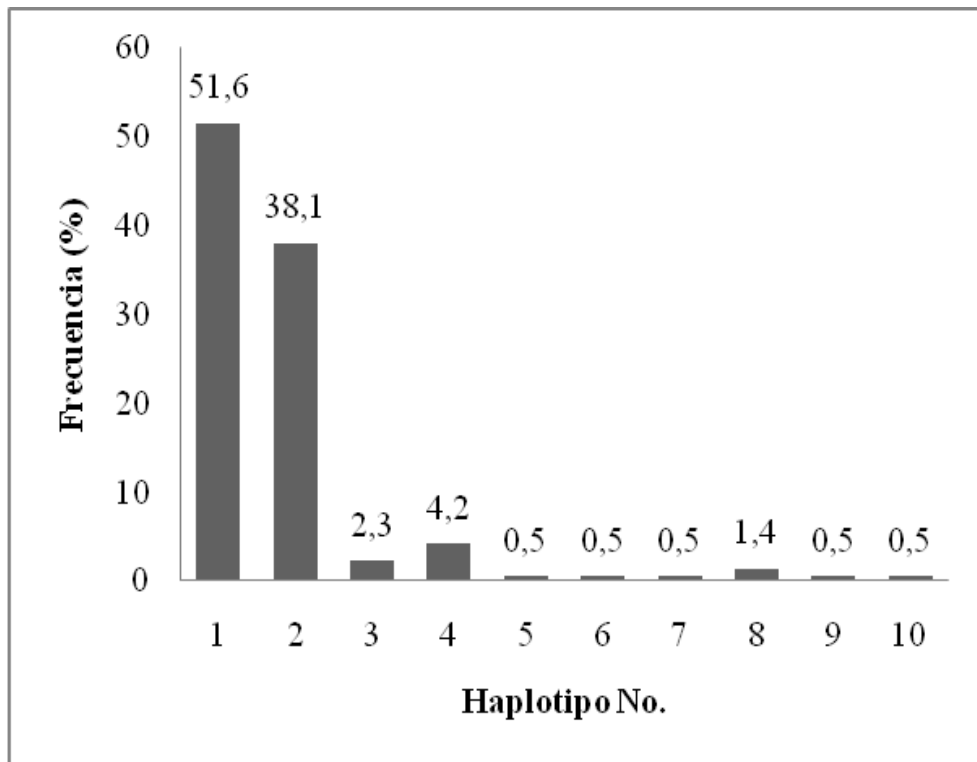
Grupos	K2P Promedio (%)	ES Promedio
Dentro Grupo Occidental	0,2	0,001
Dentro Grupo Oriental	0,1	0,001
Entre Grupos (Occidental-Oriental)	0,2	0,001

Figura 1. Frecuencia (%) de los 10 haplotipos encontrados en las 215 secuencias analizadas del gen COI de individuos de *Prodiplosis longifila* en cultivos de tomate en Colombia.

Figura 2. Red de los 10 haplotipos encontrados en *Prodiplosis longifila* en cultivos de tomate en Colombia. Los haplotipos son representados por círculos y el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. La posición de los cambios en la secuencia de COI (en pb) que diferencian cada haplotipo se indica en las líneas que separan cada círculo.

Figura 3. Agrupamiento obtenido por Neighbor-Joining (NJ) de las 215 secuencias del gen COI analizadas en individuos de *Prodiplosis longifila* de cultivos de tomate en Colombia.

Figura 4. Agrupamiento obtenido por Máxima Verosimilitud (ML) de las 215 secuencias del gen COI analizadas en individuos de *Prodiplosis longifila* de cultivos de tomate en Colombia.



● Grupo Occidental

⊗ Grupo Oriental

