

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO PICUDO DEL PLÁTANO
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE), GÉNEROS *Cosmopolites* Y *Metamasius*
EN TRES LOCALIDADES DE COLOMBIA**

DIANA NATALY DUQUE GAMBOA



UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2012

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

DIANA NATALY DUQUE GAMBOA, 1988

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO PICUDO DEL PLÁTANO
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE), GÉNEROS *Cosmopolites* Y *Metamasius*
EN TRES LOCALIDADES DE COLOMBIA

PALABRAS CLAVE:

Cosmopolites sordidus, *Metamasius hemipterus*, *Metamasius hebetatus*,
Metamasius submaculatus, citocromo oxidasa I.

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO PICUDO DEL PLÁTANO
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE), GÉNEROS *Cosmopolites* Y *Metamasius*
EN TRES LOCALIDADES DE COLOMBIA**

DIANA NATALY DUQUE GAMBOA

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Bióloga con mención en Genética**

Directora

ANA MILENA CAICEDO

I.A., PhD

Codirector

JAMES MONTOYA LERMA

Biólogo, PhD

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2012

NOTA DE APROBACIÓN

El trabajo de Grado titulado “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO PICUDO DEL PLÁTANO (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE), GÉNEROS *Cosmopolites* Y *Metamasius* EN TRES LOCALIDADES DE COLOMBIA”, presentado por la estudiante DIANA NATALY DUQUE GAMBOA para optar al título de Bióloga con mención en Genética, fue revisado por el jurado y calificado como:

APROBADO

ANA MILENA CAICEDO

Directora

JAMES MONTOYA LERMA

Codirector

Jurado

DEDICATORIA

A mi Mamá por amarme, aguantarme, mantenerme y ser excelente Madre. Porque gracias a su esfuerzo, durante el pregrado podía concentrarme sólo en mis estudios e investigación. Por ser un modelo de dedicación, arranque y fortaleza.

A mi familia. Abuelita, Papá de Jorge Luis, Papá, y tía Carola, que de una u otra forma me han apoyado durante esta etapa de mi vida. A mis hermanos Fernando y Jorge Luis, por colaborarme en lo que su joven existencia puede.

A mis pocos y sinceros amigos que han hecho el pregrado más ameno.

A Diego por apoyarme, escucharme y poner mis pies en la tierra.

¡Y a mí ☺ porque es el comienzo de mi carrera!

AGRADECIMIENTOS

Al profesor James Montoya Lerma y Ana Milena Caicedo Vallejo por brindarme apoyo con su enorme experiencia, atender y participar de cada aspecto de este proyecto y principalmente por ofrecerme la oportunidad de trabajar con ellos y ejecutar este trabajo.

Al grupo de investigación en diversidad biológica de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, por diferentes razones. Primero por la financiación de esta investigación. Segundo, por permitirme el ingreso al grupo y acogerme de manera cálida. Finalmente gracias por compartir conmigo su experiencia en el laboratorio.

Al profesor Jaime Eduardo Muñoz por permitir el desarrollo de la Investigación en el Laboratorio de Biología Molecular de la UNAL, Palmira; y contribuir al proyecto con sus conocimientos en investigaciones moleculares. A Andrés Mauricio Posso por asesorarme durante la realización de las técnicas moleculares empleadas en la investigación y la secuenciación de las muestras trabajadas.

Al profesor Fernando Vallejo de la Universidad de Caldas por colaborar con los muestreos de la localidad de Caldas y proporcionarme literatura relevante en esta investigación.

A los estudiantes de maestría de la Universidad del Valle, Yherson Molina y Leonardo Arias por su colaboración con el manejo de los programas de análisis de datos que se emplearon en la investigación. Al Biólogo de la Universidad de Pamplona Diego Alexander Hernández Contreras por su colaboración en la revisión técnica Bibliográfica.

A los profesores de la Universidad del Valle que colaboraron a mi formación profesional y que incentivan al buen nivel de la institución con su exigencia académica. Particularmente a Enrique Bravo, Nelson Toro y Heiber Cárdenas por despertar mi interés en la Biología molecular.

Tabla de contenido

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1. El cultivo del plátano.....	6
3.2. Familia Curculionidae	7
3.3. El complejo picudo del plátano.....	8
3.3.1. El picudo negro <i>Cosmopolites sordidus</i>	9
3.3.1.1. Diagnósis de <i>C. sordidus</i>	10
3.3.2. El picudo rayado <i>Metamasius hemipterus</i>	11
3.3.2.1. Diagnósis de <i>M. hemipterus</i>	12
3.3.3. El picudo amarillo <i>Metamasius hebetatus</i>	13
3.3.3.1. Diagnósis de <i>M. hebetatus</i>	13
3.3.4. <i>Metamasius submaculatus</i>	14
3.3.4.1 Diagnósis de <i>M. submaculatus</i>	14
3.4. Marcadores moleculares.....	15
3.4.1. ADN mitocondrial.....	16
3.4.1.1. Citocromo oxidasa I.....	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo general.....	19

4.2. Objetivos específicos.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1. Localidades de muestreo y captura de insectos.....	20
5.1.1. Determinación de especies del complejo.....	20
5.2. Evaluación de metodologías de extracción de ADN.....	21
5.3. Amplificación del gen COI.....	22
5.3.1. Características de los cebadores.....	22
5.3.2. Condiciones de amplificación y visualización de fragmento amplificado.....	23
5.4. Secuenciación de productos de PCR.....	24
6. Análisis de datos.....	24
6.1. Análisis de secuencias de COI.....	24
6.2. Análisis de haplotipos presentes en <i>M. hemipterus</i>	25
6.3. Análisis filogenético.....	25
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7.1. Determinación de especies del complejo.....	26
7.2. Evaluación de metodologías de extracción de ADN.....	32
7.3. Amplificación del gen COI.....	35
7.4. Análisis de secuencias de ADN.....	36
7.5. Análisis de haplotipos para <i>M. hemipterus</i>	41
7.5.1. Red de haplotipos para <i>M. hemipterus</i>	44

7.5.2. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de <i>M. hemipterus</i>	46
7.6. Inferencias filogenéticas del complejo picudo del plátano.....	47
8. CONCLUSIONES.....	53
8.1 RECOMENDACIONES.....	53
9. LITERATURA CITADA.....	55
ANEXO A. Clave taxonómica para las especies de Dryophthorinae asociadas a plátano y banano (<i>Musa</i> spp.) en Colombia (Sepúlveda & Rubio 2009).....	60
ANEXO B. Protocolo de extracción de ADN descrito por Acevedo <i>et al.</i> (2007)....	61
ANEXO C. Protocolo de extracción de ADN adaptado de Sambrook <i>et al.</i> (1989)	62
ANEXO D. Protocolo basado en sales propuesto por Aljanabi & Martínez (1997)	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Localización relativa y dirección de los cebadores UEA9/UEA10 empleados para amplificar una región del gen COI. La región codificante de proteína es mostrada como una franja oscura y la región codificante de tRNA como franjas claras (Zhang & Hewitt 1996).	22
FIGURA 2: Morfotipos encontrados para las especies del complejo picudo del plátano, por observación de rasgos variables en los élitros y la coloración de los insectos. A. Morfotipo 1 de <i>C. sordidus</i> ; B. Morfotipo 1 de <i>M. hebetatus</i> . C. Morfotipo 1 de <i>M. submaculatus</i> . D. Morfotipo 2 de <i>M. submaculatus</i> . E. Morfotipo 1 de <i>M. hemipterus</i> . F. Morfotipo 2 de <i>M. hemipterus</i> . G. Morfotipo 3 de <i>M. hemipterus</i> . H. Morfotipo 4 de <i>M. hemipterus</i> . I. Morfotipo 5 de <i>M. hemipterus</i> .	31
FIGURA 3: Muestras de ADN de <i>M. hemipterus</i> obtenidas con los protocolos de extracción evaluados. A. y D. Muestras del bacteriófago lambda a concentraciones de 10 ng/μL, 20 ng/μL, 30 ng/μL, 40 ng/μL, 50 ng/μL y 100 ng/μL respectivamente. B. muestras de ADN obtenidas con el kit DNeasy Blood & Tissue. C. muestras de ADN obtenidas con el protocolo adaptado de Sambrook <i>et al.</i> (1989). E. muestras de ADN obtenidas con el protocolo descrito por Acevedo <i>et al.</i> (2007). F. muestras de ADN obtenidas con el	34

protocolo propuesto por Aljanabi & Martínez (1997).

FIGURA 4: Productos de PCR empleando los cebadores UEA9/UEA10. 34

A. Amplificación en muestras de ADN obtenidas con el protocolo descrito por Acevedo *et al.* (2007). B. Amplificación en muestras de ADN obtenidas con el protocolo propuesto por Aljanabi & Martínez (1997). C. Amplificación en muestras de ADN obtenidas con el protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (1989). D. Amplificación en muestras de ADN obtenidas con el kit DNeasy Blood & Tissue. E. Control sin ADN. E. Escalera de 100 pb.

FIGURA 5: Visualización del fragmento amplificado en las diferentes 36

especies del complejo picudo. A. Muestras de *C. sordidus*. B. Muestras de *M. hemipterus*. C. Muestras de *M. hebetatus*. D. Muestras de *M. submaculatus*. E. Control sin ADN. F. Escalera de 100 pb.

FIGURA 6: Red de haplotipos para las secuencias de *M. hemipterus* 45

con el paquete estadístico Network 4.5.1.0. Los haplotipos están designados por números romanos, cada círculo corresponde a un haplotipo. El color rojo corresponde a la localidad del Valle del Cauca, el color verde representa la localidad de Caldas, y el color amarillo corresponde a la localidad de Quindío. Cada número rojo entre haplotipos

representa un cambio mutacional.

- | | | |
|-----------------|--|----|
| FIGURA 7 | Análisis de filogenia molecular del complejo picudo del plátano empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo GTR+G con un bootstrap de 900. | 51 |
| FIGURA 8 | Relaciones filogenéticas para el complejo picudo del plátano empleando el método de Neighbor-Joining usando el parámetro 2 de Kimura con un bootstrap de 900. | 52 |

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Descripción de los cebadores empleados en la caracterización molecular (Zhang & Hewitt 1996).	22
TABLA 2: Perfil térmico de amplificación para los cebadores UEA9/UEA10 (Zhang & Hewitt 1996).	23
TABLA 3: Condiciones de amplificación para los cebadores utilizados (Zhang <i>et al.</i> 1995).	24
TABLA 4: Especies determinadas usando la clave taxonómica de Sepúlveda & Rubio (2009).	27
TABLA 5: Secuencias del Gene Bank que produjeron los alineamientos más significativos con las tres secuencias de consulta del complejo picudo del plátano.	37
TABLA 6: Distribución de haplotipos encontrados para la región COI entre las diferentes localidades y morfotipos.	42
TABLA 7 Posición de los nucleótidos polimórficos en los nueve haplotipos encontrados para la región COI en <i>M. hemipterus</i> .	44
TABLA 8 Análisis de varianza molecular (AMOVA) para <i>M. hemipterus</i> en las localidades muestreadas.	46

1. RESUMEN

El complejo picudo del plátano conformado por las especies *Cosmopolites sordidus*, *Metamasius hemipterus*, *M. hebetatus* y *M. submaculatus*, es considerada la plaga mas limitante del cultivo del plátano en Colombia, debido a la sincronización temporal entre los estadios de desarrollo de la plaga y su hospedero, su distribución en el sistema radicular y potencial biológico. La caracterización morfológica basada en caracteres como coloración de los élitros y tamaño corporal, es ambigua y dificulta la correcta identificación de las especies del complejo. El presente estudio buscó discriminar, mediante el análisis de secuencia del gen COI, las especies que conforman el complejo; aspecto esencial para el monitoreo adecuado e implementación de estrategias de manejo. Adultos de las especies que conforman el complejo se colectaron en tres localidades en los departamentos de Valle del Cauca, Caldas y Quindío, se identificaron con claves taxonómicas basadas en caracteres morfológicos externos y se realizó la extracción de ADN para la amplificación y secuenciación de una región del gen citocromo oxidasa I. Se llevaron a cabo análisis filogenéticos empleando los métodos de máxima verosimilitud con el modelo General time reverse y el método Neighbor-Joining empleando el parámetro 2 de Kimura. Los datos moleculares establecieron que la región analizada del COI en *C. sordidus*, *M. hebetatus* y *M. submaculatus* es conservada al presentar haplotipos homogéneos; mientras que para *M. hemipterus*, se presentó un total de nueve haplotipos entre las localidades muestreadas. Al analizar estos haplotipos de *M. hemipterus* entre las poblaciones se determinó que no existía una correlación entre los haplotipos encontrados y los

morfotipos determinados morfológicamente. Se concluye que el análisis de secuencias de la región COI es una herramienta útil para discriminar las especies del complejo, pero no para morfotipos encontrados de *M. hemipterus*.

PALABRAS CLAVE: *Cosmopolites sordidus*, *Metamasius hemipterus*, *Metamasius hebetatus*, *Metamasius submaculatus*, citocromo oxidasa I.

2. INTRODUCCIÓN

El plátano constituye uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, es considerado alimento básico en países tropicales y fuente de ingresos importante para mercados locales e internacionales (Valerio *et al.* 2002). De acuerdo a las estadísticas de FAO, en 2005 la producción mundial fue de 33 503 221 TM, siendo los mayores productores Uganda (29%), Colombia (10%), Ruanda (8%), Nigeria (6%) y Perú (5%) (Araya 2008). En Colombia, aproximadamente, 400 000 hectáreas se encuentran destinadas al cultivo del plátano, con un volumen total de producción de 2.9 millones de toneladas anuales y un rendimiento promedio de seis toneladas por hectárea (Belálcazar 2005; Aranzazu *et al.* 2005). La zona central cafetera (departamentos de Caldas, Risaralda, Quindío, Norte del Valle del Cauca y Norte del Tolima) contribuye con un 60% de la producción nacional (Sánchez & Vallejo 2010).

Entre los insectos-plaga más severos asociados a cultivos de plátano se encuentran barrenadores de cormo y pseudotallo tales como el gusano tornillo *Castniomera humboldtii* (Maubl Ashby), el gusano canasta *Oiketicus kirbyi* (Guiling), el gusano cabrito *Opsiphanes tamarindi* (Felder), y los picudos *Cosmopolites sordidus* (Germar), *Metamasius hemipterus* (Linnaeus) y *Metamasius hebetatus* (Gyllenhal) (Sánchez & Vallejo 2010, Rubio & Acuña 2006). No obstante, a nivel global, *C. sordidus* es el insecto de mayor importancia en estos cultivos (Montesdeoca *et al.* 2005, Smithson *et al.* 2001, Paparu *et al.* 2008). Esta especie, junto con *M. hemipterus* y *M. hebetatus*, integran lo que en la zona central cafetera de Colombia, se considera como el complejo picudo del plátano,

siendo el problema más limitante del cultivo dada la sincronización temporal entre los estadios de desarrollo del insecto y el hospedero, su distribución en el sistema radicular y su potencial biológico (Sánchez & Vallejo 2010, Rubio & Acuña 2006).

A pesar de la importancia económica que presenta el complejo de picudos del plátano, los trabajos de investigación se han enfocado hacia su control y manejo, restando importancia a la generación de información básica en relación a las especies que lo componen (Vallejo *et al.* 2007, Sánchez & Vallejo 2010, Rubio & Acuña 2006, Sepúlveda & Rubio 2009). Vallejo *et al.* (2007) describieron los estadios adultos e inmaduros para *C. sordidus* y, posteriormente, generaron las claves taxonómicas para la identificación de adultos basada en la genitalia de machos (Sánchez & Vallejo 2010) o en características externas. Sin embargo, es manifiesto que existen ambigüedades en cuanto a caracteres de identificación morfológica como la coloración de los élitros y el tamaño corporal de las especies pertenecientes al complejo, lo que dificulta la identificación precisa de los individuos. El patrón de coloración de *C. sordidus* puede presentarse en otras especies de Curculionidae. *M. hemipterus* presenta un rango amplio de variación, hasta tres patrones en cuanto a coloración de los élitros y distribución de manchas, por lo que algunos autores proponen la presencia de subespecies. En *M. hebetatus* y *M. submaculatus* se puede presentar similitud en el patrón de coloración de los élitros aunque *M. submaculatus* tiende a ser más pequeño y aplanado dorso-ventralmente que *M. hebetatus* (Sepúlveda & Rubio 2009).

La identificación precisa de las diferentes especies que conforman el complejo es esencial para la adopción de monitoreos apropiados y desarrollo de estrategias

eficientes de manejo. Hasta la presente no se tienen estudios sobre caracterización molecular de ninguna especie del complejo y sólo se cuenta con claves taxonómicas basadas en caracteres morfológicos. La presente investigación se realizó con el objetivo de discriminar las principales especies del complejo picudo del plátano, mediante el análisis molecular de un fragmento del gen citocromo oxidasa I; contrastando a su vez los resultados moleculares con la diferenciación morfológica.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. El cultivo del plátano

El cultivo del plátano es parte fundamental de la dieta alimenticia de los colombianos, su cultivo está distribuido en todas las regiones y es socioeconómicamente relevante. Participa con el 6.8% del total de la producción agrícola del país, ocupa el quinto lugar después del café, la caña de azúcar, la papa y las flores (Ministerio de Agricultura 2005). Existen más de 381 000 hectáreas sembradas con una producción de 2.9 millones de toneladas anuales, de las cuales el 95% se dedican al mercado interno, un 4% se destina a exportación y 1% como materia prima para la agroindustria nacional (Ministerio de Agricultura 2005). Las regiones del país donde el plátano es cultivado a nivel comercial son: la zona central cafetera en la Región Andina con 234 000 hectáreas, Orinoquía, la región Pacífica, el Caribe y la Amazonía (Rodríguez & Rodríguez 2001). Los departamentos de Risaralda, Caldas, Quindío, norte del Valle del Cauca y norte de Tolima participan con el 60% de la producción nacional. El cultivo del plátano genera cerca de 286 000 empleos permanentes por año, correspondiendo 175 000 a la Región Andina e Interandina (Aranzazu *et al.* 2005). La falta de conocimiento en el manejo de insectos plaga y enfermedades comúnmente asociados al cultivo del plátano ha ocasionado que en algunas regiones se generen importantes niveles de pérdidas económicas e incluso la pérdida total de las plantaciones (Belálcazar 1991). En Colombia los principales insectos plaga asociados a su cultivo son los barrenadores del cormo y pseudotallo, que generan daños severos en las plantas y permiten la entrada de

enfermedades debido a las galerías que dejan sus larvas al alimentarse. Los picudos, negro *C. sordidus*, rayado *M. hemipterus* y amarillo *M. hebetatus*, son considerados actualmente las plagas más severas y la expansión de sus poblaciones es favorecida por la sincronía temporal entre los estadios de desarrollo de los insectos con los del cultivo, los hábitos crípticos de estas especies y la alta tasa de reproducción (Sánchez & Vallejo 2010).

3.2. Familia Curculionidae

Howard *et al.* (2001) describen a Curculionidae como una de las familias más diversas de organismos, incluye más de 100 subfamilias con más de 50 000 especies ampliamente distribuidas en el mundo. De acuerdo a este autor, el éxito puede atribuirse a su especialización como barrenadores de plantas en el momento de la radiación de las angiospermas a mediados y finales del Cretácico. Las especies de esta familia muestran variedad de tamaños y son denominadas escarabajos picudos, por su singular forma del rostro a manera de nariz o pico, largo y delgado, bien desarrollado que, en muchas especies, puede ser tan largo como el resto del cuerpo (Arnett & Thomas 2004; Borror *et al.* 1992). Muchos picudos tienen rangos estrechos de hospederos siendo familia o género específicos. En la mayoría de picudos asociados a plantas de palma, el rango de hospederos es amplio dentro de Palmae aunque incluye plantas como caña de azúcar (Gramineae), plátano (Musaceae) y piña (Bromeliaceae). Se ha demostrado coevolución entre especies de Curculionidae y especies de plantas hospederas, en diferentes relaciones incluyendo la fitofagia (Anderson 1995; Howard *et al.* 2001). La especificidad hacia un grupo de hospederos permite que

se presente la formación de complejos de insectos que comparten el mismo recurso alimenticio y debido a diferencias drásticas en la calidad y cantidad de alimento disponible para la larva, los picudos del plátano y la caña pueden exhibir un polimorfismo de gran tamaño, que conduce a la confusión acerca de la identidad de las especies (Howard *et al.* 2001).

3.3. El complejo picudo del plátano

Conformado por *C. sordidus*, *M. hemipterus*, *M. hebetatus* y *M. submaculatus*, es propio de cultivos de plátano y banano en los departamentos de Antioquia, Caldas, Chocó, Cundinamarca, Meta, Risaralda y Valle del Cauca; del cual aún se desconoce su biología e importancia económica (Sepúlveda & Rubio 2009). Estas especies de Curculionidae pertenecen a la subfamilia Dryophthorinae y las predominantes son *C. sordidus* y *M. hemipterus*, en menor grado *M. hebetatus* (Rubio & Acuña 2006, Gonzales *et al.* 2007). Además se destaca que cada especie tanto en estado larval como adulto se alimenta de una parte específica del hospedero. *C. sordidus* del cormo, *M. hemipterus* del pseudotallo y *M. hebetatus* se alimenta de los primeros centímetros de pseudotallo cerca al cormo (Gonzales *et al.* 2007), generando disminución de vida útil y rendimiento de las plantaciones (Sepúlveda & Rubio 2009).

En este complejo de especies, *C. sordidus* es la de mayor distribución a nivel mundial y de mayor importancia económica en el cultivo de musáceas en países tropicales y subtropicales. Las poblaciones de *M. hemipterus* y *M. hebetatus* han incrementado en los cultivos de plátano en la zona central cafetera de nuestro país

(Rubio & Acuña 2006, Castrillón 2000). La proporción de *C. sordidus* en los cultivos de plátano en esta región del país se ha estimado que corresponde a 40.5% mientras que *M. hebetatus* es de 33.9% y 25.6% para *M. hemipterus* (Castrillón 2000). Sobre *M. submaculatus* aun no se cuenta con estudios sobre su impacto en la producción del plátano, únicamente se tienen registros de su presencia y se incluye dentro de la clave taxonómica para la correcta identificación de las especies pertenecientes al complejo picudo que ataca los cultivos de plátano en el país (Sepúlveda & Rubio 2009).

3.3.1. El picudo negro *Cosmopolites sordidus*

Presenta coloración negra con un tamaño aproximado de 15 a 18 mm de longitud, el cuerpo es estrecho, alargado y ovalado; con superficie lisa, glabra, mate. La superficie de los élitros tiene estrías y punturas profundas. La cabeza exhibe un pico largo y curvo (Sepúlveda & Rubio 2009, Cárdenas & Arango 1987). Los adultos presentan movimientos lentos, tienen actividad nocturna, huyen de la luz y son sensibles a cambios de temperaturas ambientales por debajo de 18°C y por encima de 40°C. Pueden vivir 810 días en condiciones naturales, 748 en laboratorio, y 60 días sin alimento (Becarri 1967 citado por Sánchez & Vallejo 2010).

Durante su ciclo de vida, presenta cuatro estadíos larvales que duran entre 25 y 35 días. Las larvas son ápodas, miden de 12 a 15 mm de longitud. Tienen el cuerpo en forma de C con tagmas bien definidos, pliegue y sin sedas. Son de color blanco amarillento y su cabeza es bien desarrollada, de color café oscuro con

mandíbulas grandes y fuertes. El estadio de pupa mide 12 mm y dura aproximadamente siete días en eclosionar, pasando de coloración blanca a ámbar; se desarrolla al interior del rizoma (Cárdenas *et al.* 1991, Castrillón 2000). *C. sordidus* es olífago, se alimenta de plantas de los géneros *Musa* y *Ensete*. Tanto en estadio adulto como en estadios de larva, se alimenta del corno del plátano (Gold & Messiaen 2000).

3.3.1.1 Diagnosis de *C. sordidus*

Uniformemente puntuado excepto en antenas, tercio apical del rostro y en línea longitudinal mesal en el pronoto; rostro curvo, ensanchado en el primer tercio basal; ápice de la clava antenal redondeado y la porción pilosa ocupando menos de la mitad de la clava completa. Porción expuesta del escutelo redondeada (tan ancha como larga; mesoepimeron con forma de pentágono; élitros glabros, con el ápice redondeado y con solo una línea de punturas profundas en cada estría elitral. Protibias con uncus y mucron apicales, meso y metatibias solo con mucron. Tarsómeros cilíndricos, el cuarto es poco visible (se observa insertado en la parte dorsal del tercero) y el ápice del tercer tarsómero de la metapata es casi tan ancho como el ápice del segundo. A diferencia de *Metamasius*, este género no presenta línea lateral media en el aedeago. El dimorfismo sexual no es muy evidente, pero se pueden sexar con el ángulo del ápice de la placa pigidial, el cual es agudo en las hembras y obtuso en los machos. (Sepúlveda & Rubio 2009),

3.3.2. El picudo rayado *Metamasius hemipterus*

Esta especie abarca una gran variedad en la coloración desde rojo a naranja y amarillo con negro, las manchas en el pronoto presentan además variaciones en cuanto a diseño o formas. De acuerdo con Vaurie (1966) la longitud es de 9 a 20 mm y la coloración es desde predominantemente naranja hasta completamente negra, razón por la cual puede confundirse con otras especies o pensar que se trata de más de una especie. Para Castrillón (2000) los adultos tienen una longitud de 15 a 20 mm y la coloración es desde rojiza a amarillo con manchas torácicas de color negro, y élitros manchados de color negro de manera irregular y muy variable. Los adultos habitan lugares húmedos y oscuros en restos de cosecha, viven aproximadamente 60 días. La oviposición se realiza en tejidos de pseudotallo en descomposición o en heridas de esta porción de la planta; la hembra puede depositar entre 400 y 500 huevos ovalados que miden en promedio 1.5 mm de largo por 0.5 mm de ancho. La eclosión de las larvas ocurre entre 5 y 7 días (Castrillón 2000). Presentan coloración amarillenta miden de 15 a 20 mm de longitud, la cabeza es bien desarrollada de color oscuro con mandíbulas fuertes y grandes. Son ápodas con un cuerpo en forma de C, ensanchado en la parte terminal y tagmas bien definidos, con abundantes sedas cortas y pliegues. El estadio de pupa dura entre 18 a 25 días y mide de 20 a 25 mm, la larva construye una cámara pupal con fibras del hospedero (Castrillón 2000, Sánchez & Vallejo 2010).

M. hemipterus es polífaga, asociada a diferentes especies de palmáceas, musáceas, y gramíneas. Es de importancia económica en cultivos de caña de

azúcar, por lo que se conoce como picudo de la caña podrida, taladrador de la caña, gorgojo o picudo rayado. Se considera de gran importancia en cultivos de plátano en nuestro país, tanto las larvas como los adultos se alimentan del pseudotallo en las plantas de plátano (De La Riva *et al.* 2005).

3.3.2.1 Diagnósis de *M. hemipterus*

Cuerpo liso, punturas suaves presentes en la base del pronoto, los fémures, escleritos pleurales, placa pigidial y en la región ventral tanto del tórax como del abdomen. Estrías elitrales formadas por líneas de punturas profundas, intervalos elitrales lisos; región lateral de los élitros con diminutas setas distribuidas uniformemente. Antenas truncadas apicalmente con la porción pilosa de la clava antenal ocupando menos de la mitad de la longitud de la clava completa. Porción expuesta del escutelo triangular; mesoepimeron rectangular. Tibias con mucron, pero sin uncus; los primeros tarsómeros son cilíndricos, el tercero acorazonado y el cuarto se observa dorsalmente insertado en el tercero; ápice del segundo tarsómero de la metapata la mitad de ancho del tercero. Margen interno de las coxas y el proesterno en frente de las coxas presenta un margen de setas amarillas, aunque puede no ser evidente en todos los especímenes. Los machos presentan una línea media completa en el aedeago (lo que caracteriza al género *Metamasius*). El dimorfismo sexual es poco marcado, normalmente las hembras son de mayor tamaño que los machos y el ángulo de la placa pigidial es más agudo en las hembras (Sepúlveda & Rubio 2009),

3.3.3. El picudo amarillo *Metamasius hebetatus*

Los adultos presentan longitud de 8 a 12 mm, coloración oscura con manchas rojizas en el pronoto y los élitros, vientre de color oscuro y dorso pardo rojizo por lo que las manchas irregulares del tórax son difíciles de observar. Las manchas en los élitros presentan forma de C o semicírculo (Sánchez & Vallejo 2010, Castrillón 2000). Los diferentes estadios de desarrollo son similares a *M. hemipterus*, los adultos se alimentan de los primeros centímetros del pseudotallo cerca del cormo. Las larvas se alimentan del pseudotallo tienen una longitud promedio de 10 a 12 mm de color blanco marfil y cuerpo curvado. La pupa tiene una longitud promedio de 11.4 mm de color ámbar y la larva construye una cámara pupal construida con fibras del hospedero. Se desconocen los principales parámetros biológicos y su importancia económica, pero se considera plaga secundaria dentro del cultivo del plátano (Sánchez & Vallejo 2010).

3.3.3.1 Diagnósis de *M. hebetatus*

Presenta punturas en todo el integumento excepto en la mitad apical del rostro y las antenas; el rostro exhibe una fina pilosidad en el tercio basal. Élitros glabros con punturas inconspicuas a lo largo de los las estrías y los intervalos; las estrías a simple vista se ven como líneas completas y sin dicha esculturación. Ápice de la clava antenal truncado, porción pilosa de la clava ocupando la mitad de la clava antenal completa. Porción expuesta del escutelo triangular, mesoepimerón rectangular. Ápice del tercer tarsómero de la metapata casi del tamaño del ápice del segundo, carácter por el cual se puede descartar fácilmente que se trate de *M.*

submaculatus. El dimorfismo sexual no es evidente y en la mayoría de los casos se requiere levantar la placa pigdial para determinar el sexo del ejemplar (Sepúlveda & Rubio 2009),

3.3.4. *Metamasius submaculatus*

La biología y hábitos de esta especie son desconocidos, no se ha incluido en trabajos realizados sobre el cultivo del plátano, o investigaciones asociadas al complejo picudo pese a estar registrada en el catálogo de Gallego y Vélez (1992). De acuerdo con Sepúlveda & Rubio (2009), son de coloración naranja y presentan manchas circulares en los élitros, aunque también pueden ser completamente negros con manchas naranjas como *M. hebetatus*.

3.3.4.1 Diagnósis de *M. submaculatus*

Presenta punturas en todo el cuerpo excepto en las antenas y en el tercio apical de los élitros. Clava antenal redondeada en el ápice, cuya porción pilosa ocupa un tercio de la clava completa. Porción expuesta del escutelo triangular; mesoepimerón rectangular pero mucho más angosto que en *M. hemipterus* y *M. hebetatus*. Tibias con mucron y sin uncus; tarsos de cinco segmentos, pero el cuarto es pequeño y difícil de ver (solo visible dorsalmente insertado en el tercero); ápice del tercer tarsómero de la metapata dos veces más ancho que el ápice del segundo. El macho presenta una línea media completa en el aedeago como todos los de su género. La especie exhibe dimorfismo sexual marcado, el cual consiste en la presencia de ondulaciones o crestas ventrales en el rostro de los machos (Sepúlveda & Rubio 2009).

3.4. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares permiten estudiar el material genético de manera directa consiguiendo rasgos moleculares universales. El desarrollo de la Biología Molecular y de los marcadores moleculares de ADN ha tenido un gran impacto en el estudio de animales y plantas, mediante el análisis de genomas, construcción de mapas genéticos de alta resolución, lo cual ha permitido mayor entendimiento de las relaciones entre especies, avances significativos en estudios filogenéticos, clasificación taxonómica y el desarrollo de estudios a nivel de poblaciones (Graham & McNicol 1995). El polimorfismo del ADN puede derivar de cambios espontáneos o neutrales, o de mutaciones en el caso del genoma mitocondrial y de cloroplastos. Dichos cambios pueden medirse por diferentes marcadores disponibles como los de polimorfismo de base única (SNP, por sus siglas en inglés single nucleotide polymorphism), donde la diferencia se observa en una sola posición nucleotídica, por ejemplo sustituciones, deleciones o inserciones de un solo nucleótido. Otros son los minisatélites VNTR (minisatellite variant repeats o número de secuencias de tamaño variable) que son repeticiones en tándem de 10 a 60 pares de bases (pb) altamente polimórficas y permiten detección de heterocigotos lo que es un aspecto favorable en estudios poblacionales. También los microsatélites, SRR (short tándem repeat o secuencias repetidas cortas) son de uso más frecuente en análisis de poblaciones, los segmentos cortos de ADN son repeticiones en tándem de uno a seis pb al ser repeticiones aleatorias en regiones no codificantes del genoma las diferencias son de tipo neutral al igual que con los VNTR. Estos son considerados una buena herramienta para estudios

genéticos al presentar un elevado grado de polimorfismo, herencia mendeliana simple, codominancia repetitivos y automatizables (Goldstein & Schlotterer 1999). El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, RFLP, es una técnica en la que se visualizan las diferencias de estructura del ADN basándose en el uso de enzimas de restricción, con la limitación de solo detectar dos alelos por locus lo que reduce la variabilidad observable y puede enmascarar potenciales SNPs (Vance & Othmane 1998). El polimorfismo amplificado aleatoriamente o RAPD (random amplified polymorphic DNA), se basan en el uso de oligonucleótidos cortos para generar fragmentos de amplio espectro partiendo del ADN molde, con la limitante de la baja reproducibilidad de los análisis y la dominancia de la técnica (Levin *et al.* 1994). En estudios filogenéticos y evolutivos es más frecuente el uso de marcadores moleculares conservados, donde las variaciones son debidas a cambios mutacionales y es común el uso de secuencias de ADN ribosomal, de cloroplastos, mitocondrias y regiones codificantes del genoma nuclear; el propósito de la secuenciación es determinar el orden de los nucleótidos de un gen o región codificante, partiendo de fragmentos de PCR o genes clonados (Satz 1993). Las secuencias de nucleótidos que se obtienen para la región diana en cada organismo pueden ser comparadas y publicadas en bases de datos electrónicas (GENBANK, EMBL, etc) y de esta manera se facilita la comparación entre ellas y con las de otros taxones.

3.4.1. ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) comúnmente utilizado en estudios filogenéticos y estudios poblacionales en metazoos. Su contribución para descifrar la estructura y

evolución del ADNmt lo han convertido en una buena herramienta en estudios evolutivos, adicionalmente a las características como la fácil extracción, el alto número de copias, falta de recombinación, conservación de la secuencia, estructura en metazoa, y rangos de tasa de mutación en diferentes regiones de la molécula. La identificación de cebadores para PCR conservados ha promovido su uso en estudios evolutivos y ha incentivado a la realización de investigaciones filogenéticas a nivel molecular (Kocher *et al.* 1989).

3.4.1.1. Citocromo oxidasa I

El gen mitocondrial que codifica la sub unidad I del citocromo oxidasa (COI) posee características que permite su uso como marcador molecular para estudios filogenéticos y evolutivos. Como catalizador terminal en la cadena respiratoria mitocondrial, ha sido bien estudiado a nivel bioquímico, su tamaño y estructura parece ser conservada entre organismos aerobios investigados (Saraste 1990). Estudios mutacionales han permitido mapear el centro de reacción de esta subunidad lo que hace posible la interpretación de las diferencias en cuanto a secuencias en términos de funcionamiento del gen (Gennis 1992). Los residuos de aminoácidos en los centros de reacción son altamente conservados, pero no dominan por completo la molécula permitiendo un nivel considerable de variabilidad en algunas regiones. Adicionalmente, el COI es la subunidad más grande de las tres sub-unidades del citocromo oxidasa de acuerdo con Clary & Wolstenholme (1985), y es uno de los genes codificantes más grandes en el genoma mitocondrial de metazoa. Esto permite amplificar y secuenciar muchos caracteres dentro del mismo complejo funcional. Lunt *et al.* (1996) desarrollaron un

análisis comparativo de COI en diferentes órdenes de Insecta mostrando que diferentes regiones de este gen evolucionan a diferentes tasas lo que es aprovechable para propósitos de estudios filogenéticos. Por lo anterior el COI es considerado como un buen marcador en la caracterización molecular de especies, y empleado en estudios inter-específicos y de poblaciones.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Caracterizar molecularmente las especies de los géneros *Cosmopolites* y *Metamasius* (Coleoptera: Curculionidae), que integran el complejo picudo del plátano mediante el análisis de secuencia del gen COI.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar metodologías de extracción de ADN de curculiónidos.
- Identificar las especies del complejo de picudos del plátano de los géneros *Cosmopolites* y *Metamasius* (Coleoptera: Curculionidae) mediante el uso de secuenciación de regiones específicas de ADN mitocondrial.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localidades de muestreo y captura de insectos

Se colectaron individuos adultos de *Cosmopolites* y *Metamasius* en plantaciones de plátano en los departamentos de Valle del Cauca N 3° 27' 47.8" WO 76° 19' 33.3"(Palmira), Caldas N 5° 4' 24.8" WO 75° 40' 19.8" (Santágueda) y Quindío N 4° 25' 22.7" WO 75° 41' 51"(Montenegro), a partir de trampas tipo sándwich, que consisten en una porción de 30 cm de pseudotallo de plantas de plátano y una tapa de pseudotallo de 15 cm encima (Sánchez & Vallejo 2010) . Captura directa de especímenes en suelo, cormos de plantas cosechadas o caídas, alrededor de pseudotallos y en material en descomposición. El material colectado se conservó en etanol absoluto y fue almacenado en un congelador a -20°C para evitar la degradación de los tejidos.

5.1.1. Determinación de especies del complejo

La determinación de especies del complejo se realizó con la clave taxonómica de Sepúlveda & Rubio (2009) (ANEXO A), basada en caracteres morfológicos externos observables con uso del microscopio-estereoscopio. El único carácter interno usado en esta clave es la línea media del aedeago en *Metamasius* el cual se extrajo levantando la placa pigidial y halando el aedeago con una aguja de disección de punta curva. Los morfotipos presentes fueron determinados por observación de rasgos variables en los élitros y la coloración de los insectos.

5.2. Evaluación de metodologías de extracción de ADN

Se evaluaron cuatro técnicas de extracción de ADN genómico para seleccionar el protocolo que permitiera obtener ADN en mayor cantidad y de mejor calidad para realizar amplificaciones por medio de PCR convencional de las cuatro especies de Curculionidae del complejo picudo. Dos protocolos basados en fenol cloroformo, el primero descrito por Acevedo *et al.* (2007) (ANEXO B), el segundo adaptado de Sambrook *et al.* (1989) (ANEXO C); el tercer método basado en sales propuesto por Aljanabi & Martínez (1997) (ANEXO D) y, finalmente, la extracción de ADN obtenida a partir del kit de extracción comercial DNeasy Blood & Tissue de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La evaluación de los protocolos se realizó sólo con individuos de *M. hemipterus*. Se emplearon tres pares de patas y el protórax de un individuo para la extracción. La evaluación de la cantidad y calidad del ADN obtenido se realizó en geles de agarosa al 0.8% corridos en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 0.045M; EDTA 0.001M) a 100V durante una hora. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL y las concentraciones de ADN se determinaron mediante comparación con concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago lambda. Además se realizaron ensayos de amplificación para determinar el protocolo adecuado. Las diluciones de todas las muestras extraídas se hicieron a una concentración final de 1 ng/µL en tubos de 1.5 mL. En total se emplearon para el análisis molecular 43 insectos provenientes de las diferentes localidades de muestreo. Las técnicas moleculares empleadas en la investigación se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

5.3. Amplificación del gen COI

5.3.1. Características de los cebadores

De acuerdo con Zhang & Hewitt (1996) los cebadores UEA9/UEA10 (Tabla 1, Figura 1) pueden ser empleados para estudios entre especies cercanamente relacionadas y genéticos de poblaciones de insectos. Estos pares de cebadores amplifican muy bien para coleópteros, cubren las partes más variables del COI y pueden emplearse para estudios intra-específicos.

Tabla 1. Descripción de los cebadores empleados en la caracterización molecular (Zhang & Hewitt 1996).

Nombre común	Nombre estándar	Tamaño (bases)	Secuencia (5' - 3')
UEA9	C1-J-2753	26	GTAAACCTAACATTTTTTCCTCAACA
UEA10	TL2-N-30 14	25	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA

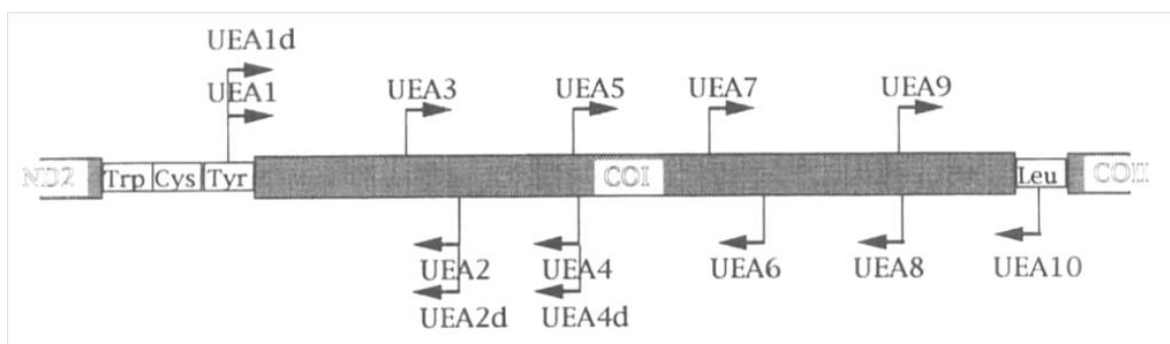


Figura 1. Localización relativa y dirección de los cebadores UEA9/UEA10 empleados para amplificar una región del gen COI. La región codificante de proteína es mostrada como una franja oscura y la región codificante de tRNA como franjas claras (Zhang & Hewitt 1996).

5.3.2. Condiciones de amplificación y visualización de fragmento amplificado

Se empleó la pareja de cebadores UEA9/UEA10, para la amplificación por PCR de una región del COI, la amplificación fue llevada a cabo de acuerdo a lo descrito por Zhang *et al.* (1995) para *Schistocerca gregaria* (Tabla 3) y Zhang & Hewitt (1996) (Tabla 2). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.4% en tampón TBE 0.5 X (tris-borato 0.045M; EDTA 0.001M) a 100 V por 40 minutos. La tinción se hizo con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL. La visualización se realizó con un transiluminador ultravioleta. El peso del fragmento obtenido se estimó por comparación con una escalera de 100 pb (PROMEGA).

Tabla 2. Perfil térmico de amplificación para los cebadores UEA9/UEA10 (Zhang & Hewitt 1996).

Ciclo	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	4 minutos
Desnaturalización	95	45 segundos
Hibridación	50	1 minuto
Extensión	72	1.30 minutos
35 ciclos desde el paso 2		
Extensión final	72	7 minutos

Tabla 3. Condiciones de amplificación para los cebadores utilizados (Zhang *et al.* 1995).

Reactivo	[] Inicial	[] Final
Buffer Taq	10 X	1 X
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTPs	1.25 mM	0,2 mM
Cebador UEA9	10 µM	0.06 µM
Cebador UEA10	10 µM	0.06 µM
Taq polimerasa	50 U/µL	2 U
ADN	30 ng/µL	1 ng
Volumen total	50µL	

5.4. Secuenciación de productos de PCR

La secuenciación de los fragmentos amplificados se realizó con la colaboración de Departamento de Biología de la Universidad de Saskatchewan; Saskatoon, Canadá.

6. Análisis de datos

6.1. Análisis de secuencias del COI

Las secuencias fueron alineadas y editadas con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). Se realizó un BLAST a través de la plataforma del NCBI con tres secuencias tomadas al azar para confirmar la amplificación exitosa de la región deseada (Zhang *et al.* 2000).

La caracterización molecular se realizó estimando la composición nucleotídica, el número de sustituciones nucleotídicas, porcentaje de sitios polimórficos. Se estimó la diversidad haplotípica y nucleotídica para *M. hemipterus* en las localidades de muestreo con el programa Arlequín 3.11 (Excoffier & Schneider 2005).

6.2. Análisis de haplotipos en *M. hemipterus*

Se realizó un análisis de red de haplotipos para *M. hemipterus*, con el programa Network 4.5.1.0, para identificar el haplotipo más ancestral y los cambios mutacionales entre haplotipos derivados (Bandelt *et al.* 1999). Además se realizó el análisis de la varianza molecular entre las diferentes localidades muestreadas con el programa Arlequín 3.11 (Excoffier & Schneider 2005).

6.3. Análisis filogenético

Para este análisis, se designó como grupo externo a *C. sordidus*, y se incluyó dentro del análisis una secuencia de *C. sordidus* disponible en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acceso AY131111).

El modelo evolutivo que mejor se ajusta a los datos fue estimado con JModeltest 0.1 (Posada 2008; Guindon & Gascuel 2003). La construcción de la filogenia para el complejo se desarrolló empleando máxima verosimilitud usando el modelo General Time Reversible con el programa Mega 5 (Tamura *et al.* 2011). El análisis de agrupamiento con el método de Neighbor-Joining, el parámetro de distancias Kimura 2.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Determinación de especies del complejo

Se determinaron las especies de 65 individuos colectados en las diferentes localidades de muestreo (Tabla 4) empleando la clave taxonómica de Sepúlveda & Rubio (2009) (ANEXO A). En el caso de las especies *C. sordidus* y *M. hebetatus*, se encontró que dichas especies son monomórficas y los individuos determinados no presentaron variaciones en los patrones de coloración de los élitros (Figura 2.A, 2.B). En la especie *M. submaculatus* se encontraron dos individuos de color negro (Figura 2.D), muy diferente del morfotipo que se encontró en el resto de los individuos de esta especie y que corresponde a la especie tipo de la misma (Figura 2.C). La especie más variable fue *M. hemipterus* con cinco morfotipos (Figura 2.E-2.I) determinados por observación de rasgos variables en los élitros como la coloración y patrones de distribución de manchas (Figura 2).

Los morfotipos encontrados en las especies del complejo coinciden con lo descrito en la literatura. De acuerdo con la re-descripción del adulto de *C. sordidus* realizada por Vallejo *et al.* (2007) esta especie es monomórfica y la coloración es negra uniforme en todo el cuerpo del insecto (Figura 2.A). El picudo amarillo *M. hebetatus* es distinguido por un morfotipo bien definido, con dos bandas semicirculares de color naranja en los élitros según lo reportado por Sepúlveda & Rubio (2009) y la descripción realizada por Sánchez & Vallejo (2010) (Figura 2.B). Los morfotipos encontrados para *M. submaculatus* también se reportan en la investigación realizada por Sepúlveda & Rubio (2009) en la que se describe que

esta especie puede presentar individuos de coloración completamente negra, como en el caso del morfotipo 2 (Figura 2.D), y en general se presenta el morfotipo 1 (Figura 2.C) de coloración naranja con manchas circulares negras en los élitros.

M. hemipterus es la especie del complejo con más variaciones en cuanto a patrones de coloración de acuerdo con Vaurie (1966), por lo que se han propuesto las subespecies *M. hemipterus hemipterus*, *M. hemipterus sericeus* y *M. hemipterus carbonarius*; las cuales no han sido adoptadas por que su descripción está basada únicamente en la coloración de los élitros. Los morfotipos encontrados corresponden a lo descrito por Sepúlveda & Rubio (2009), desde predominantemente negro (morfotipos 1, 5), y con patrones de manchas irregulares en los élitros naranja (morfotipo 3) y amarillo (morfotipo 2, 4).

Tabla 4. Especies determinadas usando la clave taxonómica de Sepúlveda & Rubio (2009).

Muestra	Especie	Morfotipo	Localidad
1	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1	Valle del Cauca
2	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1	Valle del Cauca
3	<i>Metamasius hebetatus</i>	1	Valle del Cauca
4	<i>Metamasius hebetatus</i>	1	Valle del Cauca
5	<i>Metamasius submaculatus</i>	1	Valle del Cauca
6	<i>Metamasius submaculatus</i>	1	Valle del Cauca
7	<i>Metamasius hemipterus</i>	1	Valle del Cauca
8	<i>Metamasius hemipterus</i>	1	Valle del Cauca

9	<i>Metamasius hemipterus</i>	2	Valle del Cauca
10	<i>Metamasius hemipterus</i>	2	Valle del Cauca
11	<i>Metamasius hemipterus</i>	3	Valle del Cauca
12	<i>Metamasius hemipterus</i>	3	Valle del Cauca
13	<i>Metamasius hemipterus</i>	4	Valle del Cauca
14	<i>Metamasius hemipterus</i>	4	Valle del Cauca
15	<i>Metamasius hemipterus</i>	5	Valle del Cauca
16	<i>Metamasius hemipterus</i>	5	Valle del Cauca
17	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1	Caldas
18	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1	Caldas
19	<i>Metamasius hebetatus</i>	1	Caldas
20	<i>Metamasius hebetatus</i>	1	Caldas
21	<i>Metamasius submaculatus</i>	1	Caldas
22	<i>Metamasius submaculatus</i>	1	Caldas
23	<i>Metamasius submaculatus</i>	2	Caldas
24	<i>Metamasius submaculatus</i>	2	Caldas
25	<i>Metamasius hemipterus</i>	1	Caldas
26	<i>Metamasius hemipterus</i>	1	Caldas
27	<i>Metamasius hemipterus</i>	3	Caldas
28	<i>Metamasius hemipterus</i>	3	Caldas
29	<i>Metamasius hemipterus</i>	4	Caldas
30	<i>Metamasius hemipterus</i>	4	Caldas
31	<i>Metamasius hemipterus</i>	5	Caldas

32	<i>Metamasius hemipterus</i>	5	Caldas
33	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1	Quindío
34	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1	Quindío
35	<i>Metamasius hebetatus</i>	1	Quindío
36	<i>Metamasius hebetatus</i>	1	Quindío
37	<i>Metamasius submaculatus</i>	1	Quindío
38	<i>Metamasius submaculatus</i>	1	Quindío
39	<i>Metamasius hemipterus</i>	3	Quindío
40	<i>Metamasius hemipterus</i>	3	Quindío
41	<i>Metamasius hemipterus</i>	4	Quindío
42	<i>Metamasius hemipterus</i>	4	Quindío
43	<i>Metamasius hemipterus</i>	5	Quindío
44	<i>Metamasius hemipterus</i>	5	Quindío
45	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1	Valle del Cauca
46	<i>Metamasius hebetatus</i>	1	Valle del Cauca
47	<i>Metamasius submaculatus</i>	1	Valle del Cauca
48	<i>Metamasius hemipterus</i>	1	Valle del Cauca
49	<i>Metamasius hemipterus</i>	2	Valle del Cauca
50	<i>Metamasius hemipterus</i>	3	Valle del Cauca
51	<i>Metamasius hemipterus</i>	4	Valle del Cauca
52	<i>Metamasius hemipterus</i>	5	Valle del Cauca
53	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1	Caldas
54	<i>Metamasius hebetatus</i>	1	Caldas

55	<i>Metamasius submaculatus</i>	1	Caldas
56	<i>Metamasius submaculatus</i>	3	Caldas
57	<i>Metamasius hemipterus</i>	3	Caldas
58	<i>Metamasius hemipterus</i>	4	Caldas
59	<i>Metamasius hemipterus</i>	5	Caldas
60	<i>Cosmopolites sordidus</i>	1	Quindío
61	<i>Metamasius hebetatus</i>	1	Quindío
62	<i>Metamasius submaculatus</i>	1	Quindío
63	<i>Metamasius hemipterus</i>	3	Quindío
64	<i>Metamasius hemipterus</i>	4	Quindío
65	<i>Metamasius hemipterus</i>	5	Quindío



Figura 2. Morfotipos encontrados para las especies del complejo picudo del plátano, por observación de rasgos variables en los élitros y la coloración de los insectos. A. Morfotipo 1 de *C. sordidus*; B. Morfotipo 1 de *M. hebetatus*. C. Morfotipo 1 de *M. submaculatus*. D. Morfotipo 2 de *M. submaculatus*. E. Morfotipo 1 de *M. hemipterus*. F. Morfotipo 2 de *M. hemipterus*. G. Morfotipo 3 de *M. hemipterus*. H. Morfotipo 4 de *M. hemipterus*. I. Morfotipo 5 de *M. hemipterus*.

7.2. Evaluación de metodologías de extracción de ADN

La extracción de ADN con el kit comercial DNeasy Blood & Tissue permitió obtener muestras con concentraciones entre 10 y 40 ng/ μ L (Figura 3. B), de buena calidad y sin contaminantes. Con el protocolo de extracción adaptado de Sambrook *et al.* (1989), se obtuvieron muestras con una concentración de 50 a 100 ng/ μ L de buena calidad, con restos de ADN degradado (Figura 3. C). Las muestras de ADN extraídas con la técnica descrita por Acevedo *et al.* (2007), no permitieron visualizar ADN (Figura 3. E). Mediante la metodología propuesta por Aljanabi & Martínez (1997), se consiguieron concentraciones de ADN de 50 ng/ μ L con un alto grado de contaminantes y residuos precipitados (Figura 3. F). Las anteriores concentraciones de ADN se presentan en un volumen final de dilución de 80 μ L.

La cuantificación de ADN por comparación con concentraciones conocidas del bacteriófago lambda permitió determinar apropiadamente las concentraciones de ADN. Esta técnica de cuantificación es propuesta como una metodología de fácil y de rápida implementación para la cuantificación de ADN total y menos costosa al no requerir la utilización de equipos especializados como espectrofotómetros o fluorómetros (Posso 2010).

Los resultados de la amplificación por PCR de las muestras de ADN extraídas a partir de las cuatro técnicas a evaluar, fueron exitosos para dos de los cuatro métodos. El protocolo de extracción adaptado de Sambrook *et al.* (1989) y el kit

comercial permitieron la amplificación exitosa de un fragmento de 300 pb (Figura 4. C, D).

No se observó producto amplificado del ADN obtenido con los protocolos de Acevedo *et al.* (2007) y Aljanabi & Martínez (1997) (Figura 4. A. B.). Las muestras obtenidas empleando la técnica descrita por Acevedo *et al.* (2007) probablemente no contenían ADN en la concentración mínima requerida para la amplificación exitosa (aproximadamente 1 ng/μL). Además las muestras podrían contener impurezas del compuesto fenol y restos biológicos del insecto que no se eliminaron durante el proceso de purificación del ADN, lo cual contribuye a la inhibición de la reacción de PCR. Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos por estos autores con la especie *Hypothenemus hampei* “broca del café”, al cual lograron amplificar un fragmento de 208 pb correspondiente al marcador STS P8. De igual manera, con el protocolo propuesto por Aljanabi & Martínez (1997), tampoco fue posible la amplificación por PCR, posiblemente por la alta concentración de sales inhibió la reacción. Esto coincide con lo obtenido por Rodríguez *et al.* (2011) con muestras de Thysanoptera, donde las muestras de ADN presentaban residuos de sales inhibiendo la reacción de PCR con cebadores específicos para el orden tomando como diana la región ITS.

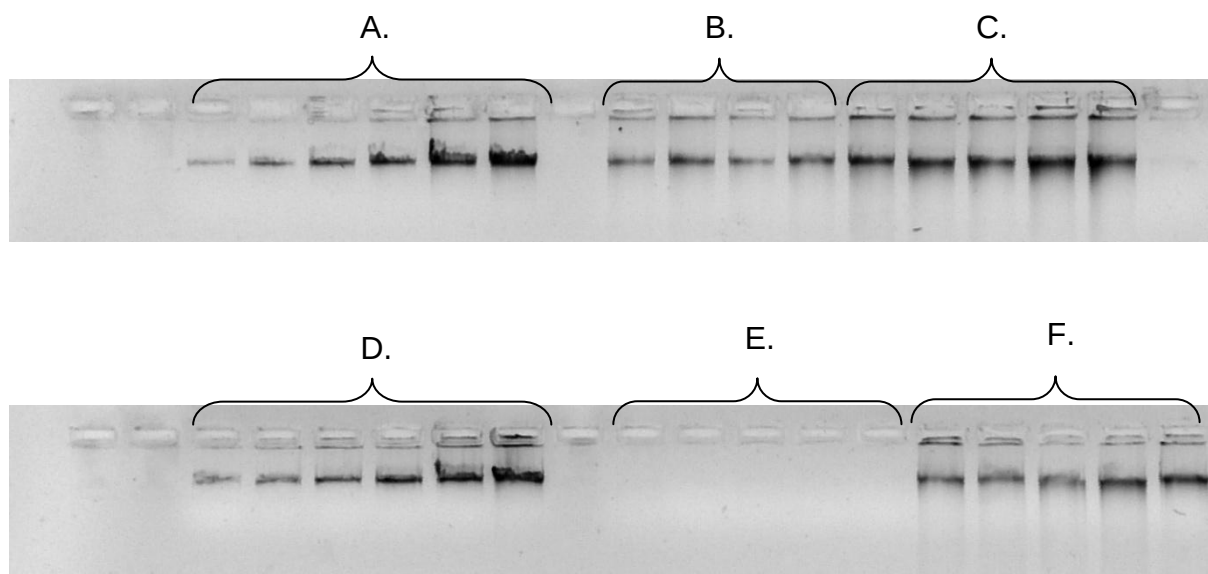


Figura 3. Muestras de ADN de *M. hemipterus* obtenidas con los protocolos de extracción evaluados. A. y D. Muestras del bacteriófago lambda a concentraciones de 10 ng/μL, 20 ng/μL, 30 ng/μL, 40 ng/μL, 50 ng/μL y 100 ng/μL respectivamente. B. muestras de ADN obtenidas con el kit DNeasy Blood & Tissue. C. muestras de ADN obtenidas con el protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (1989). E. muestras de ADN obtenidas con el protocolo descrito por Acevedo *et al.* (2007). F. muestras de ADN obtenidas con el protocolo propuesto por Aljanabi & Martínez (1997).

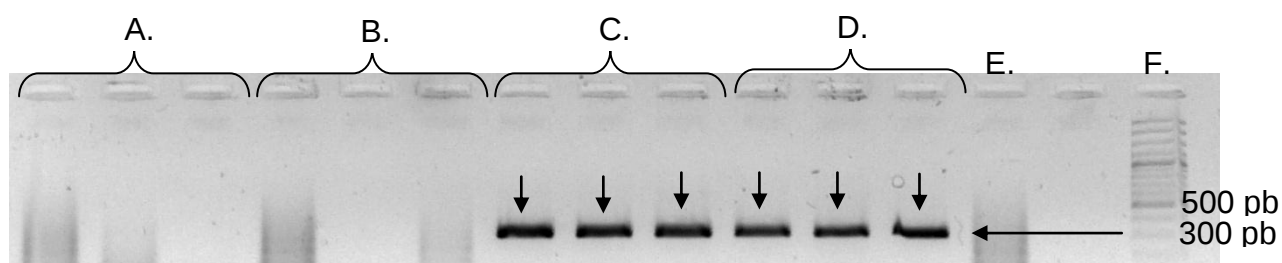


Figura 4. Productos de PCR empleando los cebadores UEA9/UEA10. A. Amplificación en muestras de ADN obtenidas con el protocolo descrito por Acevedo *et al.* (2007). B. Amplificación en muestras de ADN obtenidas con el protocolo propuesto por Aljanabi & Martínez (1997). C. Amplificación en muestras de ADN obtenidas con el protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (1989). D. Amplificación en muestras de ADN obtenidas con el kit DNeasy Blood & Tissue. E. Control sin ADN. F. Escalera de 100 pb.

La extracción de ADN de muestras biológicas es un paso fundamental en las investigaciones moleculares, del cual depende el éxito de los procesos subsiguientes (Rodríguez *et al.* 2011). La optimización de la cantidad y calidad de ADN requieren de protocolos de extracción adecuados que purifiquen los ácidos nucleicos, remuevan proteínas, residuos orgánicos y sales, que interfieren en la reacción de PCR. La metodología de extracción de ADN adaptada de Sambrook *et al.* (1989), fue la más adecuada en cuanto a la cantidad y calidad de ADN obtenido en comparación con las demás metodologías evaluadas y de menor costo en comparación con el uso del kit comercial. Por lo anterior la metodología de extracción de ADN adaptada de Sambrook *et al.* (1989), fue empleada para la extracción de ADN de las 65 muestras de insectos colectados en las diferentes localidades de muestreo (Tabla 4).

7.3. Amplificación del gen COI

Se amplificó una región del COI de 300 pb empleando los cebadores UEA9/UEA10 (Figura 5), en 65 muestras de ADN de insectos pertenecientes a las diferentes especies del complejo picudo. Este resultado es consecuente con lo descrito por Zhang & Hewitt (1996) para el coleóptero *Carabus vidaceous*, empleando la misma pareja de cebadores, el fragmento amplificado fue de 300 pb.

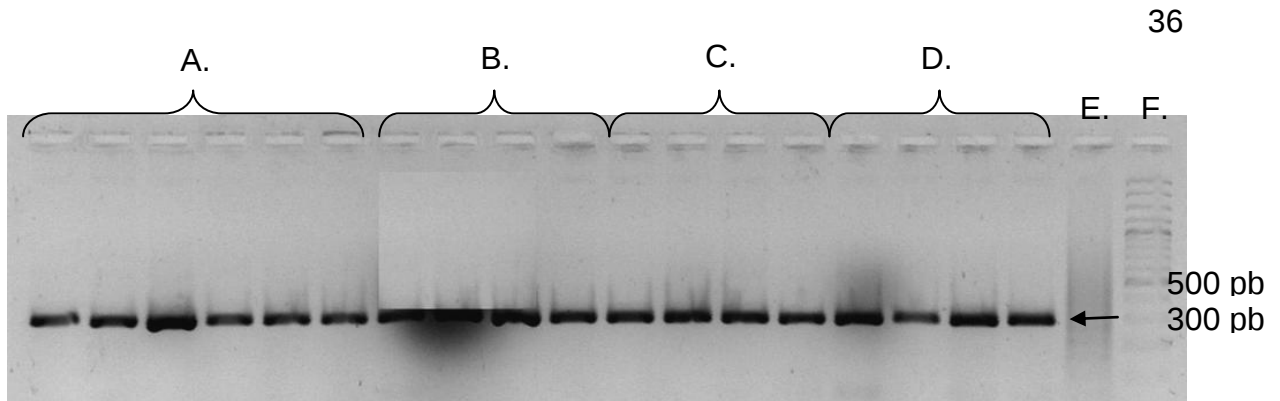


Figura 5. Visualización del fragmento amplificado en las diferentes especies del complejo picudo. A. Muestras de *C. sordidus*. B. Muestras de *M. hemipterus*. C. Muestras de *M. hebetatus*. D. Muestras de *M. submaculatus*. E. Control sin ADN. F. Escalera de 100 pb.

7.4. Análisis de secuencias de ADN

Para confirmar la amplificación de la región mitocondrial del COI, se realizó un BLAST a partir de tres secuencias tomadas al azar entre los dos géneros investigados. Las muestras seleccionadas fueron la W1 *C. sordidus*, W21 *M. submaculatus* y la W59 *M. hemipterus*. Se encontró para cada especie un porcentaje de homología entre 78 y 98%, con secuencias correspondientes a regiones mitocondriales de COI en especies de Coleoptera (Tabla 5). Por lo anterior se corrobora que se amplificó la región deseada.

Tabla 5. Secuencias del Gene Bank que produjeron los alineamientos más significativos con las tres secuencias de consulta del complejo picudo del plátano.

Accesión	Descripción	Máximo puntaje	Cobertura	Máxima identidad
Secuencia de consulta: W1 <i>C. sordidus</i>				
AY131111	<i>Cosmopolites sordidus</i> Citocromo subunidad I (COI) gen, cds parcial; gen mitochondrial para producto mitochondrial	388	90%	98%
FN398251.1	<i>Conoderinae sp.</i> COB-002 Gen parcial mitochondrial COI para citocromo C oxidasa subunidad I, ejemplar de muestra BMNH:747614.	134	51%	86%
AJ293040	<i>Aleochara clavicornis</i> Gen parcial mitochondrial COI para citocromo oxidasa I y gen parcial COII para citocromo oxidasa II.	134	99%	78%
Secuencia de consulta: W21 <i>M. submaculatus</i>				
AJ293093.1	<i>Aleochara notula</i> mitochondrial gen parcial COI para	178	99%	81%

	citocromo oxidasa I y gen parcial COI para citocromo oxidasa II.			
AY570892.1	<i>Tomicus n. sp.</i> CK-2004 aislamiento P-ZY4 citocromo oxidasa I (COI) gen, cds parcial; gen tRNA-Leu, complete sequence; y citocromo oxidasa II (COII) gen, cds parcial; mitochondrial.	159	85%	81%
AY570891.1	<i>Tomicus n. sp.</i> CK-2004 aislamiento P-ZY5 citocromo oxidasa I (COI) gen, cds parcial; gen tRNA-Leu, secuencia completa; y citocromo oxidasa II (COII) gen, cds parcial; mitochondrial.	159	85%	81%
Secuencia de consulta: W59 <i>M. hemipterus</i>				
GU176345.1	<i>Naupactus xanthographus</i> Genoma mitochondrial completo.	154	100%	79%
DQ155736.1	<i>Rhinocyllus conicus</i> Ejemplar de muestra BMNH	102	67%	78%

	673295 citocromo oxidasa I			
	(COI) gen, cds parcial;			
	mitochondrial.			
JF278870.1	<i>Pristoderus bakewellii</i>	75	42%	80%
	Aislamiento PB88 ejemplar de			
	muestra NZAC_PB88			
	citocromo oxidasa I (COI) gen,			
	cds parcial; mitochondrial.			

Las secuencias de COI para las especies *C. sordidus*, *M. hebetatus* y *M. submaculatus*, son altamente conservadas. Lo que concuerda con Lunt *et al.* (1996) donde se muestra que esta región de COI, al ser parte de una región codificante puede mostrar altos niveles de conservación de secuencia y tamaño de la secuencia entre diferentes ordenes de Insecta. El picudo negro presentó un único haplotipo en las tres localidades muestreadas. La composición nucleotídica correspondió a timina 35.4%, citosina 19.1%, adenina 33.7% y 11.8% para guanina. Las secuencias del picudo amarillo presentaron una composición nucleotídica de timina 39.6%, citosina 18.0%, para adenina 30.5% y 12.0% para guanina. Esta especie presentó dos haplotipos que se diferencian únicamente en un cambio de bases en la posición 160 donde se encontró una sustitución de tipo A→G, para un sólo individuo de la localidad de Valle del Cauca. En el caso de *C. sordidus* y *M. hebetatus*, se tomó una muestra de ADN escogida al azar por cada localidad para el análisis de las secuencias, al ser monomórficas, y debido a que

las secuencias resultaron altamente homogéneas (99% de homología para muestras de *M. hebetatus* y 100% para muestras de *C. sordidus*) entre muestras de distintos departamentos, se determinó usar sólo estas secuencias para los análisis filogenéticos posteriores. *M. submaculatus* presentó una composición nucleotídica de timina 40.7%, citosina 16.3%, adenina 32.4% y guanina 10.6%. Esta especie se mostró dos haplotipos que se diferencian en la sustitución de tipo T→A en la posición 238 en un individuo del morfotipo 1 de la localidad de Valle del Cauca y una transición en la posición 139 de tipo T→C en el individuo del morfotipo 2 de la localidad de Caldas. En el caso de esta especie que presentó dos morfotipos, se tomó una muestra al azar de cada departamento del morfotipo 1 y una muestra del morfotipo 2 del departamento de Caldas, para ser secuenciadas y como resultaron altamente homogéneas (99% de homología) entre departamentos se emplearon sólo dichas muestras para el análisis filogenético.

A partir de 33 secuencias de *M. hemipterus* de 245 pb se observaron 12 sitios polimórficos y 13 sustituciones nucleotídicas (Tabla 7). Las transiciones de tipo T→C ó C→T fueron más frecuentes (61.53%), seguidas por transiciones de tipo A→G ó G→A (30.76%). Se presentaron dos cambios de tipo A→T ó T→A (15.38%) y una transversión de tipo G→T. La composición nucleotídica fue timina 41.4%, citosina 17.4%, adenina 28.6% y guanina 12.6%. La diversidad nucleotídica para la localidad de Quindío fue la más alta, 0.009524 +/- 0.006499; y la diversidad genética de igual manera fue la más alta entre las localidades, 0.9167 +/- 0.0725. En Caldas la diversidad nucleotídica fue de 0.006382 +/-

0.004640 y la diversidad genética fue de 0.6000 +/- 0.1539. La diversidad nucleotídica de la localidad del Valle del Cauca fue de 0.003611 +/- 0.003028, la diversidad genética fue la más baja entre las localidades analizadas, 0.2949 +/- 0.1558.

7.5. Análisis de haplotipos para *M. hemipterus*

Se identificaron nueve haplotipos entre las 33 secuencias de *M. hemipterus* (Tabla 6). El haplotipo I fue el más frecuente (0.36), presente en 12 individuos de los cuales la mayoría correspondieron a la localidad del Valle del Cauca y sólo uno a la localidad de Quindío (Tablas 6, 7). El segundo haplotipo más frecuente fue el V (0.27) en nueve individuos, dos de la localidad de Quindío y siete de Caldas (Tablas 6, 7). Los haplotipos IV, VI y VII son propios de la localidad de Caldas; mientras que los haplotipos VIII y IX se presentan únicamente en individuos de Quindío. Los haplotipos II y III son compartidos entre individuos de Valle del Cauca y Quindío (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de haplotipos encontrados para la región COI entre las diferentes localidades y morfotipos.

Haplotipo [*]	Individuo ^{**}	Morfotipo ^{***}	Localidad
I	W-65	5	Quindío
	W-10	2	Valle del Cauca
	W-16	5	Valle del Cauca
	W-49	2	Valle del Cauca
	W-50	3	Valle del Cauca
	W-48	1	Valle del Cauca
	W-8	1	Valle del Cauca
	W-52	5	Valle del Cauca
	W-11	3	Valle del Cauca
	W-15	5	Valle del Cauca
	W-7	1	Valle del Cauca
	W-9	2	Valle del Cauca
II	W-14	4	Valle del Cauca
	W-39	3	Quindío
	W-41	4	Quindío
III	W-13	4	Valle del Cauca
	W-63	3	Quindío
	W-40	3	Quindío
IV	W-59	5	Caldas

V	W-32	5	Caldas
	W-28	3	Caldas
	W-57	3	Caldas
	W-58	4	Caldas
	W-30	4	Caldas
	W-27	3	Caldas
	W-29	4	Caldas
	W-64	4	Quindío
	W-42	4	Quindío
VI	W-26	1	Caldas
	W-25	1	Caldas
VII	W-31	5	Caldas
VIII	W-44	5	Quindío
IX	W-43	5	Quindío

*En números romanos están denominados los haplotipos. ** Se referencian los individuos presentes en cada uno. *** La clasificación de los morfotipos es asumido por el análisis morfológico.

Tabla 7. Posición de los nucleótidos polimórficos en los nueve haplotipos encontrados para la región COI en *M. hemipterus*.

Población total			Posición relativa											
			10	19	43	52	54	61	66	148	157	166	200	203
Secuencia de referencia			T	C	G	T	G	C	T	T	A	T	G	T
Haplotipos	n	Frecuencia												
I	12	0.36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
II	3	0.09	C	T	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.
III	3	0.09	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
IV	1	0.03	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
V	9	0.27	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VI	2	0.06	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
VII	1	0.03	.	T	.	A	.	T	A	C	G	.	.	.
VIII	1	0.03	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
IX	1	0.03	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.

7.5.1. Red de haplotipos para *M. hemipterus*

La red de haplotipos propone al haplotipo V como el ancestral, el cual es compartido por muestras de las localidades de Caldas y Quindío, aunque la mayor proporción de muestras corresponde a Caldas, lo que sugiere que esta localidad es centro de origen de dispersión de esta especie entre las localidades muestreadas. El haplotipo más derivado fue el VII, único para la localidad de Caldas y contiene un mayor número pasos mutacionales. Los haplotipos IV y VI

también fueron exclusivos de esta localidad. Los haplotipos VIII y IX resultaron exclusivos de la localidad de Quindío, mientras que Valle del Cauca no presentó haplotipos únicos y en su mayoría las muestras de esta localidad presentaron el haplotipo I que es compartido con un individuo de la localidad del Quindío, y los haplotipos II y III se compartieron entre Valle del Cauca y Quindío (Figura 6).

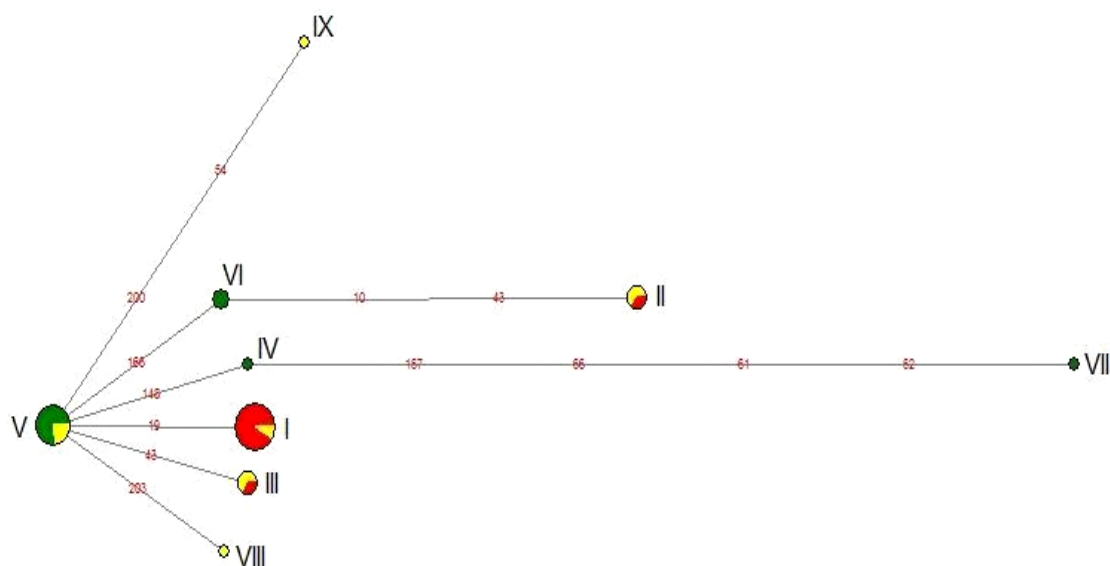


Figura 6. Red de haplotipos para las secuencias de *M. hemipterus* con el paquete estadístico Network 4.5.1.0. Los haplotipos están designados por números romanos, cada círculo corresponde a un haplotipo. El color rojo corresponde a la localidad del Valle del Cauca, el color verde representa la localidad de Caldas, y el color amarillo corresponde a la localidad de Quindío. Cada número rojo entre haplotipos representa un cambio mutacional.

7.5.2. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de *M. hemipterus*

Se realizó el análisis molecular de varianza para estimar la distribución de la diversidad genética dentro y entre localidades de colecta de individuos de *M. hemipterus*, se asumió que cada localidad es una población. Al realizar el AMOVA para las poblaciones de *M. hemipterus*, se encontró que la mayor variación genética se debe a diferencias propias de los individuos al interior de las poblaciones; mas no entre las poblaciones. Por otra parte el F_{ST} mostró diferenciación poblacional (0.25132 p-valor<0.05) (Tabla 8). Lo anterior contrasta con lo observado en la red de haplotipos (Figura 6), donde se puede inferir un flujo génico entre las poblaciones muestreadas y se observan los haplotipos compartidos entre localidades.

Tabla 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para *M. hemipterus* en las localidades muestreadas.

Fuente de variación	gl.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	2	6.965	0.25130 Va	25.13
Dentro de la población	30	22.459	0.28120 Vb	74.87
total	32	29.424	0.99994	
F_{ST}	0.25132			

7.6. Inferencias filogenéticas del complejo picudo del plátano

El modelo evolutivo que mejor se ajustó a los datos es el modelo General Time Reversible (GTR+G) (-lnL 854.7906) con distribución gamma y un parámetro de forma igual a 0.6420. La tasa de transición/transversión fue de 1.21; las frecuencias de nucleótidos fueron $\text{freqA} = 0.3154$, $\text{freqC} = 0.1825$, $\text{freqG} = 0.1199$ y $\text{freqT} = 0.3823$.

El análisis de máxima verosimilitud mostró una agrupación de dos clados, el primero congrega las tres secuencias muestreadas de *C. sordidus* con la secuencia de esta especie obtenida en el Genbank con una confiabilidad de 100%. La segunda agrupación corresponde al género *Metamasius* con una confiabilidad de 100%. Con el análisis fue posible discriminar las especies del género *Metamasius*. Los individuos determinados por medio de clave taxonómica como *M. submaculatus* se agruparon de manera independiente a los individuos determinados morfológicamente como *M. hebetatus* y *M. hemipterus* con una confiabilidad de 98%; y de igual manera los individuos determinados como *M. hebetatus* y *M. hemipterus* se agruparon independientemente de las demás especies con una confiabilidad de 100%. Los resultados de las agrupaciones moleculares por el análisis de máxima verosimilitud son concordantes con las determinaciones morfológicas (Figura 8). En contraste, el grupo de secuencias correspondientes a *M. hemipterus* no permitieron establecer relaciones de acuerdo a los morfotipos establecidos puesto que dentro de esta gran agrupación se encontraron mezclas de las secuencias de los diferentes morfos. Sin embargo se observó una agrupación de acuerdo a la localidad de procedencia y una

separación de las muestras del eje cafetero (Caldas y Quindío) con las de la localidad del Valle del Cauca (Figura 7). Lo anterior coincide con los análisis de haplotipos que se encontraban compartidos por diferentes morfotipos (Tabla 6). Finalmente, en la localidad del Valle del Cauca se encontró predominantemente el haplotipo I, por lo que se puede visualizar en el árbol esta separación relativa de las muestras de esta localidad con las del eje cafetero.

La topología obtenida por el método de Neighbor-Joining con el parámetro 2 de Kimura fue muy similar a la estimada con el método de máxima verosimilitud, y de igual manera coincide con la discriminación morfológica a nivel de especie. Aunque de manera similar con el análisis de máxima verosimilitud no fue posible discriminar los morfotipos de *M. hemipterus*, pero se presentó una agrupación de individuos de la localidad del Valle del Cauca, que se separa de los individuos colectados en las localidades de Quindío y Caldas (Figura 8).

El análisis filogenético permitió determinar que los individuos de *M. hemipterus* sólo se agrupan claramente para la localidad del Valle del Cauca, sin embargo los individuos de Quindío y Caldas no se agruparon de manera independiente (Figura 7, 8). Por lo tanto las topologías generadas mediante los árboles filogenéticos no mostraron estructura geográfica para esta especie. Los haplotipos compartidos entre localidades como es el caso de los haplotipos I, II, III, V, (Tabla 6, Figura 6) mostraron flujo génico contrario con lo que muestra el valor de F_{ST} (Tabla 8) donde aparentemente existe diferenciación poblacional a nivel de esta región de COI.

El análisis de las relaciones filogenéticas a partir de una región del COI mostraron diferenciación molecular entre las especies del complejo. Las agrupaciones moleculares comparadas con las agrupaciones basadas en discriminación mediante clave taxonómica mostraron concordancia con lo observado por Stauffer (1997), quien encontró variación inter-específica mas no intra-específica en siete especies del género *Ips* (Coleoptera: Scolytidae). En *M. hemipterus* posiblemente se presente una separación incompleta del linaje, es decir que no ha pasado tiempo suficiente para que las subespecies acumulen mutaciones únicas (Johnsgard 1960). Igualmente se debe considerar que los patrones de coloración pueden estar sujetos a una variedad de presiones de selección influenciados por aspectos como éxito de apareamiento, forrajeo o eventos estocásticos. Además, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Palenko *et al.* (2004), quienes emplearon la misma región del COI para investigar eventos recientes de divergencia entre poblaciones de mariquitas (Coleoptera: Coccinellidae) de los géneros *Adalia* y *Coccinella*, el análisis de variación ADN mitocondrial no mostró diferencias entre poblaciones diferentes de especies en cada género que presentan diferencias morfológicas marcadas, no se encontraron caracteres genéticos con respecto a los cuales las poblaciones y morfotipos puedan ser diferenciados en agregados (clusters).

En el presente estudio no se evidencio diferencia molecular para esta región entre los morfotipos establecidos a partir de patrones de coloración y distribución de manchas en los élitros para *M. hemipterus*, lo que sugiere que estos caracteres no son adecuados en la determinación de especies, pero es necesario la

investigación de otras regiones del genoma mitocondrial y nuclear para establecer relaciones a nivel taxonómico.

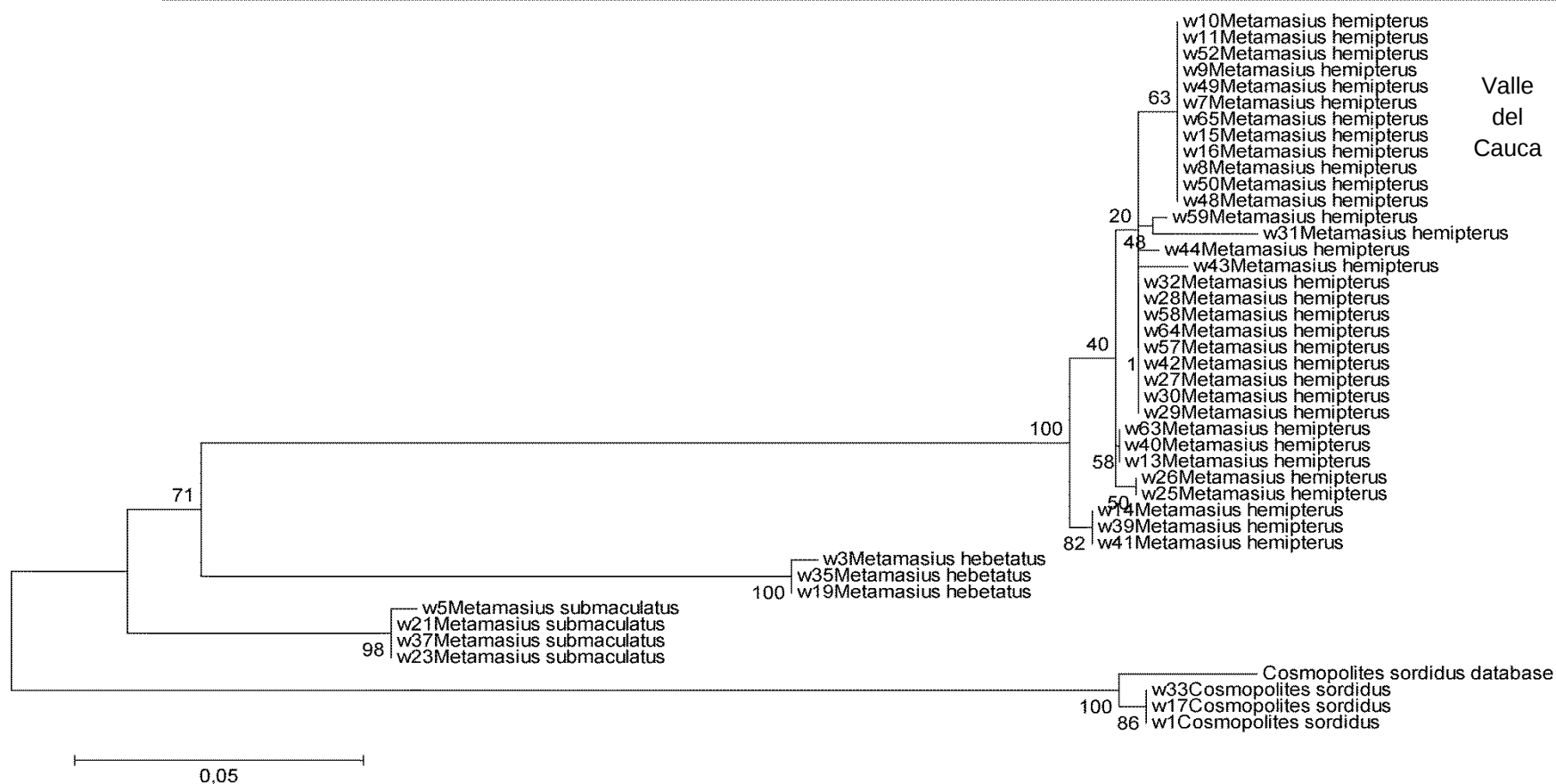


Figura 7. Análisis de filogenia molecular del complejo picudo del plátano empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo GTR+G con un bootstrap de 900.

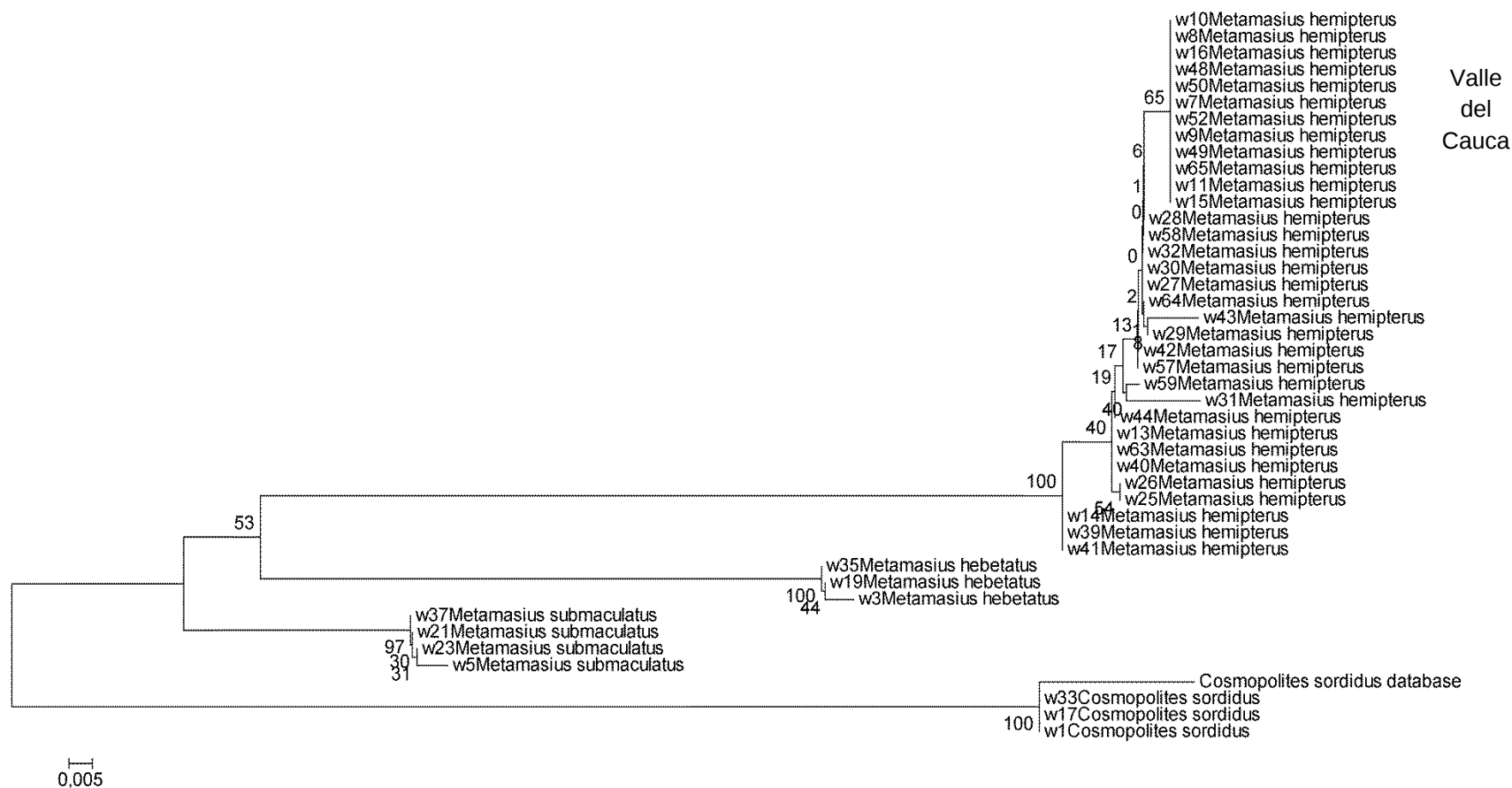


Figura 8. Relaciones filogenéticas para el complejo picudo del plátano empleando el método de Neighbor-Joining usando el parámetro 2 de Kimura con un bootstrap de 900.

8. CONCLUSIONES

La metodología de extracción de ADN de Sambrook *et al.* (1989) adaptada en esta investigación, permitió la extracción de ADN de buena calidad y cantidad en los curculiónidos investigados.

Con los datos moleculares obtenidos se encontró que el análisis de secuencias de la región COI fue una herramienta útil para establecer las relaciones filogenéticas a nivel de especie, pero no a nivel de morfotipos al no permitir la separación entre individuos de *M. hemipterus* de diferentes morfos.

La presencia de haplotipos compartidos entre los morfotipos de *M. hemipterus* dificultó la asignación de individuos a un morfo específico a partir de datos moleculares.

8.1 RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de la región del COI empleada en la investigación para discriminar las especies del complejo picudo del plátano.

Es necesario incluir un mayor número de individuos de cada morfotipo y otros marcadores mitocondriales y nucleares que ayuden a estimar el grado de diferenciación molecular entre estos. Además, es recomendable ampliar el número de muestras en las localidades, para verificar la estructura poblacional de *M. hemipterus*, así como emplear mas marcadores mitocondriales, nucleares y marcadores neutrales.

Se aconseja ampliar el área de estudio, para aumentar el conocimiento en las relaciones filogenéticas y poblacionales de las especies del complejo picudo del plátano, analizando individuos presentes en otras regiones del país. Además se recomienda ampliar el número de marcadores moleculares mitocondriales y emplear marcadores nucleares para incrementar el conocimiento de dichas inferencias filogenéticas.

9. LITERATURA CITADA

Acevedo, F. E., Navarro, L., Constantino, L. M., Gil, Z. N., & Benavides, P. (2007). Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. *Cenicafé*, 58(2): 134-141.

Aljanabi, S.M., & Martínez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25 (22): 4692-4693.

Anderson, R.S. (1995). An evolutionary perspective on diversity in Curculionoidea. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 14:103-114.

Aránzazu, H. F., Valencia, M., Arcila, P., Arias, C., Bolaños, B., Castellanos, C., Pérez, J., & Rodríguez, M. (2005). El cultivo del plátano. Manual Técnico CORPOICA. Regional No 9. Gobernación de Caldas. Secretaría de Caldas. Manizales. Corporación colombiana de investigación agropecuaria. 114 p.

Araya, J. M. (2008). Agrocadena del plátano. Caracterización de la agrocadena. Costa Rica, Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección Regional Huertar Norte. 82 p.

Arnett, H. R. Jr., Thomas, M. C., Skelley, P. E., & Frank, J. H. (2002). American Beetles Volume II. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. *CRC Press*, Florida. 861 p.

Belalcázar, S. L. (1991). El cultivo del plátano (*Musa* AAB Simmonds) en el trópico. Colombia, Instituto Colombiano Agropecuario ICA. 376 p.

Belalcázar, S. L. (2005). El cultivo del plátano en el trópico. Colombia, Instituto Colombiano Agropecuario ICA. 376p.

Borror, D. J., Triplehorn, C. A., & Johnson, N. F. (1992). An Introduction to the study of insects (6th ed.). New York, N.Y: Saunders College Publisher. 875 p.

Cárdenas, M. R., Benavides, G.M., Arroyave, R.R., & Arango, L.G. (1991). Manejo de Plagas en Plátano. En: Castrillón, C., Arias, J. A., Palacino, J.H., & Grisales López, F.L. ed. Seminario de actualización sobre la investigación en el cultivo de plátano. 29/31 de Julio de 1991, Colombia. Manizales: Universidad de Caldas–ICA, 146 p.

Cárdenas, M. R., & Arango, B. L. (1987). Control del picudo negro del plátano *Musa* AAB Simmonds *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) mediante prácticas Culturales. *Cenicafé*, 38 (1- 4): 50-61.

Castrillón, C. (2000). Distribución de las Especies de picudo del plátano y evaluación de sus entomopatógenos nativos en el departamento de Risaralda. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA – Regional No 9. Manizales. 72 p.

Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1985). The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 252-271.

De la Riva, P., Palabral, A., Apaza, M., & Altamirano, N. (2005). Inferencias sobre el rol de los succionadores (*Metamasius sp.*) en el daño producido por insectos fitófagos a partir de un análisis de daño foliar en *Munnozia hastifolia*. *Ecología en Bolivia*, 40 (2): 5-9.

Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.

Gallego, F. L., & Vélez, R. (1992). XIX Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Lista de Insectos que afectan los principales cultivos, plantas forestales, animales domésticos y al hombre en Colombia. Colombia, Medellín. Universidad Nacional de Colombia, 62-64.

Gennis, R. B. (1992). Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome C oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1101 (2): 184-187.

Gold, C. S., & Messiaen, S. (2000). El picudo negro del banano *Cosmopolites sordidus*. Hoja divulgativa No. 4. Montpellier, Francia, INIBAP. 4 p.

Goldstein, B. D., & Schlotterer, C. (1999). Microsatellites evolution and applications. New York, N.Y: Oxford University Press. 352 p.

González, C., Aristizábal, L., & Aristizábal, J. (2007). Dinámica poblacional de picudos en plátano (*Musa AAB*) Dominico Hartón. *Agronomía*, 15 (2): 33-38.

Graham, J., & Mcnicol, R. (1995). An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 90 (7-8): 1128-1132.

Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52 (5): 696-704.

Howard, F. W., Moore, D., Giblin-davis, R. M., & Abad, R.G. (2001). Insects on palms. United Kingdom: CAB International. 381 p.

Johnsgard, P. A. (1960), Hybridization in the Anatidae and its taxonomic implications. *The Condor*, 62 (1): 25-33.

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA sequence evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (16): 6196-6200.

Levin, I., Santagelo, L., Cheng, H., Crittenden, B., & Dodgson, B. (1994). An autosomal genetic linkage map of the chicken. *The Journal of Heredity*, 85 (2): 79-85.

Lunt, D. H., Zhang, D. X., Szymura, J. M., & Hewitt, G. M. (1996). The insect Cytochrome Oxidase I gene: Evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5 (3): 153-165.

Ministerio de agricultura y desarrollo rural IICA. (2005). La cadena del plátano en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica. 1991-2005. Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de trabajo No. 61.

Montesdeoca, M., Lobo, M. G., Casañas, N., Carnero, A., Castañera, P., & Ortego, F. (2005). Partial characterization of the proteolytic enzymes in the gut of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on larval performance. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 116 (3): 227-236.

Palenko, M. V., Mukha, V. D., & Zakharov, I. A. (2004). Intraspecific and interspecific variation of the mitochondrial gene of cytochrome oxidase I in ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). *Russian Journal of Genetics*, 40 (2): 148-151.

Paparu, P., Dubois, T., Gold, S., Niere, B., Adipala, E., & Coyne, D. (2008). greenhouse and field persistence of nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* in Musa tissue culture plants. *Microbial Ecology*. 55 (3): 561-568.

Posada D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25 (7): 1253-1256.

Posso, A. Cárdenas, H., & Muñoz, J. (2010). Diversidad genética de accesiones de nacedero *Trichanthera gigantea* (Humb. & Bonpl.) Nees mediante RAMS (random amplified microsatellites). Trabajo de grado para optar al título de Biólogo. Universidad del Valle. 92 p.

Rodríguez, A., Posos, P., Belkis, P. & Moraima, S. (2011). Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN en insectos del orden thysanoptera. *Revista de Protección Vegetal*, 26 (3): 187-190.

Rodríguez, M., & Rodríguez, S. (2001). Aspectos socioeconómicos del cultivo de plátano en Colombia. *INFOMUSA*, 10 (1): 4-6.

Rúbio, J. D., & Acuña, J. R. (2006). Comparative anatomy of the digestive tract in imagos of the weevil complex (Coleoptera: Curculionidae) associated with plantain plantations. *Revista Colombiana de Entomología*, 32 (1): 67-72.

Sambrook J., Fritsch E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez, B. R., & Vallejo, L. F. (2010). El complejo de picudos (Coleoptera: Curculionidae) asociados a cultivariedades de plátano en Colombia. (1ª ed.). Manizales: Editorial Universidad de Caldas - Ciencias Agropecuarias. 64 p.

Saraste, M. (1990). Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 23 (4): 331-336.

Satz, L., & Kornblihtt, A. (1993). La reacción en cadena de la polimerasa. El método y sus aplicaciones. *Revista científica y tecnológica*. 4 (23).

Sepúlveda, P., & Rúbio, J. D. (2009). Dryophthorinae species (Coleoptera: Curculionidae) associated to plantain and banana crops (*Musa* spp.) in Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 14 (2): 49-72.

Smithson, P.C., McIntyre, B. D., Gold, C., Ssali, H., & Kashaija, I. N. (2001). Nitrogen and potassium fertilizer vs. nematode and weevil effects on yield and foliar nutrient status of banana in Uganda. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 59: 239-250.

Stauffer, C. (1997). A molecular method for differentiating sibling species within the genus *Ips*. Proceedings: integrating cultural tactics into the management of bark beetle and reforestation pests. USDA Forest Service General Technical Report. North East research station NE-236, 87-91.

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. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

Valerio, R., Lindorf, H., & García De García, E. (2002). Anatomía foliar comparada de ocho cultivares de banano con relación a la resistencia o susceptibilidad a la Sigatoka (amarilla y negra). *Agronomía Tropical*, 52 (4): 507-521.

Vallejo, L. F., Sánchez, R., & Salgado, M. (2007). Redescription of adult and description of immature stages of *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae): the black-borer weevil plantain in Colombia. *Boletín Científico Museo de Historia Natural Universidad de Caldas*, 11 (1): 361-375.

Vance, J. F., & Othmane, K. M. (1998). Methods of genotyping. In: Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A. eds. Approaches to gene mapping in complex human diseases. New York, N.Y: A John Wiley & Son, Inc., Publication. 213-228 p.

Vaurie, P. A. (1966). Revision of the Neotropical genus *Metamasius* (Coleoptera: Curculionidae, Rhynchophorinae). Species Groups I and II. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 131: 337.

Zhang, D. X., Szyrnura, J. M., & Hewitt, G. M. (1995). Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 40: 382-391.

Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (1996). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology*, 6: 143-150.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, M. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2): 203-214.

ANEXO A. Clave taxonómica para las especies de Dryophthorinae asociadas a plátano y banano (*Musa* spp.) en Colombia (Sepúlveda & Rubio 2009).

1. Longitud total menor a 5 mm. Tibias con diente pequeño en el ángulo externo (uncus) y uno más largo en el ángulo interno (mucron Figura 1A).....*Polytus mellerborgii*
- 1'. Longitud total mayor a 5 mm. Tibias con mucron, si presentan uncus en el ángulo externo está solo en las protibias.....2
2. Longitud total mayor a 25 mm. Clava antenal más ancha que larga (Figura 1B).....*Rhynchophorus palmarum*
- 2'. Longitud total menor a 25 mm. Clava antenal más larga que ancha o casi tan larga como ancha (Figura 1C).....3
3. Porción expuesta del escutelo redondeada; estrías elitrales con una sola línea de punturas bien definidas (Figura 1D); mesoepimeron en forma de diamante o pentágono (Figura 1E). Coloración completamente negra....*Cosmopolites sordidus*
- 3'. Porción expuesta del escutelo triangular (Figura 1F); mesoepimeron de forma variable; intervalos elitrales con o sin punturas. Coloración oscura con patrones naranja.....4
4. Clava antenal con el ápice redondeado (Figura 1C); punturas presentes solo en la mitad basal de los élitros (Figura 1E). Macho con ondulaciones (crestas) ventrales en el rostro (Figura 1G).....*Metamasius submaculatus*
- 4'. Clava antenal con el ápice truncado (Figura 1H). Punturas elitrales ausentes, si están presentes distribuidas uniformemente. Macho sin crestas basales en el rostro.....5
5. Ápice del segundo tarsómero tan ancho como el ápice del tercero (Figura 1I).....*Metamasius hebetatus*
- 5'. Ápice del segundo tarsómero casi la mitad de ancho que el ápice del tercero (Figura 1J).....*Metamasius hemipterus*

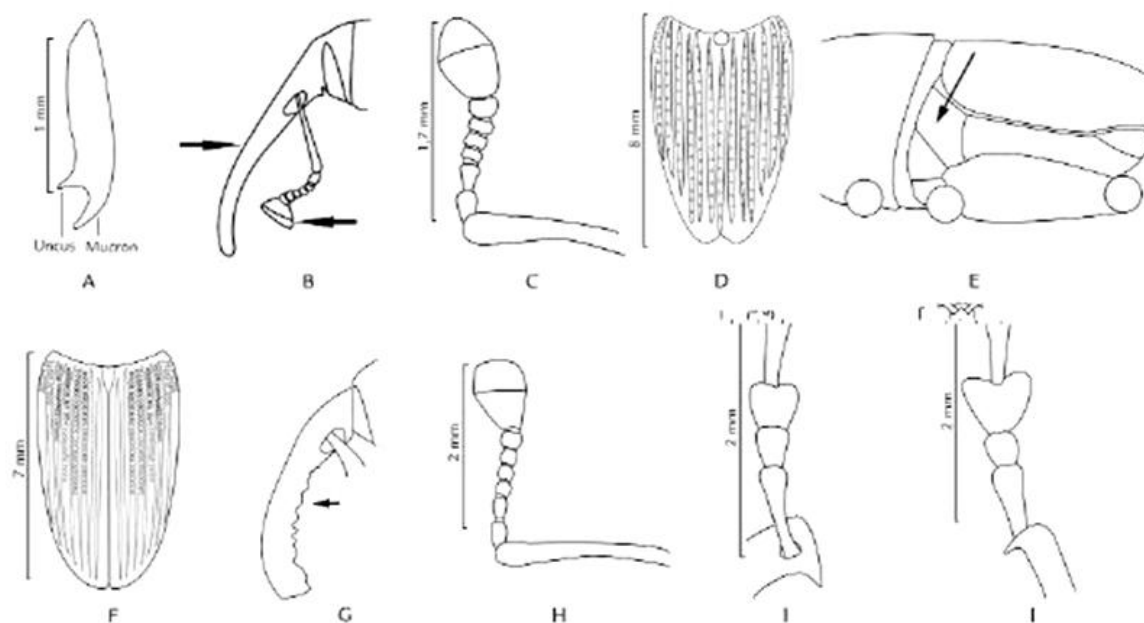


Figura 1. A. Protibia de *P. mellerborgii*. B. Rostro y antena de *R. palmarum*. C. Antena de *M. submaculatus*. D. Vista dorsal de élitros de *C. sordidus*. E. Mesoepimeron de *C. sordidus*. F. Élitros de *M. submaculatus*. G. Rostro de *M. submaculatus*. H. Antena de *M. hemipterus*. I. Metatarso de *M. hebetatus*. J. Metatarso de *M. hemipterus*.

ANEXO B. Protocolo de extracción de ADN descrito por Acevedo *et al.* (2007)

Paso	Descripción
1	Macerar muestras en 500 μ L de tampón (0.1 M Tris HCl, 0.1 M NaCl, 0.2 M sucrosa, 0.05 M EDTA, SDS 0.5%)
2	Adicionar 25 μ L de RNasa A (1 mg/mL), Mezclar en vortex e incubar a 65°C por 30 minutos
3	Adicionar 120 μ L de acetato de potasio 5 M
4	Centrifugar a 13 000 rpm por 5 min.
5	Recuperar sobrenadante
6	Purificar dos veces con un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (F:C:I 24:24:1 pH 8)
7	Centrifugar a 13 000 rpm por 5 min.
8	Recuperar sobrenadante
9	Adicionar un volumen de etanol (95%) frio y una décima de volumen de acetato de amonio
10	Encubar durante 12 horas a 4°C.
11	Centrifugar a 14 000 rpm por 10 min.
12	Secar el pellet durante 45 min. y resuspender en 80 μ L de TE 1X

ANEXO C. Protocolo de extracción de ADN adaptado de Sambrook *et al.* (1989).

Paso	Descripción
1	Macerar muestras en 400 µL de tampón (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 10 mM EDTA)
2	Adicionar 20 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y 250 µL de SDS (10%)
3	Incubar durante toda la noche a 37°C
4	Adicionar 80 µL de acetato de potasio 5 M y 750 µL de CTAB (1%)
5	Centrifugar a 13 200 rpm por 5 min.
6	Recuperar sobrenadante
7	Adicionar 300 µL de F:C:I (25:24:1 pH 8)
8	Centrifugar a 12 000 rpm por 5 min.
9	Recuperar sobrenadante
10	Adicionar 400 µL de F:C:I (25:24:1 pH 8)
11	Centrifugar a 12 000 rpm por 5 min.
12	Recuperar sobrenadante
13	Adicionar 400 µL de C:I (24:1)
14	Centrifugar a 10 000 rpm por 5 min.
15	Recuperar sobrenadante
16	Adicionar 200 µL de acetato de potasio 5 M y 400 µL de isopropanol, incubar a -2°C por dos horas
17	Centrifugar a 12 000 rpm por 10 min.
18	Lavar pellet con etanol (70%)
19	Centrifugar a 13 200 rpm por 3 min.
20	Secar y resuspender el pellet en 80 µL de TE 1X; Adicionar 1 µL RNasa e incubar a 37°C por 30 min.

ANEXO D. Protocolo basado en sales propuesto por Aljanabi & Martínez (1997).

Paso	Descripción
1	Macerar muestras en 400 µL de tampón (10 mM Tris HCl, 0.4 M NaCl, 2 mM EDTA)
2	Adicionar 40 µL de SDS 20%
3	Adicionar 8 µl de proteinasa K (20 mg/ml) e incubar a 65°C por lo menos una hora.
4	Adicionar 300 µl de NaCl 6 M
5	Centrifugar a 10 000 g por 30 min.
6	Recuperar sobrenadante
7	Adicionar un volumen igual de isopropanol e incubar a -20°C por una hora
8	Centrifugar a 10 000 g por 20 min.
9	Lavar pellet con etanol (70%)
10	Secar y resuspender el pellet en 80 µL de TE 1X