

UNIVERSIDAD DEL VALLE



**EFFECTO DEL DISTANCIAMIENTO GEOGRÁFICO Y VARIACIÓN DE
HOSPEDERO EN *Prodiplosis longifila* (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE), Y
ANÁLISIS POBLACIONAL DE *Prodiplosis floricola* (DIPTERA:
CECIDOMYIIDAE)**

**Diana N. Duque-Gamboa *B.Sc.*
Estudiante de Maestría en Ciencias-Biología**

**Nelson Toro Perea *PhD.*
Director de Trabajo de Investigación**

**Maestría en Ciencias-Biología
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Santiago de Cali 2016**

Dedicada a mi familia, Diego, amigos, y a mi 😊

TABLA DE CONTENIDO

EFFECTO DEL DISTANCIAMIENTO GEOGRÁFICO Y VARIACIÓN DE HOSPEDERO EN <i>Prodiplosis longifila</i> (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE), Y ANÁLISIS POBLACIONAL DE <i>Prodiplosis floricola</i> (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE)	1
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1	DETERMINACIÓN
DE DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL POR DISTANCIAMIENTO GEOGRÁFICO Y/O ESPECIALIZACIÓN EN HOSPEDERO MEDIANTE LA APROXIMACIÓN FILOGENÉTICA Y DE GENÉTICA DE POBLACIONES EN <i>Prodiplosis longifila</i> (GAGNÉ) (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE)	6
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	8
Generalidades de Cecidomyiidae	8
Género <i>Prodiplosis</i> (Felt, 1908)	9
<i>Prodiplosis longifila</i> Gagné, 1986	9
Origen y distribución	10
Biología y morfología	10
Hospederos y Daño	11
El gen <i>Citocromo oxidasa I</i> como herramienta molecular	13
Código de barras del ADN y aplicación en estudios entomológicos	14
Regiones espaciadoras transcritas internas del ADN ribosomal (ADNr) en estudios entomológicos	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO	18
Objetivos específicos	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Muestreo de insectos	19
Obtención de ADN genómico y secuencias de ADN	20
Amplificación del gen COI	20
Amplificación de región ITS2	21
Secuenciación, edición y alineamiento de fragmentos del gen COI y de ITS2	22

Análisis de datos	22
RESULTADOS	26
Código de barras del ADN, como herramienta complementaria a la clasificación taxonómica morfológica de <i>P. longifila</i> y caracterización haplotípica utilizando COI e ITS2	26
Análisis filogenéticos.....	32
Comparación a nivel genético entre ejemplares norteamericanos y suramericanos.	36
Diferenciación genética entre ejemplares provenientes de diferentes cultivos en Suramérica	37
Diferenciación genética entre poblaciones provenientes de diferentes cultivos	38
DISCUSIÓN.....	40
Inferencia filogenética en <i>P. longifila</i>	40
Diferenciación genética por distanciamiento geográfico en poblaciones de <i>P. longifila</i>	43
Diferenciación por especialización en un hospedero	45
CONCLUSIONES	49
CAPÍTULO 2	PRIMER
REPORTE DE <i>Prodiplosis floricola</i> (FELT) (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE), EN COLOMBIA Y ASPECTOS GENERALES DE SU DINÁMICA POBLACIONAL	51
INTRODUCCIÓN	51
ANTECEDENTES.....	52
<i>Prodiplosis floricola</i> Felt, 1907	52
La genética de poblaciones y los insectos plaga.....	53
Uso de marcadores moleculares en el estudio de la dinámica de colonización de especies plaga.....	53
HIPÓTESIS.....	55
OBJETIVO	55
Objetivos específicos	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
Obtención de insectos.....	56
Obtención de secuencias de las regiones COI e ITS2	56
Análisis de datos	56
RESULTADOS	58
Diversidad genética en las poblaciones colombianas de <i>P. floricola</i>	58
Estructura genética y flujo genético de las poblaciones de <i>P. floricola</i>	59

Inferencia filogenética por el método de Máxima Verosimilitud y Red de Haplotipos	61
DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIONES	68
DISCUSIÓN GENERAL.....	69
CONCLUSIONES GENERALES.....	71
AGRADECIMIENTOS:	71
LITERATURA CITADA:	72

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1-1. Discriminación haplotípica de los ejemplares inicialmente determinados morfológicamente como <i>P. longifila</i>	30
Tabla 1-2. Caracterización de las poblaciones de <i>P. longifila</i> , empleando COI. (N) número de individuos, (NH) número de haplotipos, (DH) diversidad haplotípica, (π) diversidad nucleotídica.	31
Tabla 1-3. Distancias genéticas dentro de los haplogrupos inferidos por la red de haplotipos, estimadas con el modelo K2P.....	35
Tabla 1-4. Distancias genéticas derivadas del modelo K2P entre haplogrupos de ejemplares separados geográficamente.	36
Tabla 1-5. Estimación de distancias genéticas bajo el modelo de K2P, entre haplogrupos suramericanos asociados a diferentes hospederos.	38
Tabla 1-6. Análisis de varianza molecular anidado (AMOVA), 1000 permutaciones.	38
Tabla 1-7. En el área sobre la diagonal se indican el número de migrantes (N_M), entre poblaciones analizadas bajo el AMOVA. Los valores de F_{ST} entre las poblaciones analizadas se indican en el área bajo la diagonal. En rojo se indican los valores de F_{ST} estadísticamente significativos (Valor-p < 0.05).	40
Tabla 2-1. Caracterización de las poblaciones de <i>P. floricola</i> , empleando COI. (N) número de individuos, (NH) número de haplotipos, (DH) diversidad haplotípica, (π) diversidad nucleotídica.	59
Tabla 2-2. Análisis de varianza molecular (AMOVA), 1000 permutaciones.....	60
Tabla 2-3. Inferencia de estructura poblacional para <i>P. floricola</i> en Colombia. En el área sobre la diagonal se indican el número de migrantes (N_M) entre poblaciones. Los valores de F_{ST} entre las poblaciones analizadas se indican en el área bajo la diagonal. En rojo se indican los valores de F_{ST} estadísticamente significativos (Valor-p < 0.05).	60
Tabla 2-4. Distancias genéticas estimadas bajo el modelo K2P dentro de los haplogrupos inferidos por la red de haplotipos.	64
Tabla 2-5. Distancias genéticas entre haplogrupos, estimadas bajo el modelo K2P.	64

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1-1. Regiones geopolíticas muestreadas para la obtención de ejemplares de <i>P. longifila</i>	22
Figura 1-2. Análisis de agrupamiento por medio de método de NJ (K2P) Bootstrap 1000, de haplotipos totales para COI de ejemplares inicialmente identificados a nivel morfológico como <i>P. longifila</i>	29
Figura 1-3. Análisis de agrupamiento de las secuencias ITS2 obtenidas en ejemplares inicialmente identificados morfológicamente como <i>P. longifila</i> , empleando el método de NJ(K2P), bootstrap 1000.	29
Figura 1-4 Distribución de haplotipos de <i>P. longifila</i> , en Colombia y Ecuador y Estados Unidos. A. Distribución haplotípica de COI. B. Distribución de haplotipos de ITS2.	32
Figura 1-5. Árbol filogenético inferido por MV para 368 especímenes de <i>P. longifila</i> , usando el marcador COI, modelo HKY+G. 1000 bootstrap. Se han agrupado los clados recuperados por haplotipos.	34
Figura1-6. Árbol filogenético estimado con el método de MV para 108 secuencias de ITS2 de <i>P. longifila</i> , bajo el modelo HKY. 1000 bootstrap. Los clados recuperados se agruparon por haplotipos.	34
Figura 1-7. Red de haplotipos inferida por el método de median-joining, para 16 haplotipos de <i>P. longifila</i> . Los haplotipos encontrados en hospedero Tomate se representan por medio de círculos, y los cuadrados representan haplotipos asociados a hospedero limón tahití y limón pajarito, el tamaño de área representa la proporción de individuos que contiene el haplotipo. Los colores representan las poblaciones de <i>P. longifila</i>	35
Figura 1-8. Composición haplotípica de <i>P. longifila</i> en diferentes hospederos.	37
Figura 1-9. Análisis de agrupamiento PCoA, basándose en F_{ST} poblacionales. Se denotan con color rojo aquellas poblaciones de especímenes asociadas a hospedero tomate y pimentón, mientras que el verde indica que la población está asociada a limón tahití y limón pajarito.	39
Figura 2-1. Distribución en Colombia de haplotipos de <i>P. floricola</i> . a. Haplotipos de COI. b. Haplotipos de ITS2.	59
Figura 2-2. Árbol filogenético inferido por MV para especímenes de <i>P. floricola</i> , usando el marcador COI, modelo HKY+I. 1000 bootstrap.	62
Figura 2-3. Árbol filogenético estimado con el método de MV para secuencias de ITS2 de <i>P. floricola</i> , bajo el modelo HKY. 1000 bootstrap.	63
Figura 2-4. Red de haplotipos inferida por el método de median-joining, para 10 haplotipos de COI de <i>P. floricola</i> . Los haplotipos se representan por medio de círculos, los colores representan las poblaciones bajo estudio. El área de cada circunferencia es proporcional a la frecuencia de individuos por haplotipo.	64

**EFFECTO DEL DISTANCIAMIENTO GEOGRÁFICO Y VARIACIÓN DE
HOSPEDERO EN *Prodiplosis longifila* (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE), Y
ANÁLISIS POBLACIONAL DE *Prodiplosis floricola* (DIPTERA:
CECIDOMYIIDAE)**

RESUMEN

Prodiplosis longifila (Gagné) (Diptera: Cecidomyiidae), se ha reportado como plaga de un amplio rango de hospederos en América, incluyendo cítricos, solanáceas y asparagáceas. Las poblaciones norteamericanas y suramericanas de esta especie presentan rasgos comportamentales diferentes en cuanto a hábitos de ovoposición y alimentación de las larvas sobre estructuras específicas, dependiendo del hospedero. Sin embargo, hay carencia de información de historia natural de este insecto y no se cuenta con estudios biogeográficos, razón por la cual no se tiene certidumbre de si las poblaciones suramericanas son en realidad *P. longifila*. El objetivo central de esta investigación fue realizar un estudio filogenético y de genética de poblaciones en la especie, para definir si las poblaciones norteamericanas y suramericanas corresponden a la misma especie, o si se ha presentado un proceso de diferenciación por distanciamiento geográfico; como también determinar si en Suramérica la especie ha presentado diferenciación por especialización sobre cultivos hospederos. Los análisis filogenéticos y poblacionales basados en el código de barras del ADN y una región de ADNr permitieron evidenciar clados divergentes atribuibles a distanciamiento geográfico y especialización por hospedero. Fue posible corroborar que los especímenes norteamericanos y suramericanos de *P. longifila*, no son idénticos genéticamente debido a un proceso de diferenciación por distanciamiento geográfico, las distancias genéticas encontradas indican la formación de especies crípticas entre dichos grupos. La composición haplotípica de *P. longifila*

proveniente de los cultivos analizados, tomate y pimentón (solanáceas); y limón tahití y limón pajarito (cítricos), evidencia diferenciación genética entre los haplogrupos asociados a hospedero, lo que indica que se ha presentado la formación de especies crípticas asociadas a hospederos. Adicionalmente, los análisis moleculares basados en COI, determinaron la presencia de una especie congénica en simpatría con *P. longifila*, cuyo nombre es *Prodiplosis floricola* (Felt), la cual no fue detectada inicialmente por la taxonomía morfológica. Esta especie se encontró restringida a limón tahití y limón pajarito, lo que constituye su primer reporte para Colombia; y se caracterizó molecularmente las poblaciones encontradas.

Palabras clave: ADNmt, COI, ITS2, asociación a hospedero, diferenciación poblacional, *P. longifila*, *P. floricola*

INTRODUCCIÓN

Prodiplosis longifila Gagné, 1986 (Diptera: Cecidomyiidae), es una especie polífaga cuyo rango de plantas hospederas abarca miembros de las familias Amarantaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lauraceae, Liliaceae, Malvaceae, Quenopodiaceae, Rosaceae, Rutaceae, Solanaceae, y Umbeliferae (Valarezo, et al., 2003).

En América *P. longifila* es causante de pérdidas considerables en cultivos relevantes como tomate, pimentón, ají, papa, espárragos, y cítricos (Peña & Mead, 1998a; Valarezo, et al., 2003; Jaramillo, et al., 2007). Hay evidencia de que las poblaciones norteamericanas y suramericanas de *P. longifila* presentan diferencias en su biología y hábitos de ovoposición. En Estados Unidos esta especie-plaga ataca cítricos y ovoposita en botones florales, las larvas se alimentan de la epidermis del ovario y demás estructuras reproductoras de las flores (Peña, et al., 1989; Peña & Mead, 1998b). En países suramericanos como Ecuador y Perú, se reporta que este insecto es plaga de diferentes especies de solanáceas y asparagáceas, ovoposita en las nervaduras de las hojas, frutos tiernos, botones foliares y florales; los estadios larvales de individuos en estas poblaciones se alimentan de las estructuras anteriormente descritas (Valarezo, et al., 2003).

En Colombia, *P. longifila*, se reporta por primera vez en 1986 en el departamento del Valle del Cauca sobre cultivos de tomate (Peña, et al., 1989; Valarezo, et al., 2003). Henández, (2014), encontró a *P. longifila* generando daño por la alimentación de las larvas sobre brotes foliares de tomate; botones florales de tomate, limón tahití y pimentón; y frutos pequeños (tomate y pimentón). Sin embargo, dada la dificultad que presenta este insecto para la cría en condiciones de laboratorio, manipulación y discriminación por morfología; existe un vacío en la

información de su historia natural y poca certidumbre sobre su identidad y distribución en Suramérica (Peña, et al., 1989; Haddad & Pozo, 1994).

Debido a la carencia de estudios comparativos entre las poblaciones norteamericanas y suramericanas, a nivel morfológico, biogeográfico, y comportamental, entre otros, no es claro si en Suramérica, se presenta la especie descrita y reportada en Estados Unidos, o ha ocurrido un proceso de diferenciación por alopatría. El amplio rango de hospederos reportados para la especie, las diferencias en el daño ocasionado en dichos hospederos, y los vacíos de información por falta de investigaciones entre poblaciones simpátricas establecidas en diferentes hospederos, plantean la inquietud de si esta especie es en realidad un complejo de especies crípticas especializadas en un cultivo hospedero particular, u otra subdivisión taxonómica inferior a especie.

La identificación de especies, así como de otras divisiones taxonómicas, se basa tradicionalmente en caracteres morfológicos diagnósticos (Jinbo, et al., 2011), en el caso de presuntas especies, que presentan poblaciones que difieren en características biológicas y comportamentales, pero carecen de variaciones morfológicas relevantes, se recurre al uso de herramientas moleculares, para discriminar estos taxones encriptados. Estas herramientas permiten establecer si efectivamente dichas poblaciones corresponden a una sola unidad taxonómica discreta o discernir entre divisiones taxonómicas diferentes a través del análisis molecular (Hebert, et al., 2003; Hebert, et al., 2004; Jinbo, et al., 2011).

En Insecta, el código de barras del ADN, correspondiente a una región de aproximadamente 700 pares de bases del gen *Citocromo oxidasa I* (COI), es una herramienta efectiva en la identificación de especies, en estudios de variabilidad geográfica de poblaciones, y en la distinción de hospederos específicos e insectos

asociados (Hebert, et al., 2003; Santos, et al., 2011; Mathur, et al., 2012). Por su parte, la región nuclear del espaciador transcrito interno dos (ITS2), ha sido reportada como un marcador molecular adecuado en la discriminación de complejos de especies crípticas en dípteros (Ruiz, et al., 2010), mientras que Jie et al., (2003) y Yao et al., (2010), han propuesto la región ITS1 e ITS2 de ADNr como región complementaria al COI en el diagnóstico de especies, debido a la disponibilidad de cebadores universales para amplificar estas regiones genómicas en animales, y los niveles de diferenciación intraespecíficas e interespecíficas que presentan.

La presente investigación pretende definir si las poblaciones norteamericanas y suramericanas de *P. longifila*, corresponden a la misma especie, o si se ha presentado un proceso de diferenciación por distanciamiento geográfico; y determinar si en Suramérica la especie ha presentado diferenciación por especialización sobre cultivos hospederos. Lo anterior realizando un análisis filogenético y de genética de poblaciones de la especie, basándose en el uso de la herramienta molecular de código de barras del ADN (COI) y la región nuclear ITS2.

CAPÍTULO 1
DETERMINACIÓN DE DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL POR
DISTANCIAMIENTO GEOGRÁFICO Y/O ESPECIALIZACIÓN EN HOSPEDERO
MEDIANTE LA APROXIMACIÓN FILOGENÉTICA Y DE GENÉTICA DE
POBLACIONES EN *Prodiplosis longifila* (GAGNÉ) (DIPTERA:
CECIDOMYIIDAE)

INTRODUCCIÓN

En organismos con reproducción sexual, la especie se delimita por aislamiento reproductivo, aunque generalmente se tratan de definir y describir por caracteres morfológicos (Walker, 1964; Jinbo, et al., 2011). El concepto de especies crípticas se refiere a especies biológicas que no pueden ser reconocidas fácilmente, basándose en criterios morfológicos, siendo clasificadas bajo un mismo nombre de manera errónea (Walker, 1964; Bickford, et al., 2007). La correcta identificación de especies tiene un impacto en diversos campos de investigación, en el caso de la entomología aplicada, es fundamental para diseñar e implementar programas de manejo integrado de plagas y control biológico (Bickford, et al., 2007).

P. longifila es un cecidómido neotropical polífago distribuido en Norteamérica (Estados Unidos); y en Suramérica (Colombia, Ecuador y Perú) (Valarezo, et al., 2003). Se desconoce su origen geográfico, y dada su talla pequeña, su fragilidad y la complejidad que involucra la identificación de la especie por morfología, la certidumbre sobre la especie reportada en Suramérica es baja, y pocos trabajos de investigación involucran estudios comparativos a nivel poblacional que permitan esclarecer si corresponden a la misma especie.

Empleando herramientas moleculares, se ha logrado discernir complejos de especies crípticas en taxa con un amplio intervalo de distribución y una baja capacidad de dispersión (Bickford, et al., 2007), dichas especies crípticas no pueden ser diferenciadas por taxonomía basada en morfología. Por otra parte, el caso de especies ampliamente distribuidas con baja capacidad de dispersión puede ser también explicado, en ciertos casos, por transporte antropogénico (Pérez-Portela, et al., 2013), que puede dar pie a la diferenciación poblacional por distanciamiento geográfico, y especiación alopátrica por efecto fundador (Bush, 1975). El uso de marcadores moleculares permitiría inferir los procesos que han llevado a la distribución actual de *P. longifila*.

Se han reportado alrededor de 34 especies hospederas de *P. longifila*, en 15 familias diferentes de plantas (Valarezo, et al., 2003). Este amplio rango de plantas hospederas, puede sugerir que en este grupo hay una diversidad críptica no reconocida, quizás por carencia de diferenciación morfológica, o que sean producto de un proceso reciente de diversificación. De acuerdo con diferentes autores (Bush, 1969; Berlocher & Feder, 2002), la relación especializada entre insectos y plantas hospederas, es considerada un motor de la diversificación evolutiva en fitófagos. Se ha sugerido que la adaptación al microhábitat, el emparejamiento selectivo en la planta hospedera, y la colonización de un nuevo hospedero, pueden suscitar el aislamiento reproductivo asociado a hospedero (Bush, 1975; Turelli, et al., 2001; Thomas, et al., 2003). La especiación que es promovida por la adaptación a un hospedero puede concluir en poblaciones categorizadas como especies crípticas (Via, 1999; Stireman, et al., 2005; Bickford, et al., 2007; Dorchin, et al., 2009). Usualmente para respaldar la formación de especies crípticas se emplea evidencia de tipo genético, tal como el análisis de la región conocida como código de barras del ADN. En estos casos estas potenciales especies crípticas son morfológicamente indistinguibles, pero

genéticamente diferenciadas (Hebert, et al., 2004; Dorchin, et al., 2009; Jinbo, et al., 2011).

Como objetivo principal, la investigación pretende determinar si las poblaciones de *P. longifila*, norteamericanas y suramericanas son la misma especie, o si se ha presentado un proceso de diferenciación poblacional por distanciamiento geográfico que ha derivado en especiación; y comprobar si poblaciones de *P. longifila* provenientes de distintas plantas hospederas presentan diferenciación a nivel genético que se deba a un proceso de adaptación a un hospedero.

ANTECEDENTES

Generalidades sobre Cecidomyiidae

La familia Cecidomyiidae, pertenece al suborden Nematocera; son conocidos como mosquitas de las agallas, se considera una de las familias más grande dentro de Diptera (Gagné & Solinas, 1996). Presentan por lo menos 5 000 especies ampliamente distribuidas a nivel mundial, es poco estudiada en el neotrópico, donde solo se reportan cerca de 453 especies. Es considerado un grupo de difícil investigación, dada su tamaño pequeño y fragilidad, y carencia de información taxonómica actual, pese a que los cecidómidos contienen especies plaga, polinizadoras y agentes de control biológico (Gagné, 1986; Gagné, 1994; Alford, 2007).

Los miembros de esta familia son caracterizados como moscas delicadas de talla pequeña a muy pequeña (menos de 3 mm), de alas anchas pubescentes con venación reducida; las antenas son moniliformes y largas, la genitalia es visible.

Los adultos son de vida corta, y la mayor parte de la alimentación es realizada en estadios larvales. Las larvas se caracterizan por presentar un cuerpo corto de terminaciones reducidas, la cabeza es inconspicua con aparato bucal reducido para la ingesta de líquidos; poseen una espátula esternal que es característico en el género (Alford, 2007). De acuerdo con Gagné, (1994), esta familia ha tenido un proceso de diversificación desde el cretácico, junto con las angiospermas. En algunas especies de esta familia, los estadios larvales conservan el comportamiento plesiomórfico de alimentarse de hongos; otros linajes son predadores de ácaros y artrópodos pequeños; mientras que la mayoría de las especies se alimentan de tejidos de plantas vasculares.

Género *Prodiplosis* (Felt, 1908)

Presenta principalmente su distribución en América y Europa (Gagné, 1986; Gagné, 1994). Son considerados insectos-plaga de un amplio rango de plantas hospederas en las familias Platanaceae, Rutaceae, Solanaceae, Malvaceae, Polygonaceae, entre otras; atacando principalmente botones florales y foliares (Gagné, 1994; Valarezo, et al., 2003). El género presenta como carácter distintivo gonopodos robustos, articulados dorsoventralmente. El aedeago es variable, los flagelomeros en machos son variables desde binodales a cilíndricos. En las hembras, el ovopositor es alargado, de 4 a 11 veces la longitud del séptimo tergito, retráctil; los cerci son pequeños aplanados dorsoventralmente, estriados y con setas sensoriales (Gagné, 1986).

Prodiplosis longifila Gagné, 1986

Clase: Insecta

Subclase: Pterigota

Infraclase: Neoptera

Orden: Diptera

Suborden: Nematocera

Familia: Cecidomyiidae

Subfamilia: Cecidomyiinae

Tribu: Cecidomyiini

Género: *Prodiplosis*

Especie: *Prodiplosis longifila* Gagné, 1986

Nombre común: mosca de las agallas (EUA), tostón (Colombia), negrita, chamusca (Ecuador), caracha del tomate (Perú).

Origen y distribución

Esta especie fue encontrada por primera vez en Florida, en 1934 en algodón silvestre (*Gossypium* sp.), en 1984 se recolectó en árboles de lima (*Citrus aurantifolia*); posteriormente en 1986, Raymond Gagné en su revisión del género *Prodiplosis*, describe estos ejemplares, como pertenecientes a una nueva especie, llamada *Prodiplosis longifila*. Desde 1986 ha sido registrada en Colombia, Perú, Ecuador (Peña, et al., 1989; Peña & Mead, 1998a). Hernández, (2014), reportó a *P. longifila* en once departamentos de Colombia; Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca, Huila, Nariño, Quindío, Risaralda, Santander, y Valle del Cauca.

Biología y morfología

De acuerdo con la caracterización morfológica de *P. longifila*, realizada por Peña et al., (1989), sobre poblaciones del insecto en el estado de la Florida en limón tahití, bajo condiciones de laboratorio de 27°C y 84% HR; se presenta la siguiente descripción de sus diferentes estadios de desarrollo: Los huevos son

transparentes, ovoides y elongados, miden 0.27 mm de diámetro polar y 0.10 mm de diámetro ecuatorial. Las posturas, de hasta 59 huevos, se realizan sobre órganos reproductores de las flores, la eclosión se da en menos de dos días.

Presenta tres estadios larvales, que cuentan con características morfológicas comunes, como el tamaño reducido de la cabeza con antena cónica unisegmentada, un segmento de cuello, tres segmentos torácicos, nueve segmentos abdominales, cada uno con papilas características de la tribu Cecidomyiini. El primer instar presenta un par de espiráculos en el octavo segmento abdominal, su tamaño es de 0.40-0.92 mm. El segundo instar mide entre 0.76-1.85 mm, presenta un par de espiráculos en el primer segmento torácico, y un par de espiráculos en cada segmento abdominal, tienen un par de papilas corniformes menos desarrolladas en el segmento terminal en comparación con las demás papilas abdominales. El tercer instar presenta una espátula en forma de diente en el primer segmento torácico, la longitud de la larva es de 1.15-1.90 mm. El estadio larval dura aproximadamente 9 días. La larva madura cae al suelo, se entierra aproximadamente 1.5 cm y genera un capullo blanco que puede incorporar granos de arena. La longitud de la pupa es de 0.85-1.00 mm, es amarillenta y se torna negra, después de aproximadamente 4 días emergen los adultos. El adulto mide 1.5 mm, las alas de los machos miden de longitud 1.42 mm, en hembras es de 1.53 mm. La longevidad máxima de este estadio es de 16 días.

Hospederos y Daño

P. longifila se ha reportado América en Limón tahití en Estados Unidos (Peña, et al., 1989), en Perú se ha reportado como plaga de tomate, espárragos y papa; en Ecuador, *P. longifila* se asocia a cultivos de tomate y pimentón; y en Colombia, se

encuentra asociada principalmente a tomate de acuerdo con Valarezo et al., (2003). Hernández, (2014), reporta en Colombia, a *P. longifila* asociada a cultivos de limón tahití, pimentón y tomate, sobre los cuales caracteriza el daño ocasionado por la alimentación de las larvas sobre diferentes estructuras vegetales.

Este insecto en estadio larval, genera lesiones derivadas de su alimentación en las plantas hospederas, lo que en asocio con agentes infecciosos causa el detrimento del material vegetal infestado por larvas de esta especie (Dent, 2000). En el caso de tomate, la alimentación de las larvas en los brotes tiernos de hojas, frutos tiernos y estructuras florales, causa la deformación de estas estructuras y la necrosis de los tejidos, la cicatrización de los frutos y pérdida de brotes florales (Valarezo, et al., 2003; Henández, 2014). En limón tahití, el daño causado por la alimentación de las larvas de instares II y III, sobre los órganos reproductores de las flores, genera la caída prematura de las mismas, impidiendo la formación del fruto (Peña, et al., 1989; Henández, 2014). En pimentón las larvas se alimentan de frutos, generando cicatrices y posibilitando la infección por hongos (Chung, 2000). En papa y espárragos, la alimentación de las larvas destruye los brotes vegetativos terminales, causando deformidad de las plantas y pobre desarrollo (Valarezo, et al., 2003).

Pese a ser un insecto de importancia económica en Latinoamérica, las investigaciones sobre *P. longifila* han sido incipientes, y se han centrado en la caracterización de la duración y descripción del ciclo de desarrollo de los diferentes instares de este insecto en tomate, espárragos y papa; y la caracterización del daño que se genera en las plantas asociado a la alimentación de las larvas (Haddad & Pozo, 1994; Ventura & Ayquipa, 1999; Valarezo, et al., 2003; Henández, 2014). La dificultad en la identificación morfológica de esta especie, dado su tamaño tan pequeño y su fragilidad, contribuye en gran medida a

la carencia de información sobre aspectos biológicos y de historia natural de *P. longifila*, por lo que es necesario de herramientas que conduzcan a definir el estatus taxonómico de la especie, y faciliten la caracterización de las poblaciones tanto en contextos regionales como globales.

El gen *Citocromo oxidasa I* como herramienta molecular

Los marcadores moleculares permiten estudiar el material genético de manera directa consiguiendo rasgos moleculares universales, 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; Hebert, et al., 2004).

El ADN mitocondrial (ADNmt) comúnmente utilizado en estudios filogenéticos y estudios poblacionales en metazoos presenta características como fácil extracción, el alto número de copias, falta de recombinación, conservación de la secuencia y estructura en metazoa, y diferentes rangos de tasa de mutación en diferentes regiones de la molécula; es considerado una buena herramienta en estudios evolutivos. La identificación de cebadores para PCR conservados ha promovido su uso en estudios evolutivos, poblacionales y filogenéticos (Kocher, et al., 1989; Lunt, et al., 1996; Hebert & Ryan, 2005).

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). 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 (Lunt, et al., 1996). Adicionalmente, la COI es la subunidad más grande de las tres sub-unidades de la enzima *Citocromo oxidasa* (Clary & Wolstenholme, 1985), y es codificada por uno de los genes más grandes en el genoma mitocondrial de metazoa. Esto permite amplificar y secuenciar muchos caracteres dentro del mismo complejo funcional. Por lo anterior la COI es considerado como un buen marcador en la caracterización molecular de especies, y empleado en estudios interespecíficos, intraespecíficos y de poblaciones.

Código de barras del ADN y aplicación en estudios entomológicos

Hebert, et al., (2003), propusieron como técnica de diagnóstico, el uso del set de los cebadores universales LCO1490/HCO2198 desarrollados por Folmer, et al., (1994), para la amplificación de una región de aproximadamente 700 p.b del gen COI y así inferir distancias genéticas entre diferentes especies de metazoos a través de la comparación de pares de secuencias de nucleótidos. Esta técnica, denominada código de barras del ADN, permite identificar de manera precisa y rápida un amplio rango de especímenes. La técnica descrita, empleando el gen COI, no es apropiada para el estudio de plantas y hongos, grupos en los que se ha recurrido a los genes *ribulosa bífosfato carboxilasa* (*rbcL*) y *maturasa K* (*matK*) como regiones de código de barras (Jinbo, et al., 2011).

En el caso de Insecta, Brown, et al., (2003), emplearon el método descrito por Hebert, et al., (2003), para describir una nueva especie en *Xenothictis* (Lepidoptera: Tortricidae), a partir de material de museo (holotipo), siendo este el primer estudio en el que se describe una nueva especie por medio del código de barras del ADN. Hebert, et al., (2004), empleando la técnica de código de barras

del ADN, junto con observaciones morfológicas y de historia natural, en *Astraptes fulgerator*, concluyen que esta presunta especie es un complejo de 10 especies simpátricas, especializadas en distintas plantas hospederas; este estudio constituye la primera investigación en resolver un complejo de especies morfológicamente indistinguibles, en insectos, aplicando la técnica del código de barras del ADN. Desde el 2003, esta técnica se ha popularizado, contribuyendo a la descripción de nuevas especies a partir de holotipos o paratipos, y en resolver complejos de especies crípticas en diferentes órdenes de Insecta (Jinbo, et al., 2011; Li, et al., 2011; Malausa, et al., 2011; Santos, et al., 2011; Mathur, et al., 2012; Hwang, et al., 2013).

La región del código de barras del ADN también se ha empleado para contribuir al estudio de especiación alopátrica en insectos. Mutanen, et al., (2012), emplearon el código de barras del ADN para determinar los patrones de diferenciación genética entre poblaciones geográficamente aisladas de lepidópteros de distribución ártica, en los Alpes, Fenoscandia y Norteamérica. El marcador molecular permitió discriminar clados aislados geográficamente, correspondientes a poblaciones alopátricas, que además presentaron en algunos casos una incipiente diferenciación en la genitalia de los machos; los resultados también permitieron sugerir al código de barras del ADN como una herramienta útil en la investigación de procesos de especiación, incluso cuando se carece de características morfológicas diferenciables, y de forma objetiva definir el estatus taxonómico de poblaciones alopátricas de una presunta especie.

En Diptera, se destaca la investigación realizada por Smith, et al., (2006), sobre especies polífagas de *Belvosia* (Diptera: Tachinidae), en la cual, la técnica del código de barras del ADN contribuyó a la identificación de 17 morfoespecies asociadas a un hospedero específico, y se reveló además, que tres de las

especies parasitoides generalistas en este taxón, son conjuntos de especies crípticas.

Dentro de Cecidomyiidae, el estudio realizado por Mathur, et al., (2012), en poblaciones simpátricas de *Dasineura oxycoccana*, empleando la región del código de barras del ADN, revelaron una alta diferenciación genética entre especímenes provenientes de arándano (*Vaccinium corymbosum*) y arándano rojo (*V. macrocarpon*), indicando un proceso de especialización por parte del insecto a la planta hospedera e indicios de especiación críptica. Empleando esta misma región de ADNmt, se ha logrado corroborar que un fenómeno similar ha ocurrido en *Asphondylia borrichia*, otra especie de cecidómido (Stokes, et al., 2012). Estos autores encuentran divergencia genética entre poblaciones en simpatría de *A. borrichia*, asociada a los hospederos *Borrichia frutescens*, *Iva frutescens* e *I. imbricata*, además de una composición haplotípica diferente entre los ejemplares asociados a los distintos hospederos, sin embargo, pese a contar con estudios previos de preferencia de hospedero y aunque encuentran bajo flujo genético entre poblaciones de diferentes hospederos, proponen que en esta especie se ha presentado la formación de razas asociadas a hospederos y no concluyen que existe la presencia de especies crípticas. De acuerdo con Drès & Mallet, (2002), la categoría de razas asociadas a hospederos hace referencia a aquellos grupos de poblaciones simpátricas entre los cuales hay flujo genético pero existe un proceso de aislamiento reproductivo emergente, siendo un estado intermedio entre poblaciones con polimorfismos ancestrales y especies biológicas, cuya divergencia es atribuible al hospedero, y mencionan que es un fenómeno común en insectos fitófagos.

Cabe resaltar que en *P. longifila* no se han realizado investigaciones de esta magnitud aplicando herramientas moleculares, por lo que no se cuentan con estudios previos sobre esta especie en este aspecto. En 2014, Ortega, et al.,

(2014), realizan un estudio exploratorio con larvas de *Prodiptosis* sp. provenientes de diferentes localidades de Perú, en espárragos, ají y cítricos, analizando una región de COI obtienen que los ejemplares no se diferencian por localidad u hospedero de procedencia, sin embargo, en este estudio no hay certidumbre sobre la identidad de la especie pues analizaron larvas, y la determinación de especie por morfología se basa en las antenas y genitalia de los machos adultos.

Regiones espaciadoras transcritas internas del ADN ribosomal (ADNr) en estudios entomológicos

El DNAr constituye una región de estructura conservada entre eucariotas, incluyendo los miembros de la clase insecta, en los cuales esta región genómica ha sido estudiada en al menos cuatro órdenes incluyendo Diptera (Collins & Paskewitz, 1996; Hackett, et al., 2000; Ruiz, et al., 2010). Presenta organización en tándem de unidades de transcripción, cada unidad genera un transcrito que contiene las subunidades ribosomales 18S, 5.8S y 28S, espaciadores externos transcritos ETS, y los espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2 (Musters, et al., 1990; Collins & Paskewitz, 1996).

Debido a la disponibilidad de cebadores conservados para los espaciadores internos ITS1 e ITS2, se han empleado en estudios filogenéticos para taxa cercanos, y por su tasa evolutiva rápida han sido empleados además en estudios poblacionales y filogeográficos a nivel intraespecífico en insectos (Ji, et al., 2003). Estas secuencias se han propuesto como caracteres que contribuyen a la identificación de especies, como región complementaria al código de barras del ADN en estudios de especies crípticas, principalmente para complejos de especies crípticas en dípteros de importancia médica y especies invasoras de

insectos (Marinucci, et al., 1999; Hackett, et al., 2000; Gallego & Galián, 2001; Ruiz, et al., 2010).

Las diferencias en la biología de *P. longifila* y la diversidad de hospederos que se han identificado para la especie, podrían indicar que las poblaciones presentes en los diferentes países donde este insecto-plaga se ha reportado, no corresponden a una unidad taxonómica discreta. Por lo anterior es fundamental contribuir a la determinación del estatus taxonómico de *P. longifila*, siendo el código de barras del ADN y el espaciador interno transcrito ITS2, una herramienta que permitiría distinguir entre posibles especies crípticas u otro tipo de división taxonómica, asociados a hospederos específicos y diferentes regiones geográficas.

HIPÓTESIS

- El aislamiento por distancia geográfica ha promovido la diferenciación genética entre las poblaciones norteamericanas y suramericanas de *P. longifila*.
- La especialización sobre distintos hospederos ha promovido la diferenciación entre poblaciones simpátricas de *P. longifila* en Suramérica.

OBJETIVO

Determinar si las poblaciones de *P. longifila*, norteamericanas y suramericanas son la misma especie, y establecer si poblaciones de *P. longifila* provenientes de distintas plantas hospederas presentan diferenciación a nivel genético que sea atribuible a un proceso de adaptación a un hospedero.

Objetivos específicos

- Emplear análisis filogenéticos para evidenciar clados divergentes atribuibles a distanciamiento geográfico o especialización en un hospedero.
- Comparar genéticamente ejemplares norteamericanos y suramericanos de *P. longifila*, y evidenciar si es el caso, aislamiento por distancia geográfica.
- Determinar la diferenciación genética entre poblaciones de *P. longifila* asociados a diferentes hospederos en Suramérica.
- Evaluar el código de barras del ADN, como herramienta complementaria a la clasificación taxonómica morfológica en *P. longifila*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de insectos

El muestreo de insectos lo realizó el Grupo de Investigación Interacciones Tri-tróficas, de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Las plantas hospederas muestreadas fueron: tomate (*Solanum lycopersicum*), papa (*Solanum tuberosum*), pimentón (*Capsicum annum*), ají (*Capsicum frutescens*), espárragos (*Asparagus officianalis*) y cítricos, limón tahití (*Citrus x latifolia*) y limón pajarito (*Citrus aurantiifolia*). Para la obtención de insectos, se recolectó material vegetal con síntomas de infestación por larvas de *P. longifila*, en cada cultivo, tomando datos de georreferenciación por medio de GPS. Se muestrearon en Colombia

(COL) 11 departamentos, y dos provincias en Ecuador (ECU) (Figura 1-1). Además se obtuvieron especímenes adultos del estado de la Florida en Estados Unidos (EUA), proporcionados por el Dr. Jorge E. Peña del Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), University of Florida, Homestead, Florida USA.

El material colectado se dispuso de forma individual en una cámara ambiental bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (23°C, 80% HR), hasta la emergencia de los adultos. Los adultos se almacenaron en alcohol al 95% a -20°C. La determinación morfológica de la especie se realizó de acuerdo con Gagné, (1986), por observación al microscopio de las antenas y genitalia de machos. La preparación de placas permanentes para la observación morfológica se realizó de acuerdo con Gagné & Solinas, (1996), por parte del G.I. Interacciones Tri-tróficas.

Obtención de ADN genómico y secuencias de ADN

Los trabajos moleculares se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular, sección Genética, de la Universidad del Valle. Se emplearon el tórax y las patas de los ejemplares de *P. longifila* para la extracción de ADN genómico, empleando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se cuantificó el ADN obtenido por cada individuo, empleando un espectrofotómetro (NanoDrop), posteriormente se realizaron diluciones del ADN a 5 ng/μL.

Amplificación del gen COI

Se empleó la pareja de cebadores LCO1490 (5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'), HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'), para la amplificación por PCR de una región del gen COI de 710 pares de bases (pb). Este fragmento cubre las partes más variables del COI, siendo adecuado para estudios intraespecíficos (Folmer, et al., 1994). El coctel de amplificación se realizó de acuerdo con Ruiz, et al., (2010), donde cada reacción de 50µL incluye aproximadamente 1ng/µL de ADN genómico, 1X tampón comercial (NH₄)₂SO₄, 0.5mM de cada dNTP, 2mM de MgCl, 2U de Taq ADN polimerasa, 0.3µM de cada cebador. El perfil térmico de amplificación para los cebadores LCO1490/HCO2198 consistió en desnaturalización inicial a 95°C por un minuto, 35 ciclos a 95°C por un minuto; un minuto de alineamiento a 40-50°C, un minuto y medio de extensión a 72°C, y extensión final a 72°C por siete minutos (Folmer, et al., 1994).

Amplificación de región ITS2

Para amplificar una región de 432 pb. en el ITS2, se emplearon los cebadores 5.8F (5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3') y 28R (5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3') (Collins & Paskewitz, 1996). La reacción de amplificación se llevó a cabo de acuerdo con Walton, et al., (2007), donde cada reacción de 50µL incluye 1ng/µL de ADN genómico, 1X tampón comercial (NH₄)₂SO₄, 0.2mM de cada dNTP, 2.5mM de MgCl, 1U de Taq ADN polimerasa, 0.2µM de cada cebador. El perfil térmico correspondió a desnaturalización inicial a 94°C por cinco minutos, 35 ciclos a 94°C por un minuto; 30 segundos de alineamiento a 56°C, 39 segundos de extensión a 72°C, y extensión final a 72°C por cinco minutos.

Secuenciación, edición y alineamiento de fragmentos del gen COI y de ITS2

La secuenciación bidireccional de los productos amplificados para COI e ITS2, se realizó por un proveedor especializado. Las secuencias obtenidas de COI e ITS2, se editaron con BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999), los alineamientos se realizaron con Mega 6 (Tamura, et al., 2013), y el algoritmo Muscle (Robert, 2004).

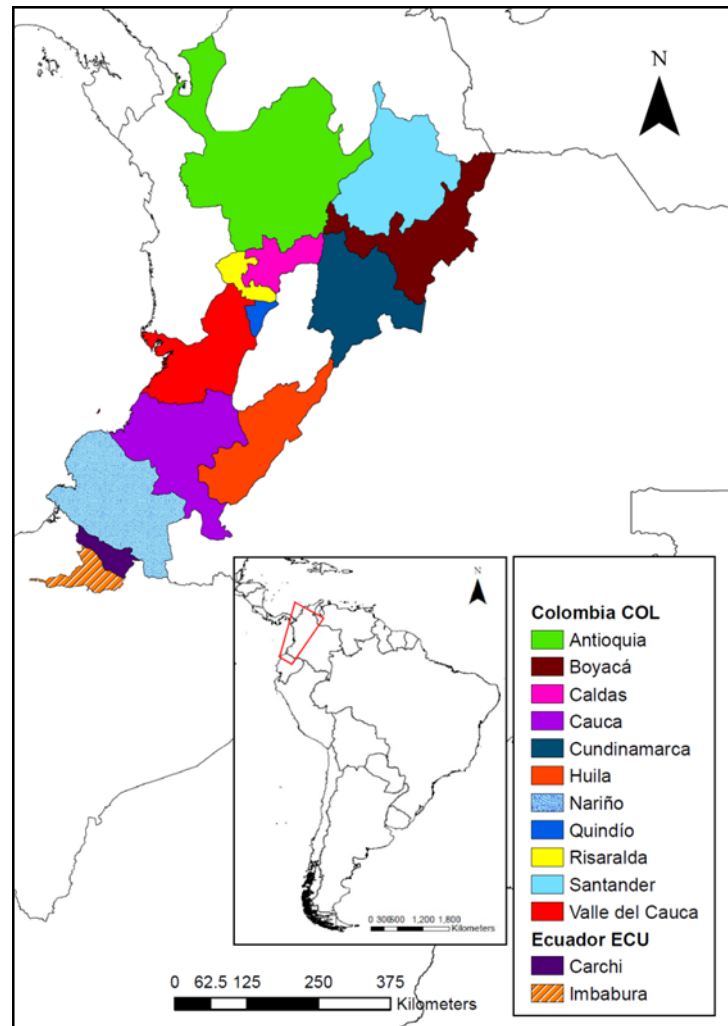


Figura 1-1. Regiones geopolíticas muestreadas para la obtención de ejemplares de *P. longifila*.

Análisis de datos

Evaluación del código de barras del ADN, como herramienta complementaria a la clasificación taxonómica morfológica de *P. longifila*

Se discriminó el total de haplotipos obtenidos por medio de Alequin 3.11 (Excoffier, et al., 2005), tanto para COI como para ITS2. Estos haplotipos fueron depositados en la base de datos del GenBank, y se realizó un análisis exploratorio basándose en el método de Neighbor Joining (NJ), y el modelo de Kimura de dos parámetros (K2P), para corroborar la identificación de la especie basada en caracteres morfológicos (Hebert, et al., 2003), empleando Mega 6 (Tamura, et al., 2013).

Análisis filogenéticos

Inferencia filogenética por método de Máxima Verosimilitud

Con el fin de inferir las relaciones evolutivas entre las poblaciones de *P. longifila*, se reconstruyó la filogenia empleando el método de máxima verosimilitud (MV), para las regiones COI e ITS2. Bajo el modelo Hasegawa, Kishino, y Yano (1985) con distribución gamma (HKY+G), se realizó la inferencia filogenética para la región COI. En el caso de la región ITS2 el modelo empleado para el análisis de MV fue el (HKY). Ambos modelos fueron considerados bajo el criterio de información bayesiana (BIC). La inferencia filogenética se realizó empleando el programa Mega 6 (Tamura, et al., 2013). Como grupos externos se designaron dos miembros de la familia Cecidomyiidae, *Dasineura* sp. y *P. floricola*, cuyas secuencias se obtuvieron en la presente investigación.

Inferencia filogenética por Red de Haplotipos y determinación de haplogrupos

La inferencia filogenética por red de haplotipos se realizó para estimar la genealogía intraespecífica. Este análisis permite tener en cuenta fenómenos a nivel poblacional para inferir patrones de divergencia; la relación directa entre el haplotipo más frecuente y la antigüedad del haplotipo permite evidenciar haplotipos ancestrales y derivados, esto bajo el método de median-joining network, empleando Network 4.6 (Watterson & Guess, 1977; Posada & Crandall, 2001).

Comparación a nivel genético entre ejemplares norteamericanos y suramericanos

Estimación de distancias genéticas (Distancia K2P)

Con la finalidad de corroborar si *P. longifila* de Colombia, es genéticamente igual o similar a los ejemplares encontrados en EUA, se estimaran las distancias genéticas entre haplotipos encontrados en ejemplares suramericanos, con los encontrados en EUA. Estas distancias se calcularon para el COI, bajo el modelo de kimura de dos parámetros empleando Mega 6 (Tamura, et al., 2013), siendo este adecuado para estimar distancias pequeñas como las esperadas a nivel intraespecífico para esta región del genoma (Hebert, et al., 2003). También se estimaron estas distancias para la región ITS2 bajo el mismo Modelo.

Test de Mantel

EL test de Mantel se realizó empleando una matriz de distancias geográficas, y una matriz de distancias genéticas, estimadas entre ejemplares de EUA y suramericanos, con el objetivo de corroborar si las distancias genéticas obtenidas pueden ser explicadas por el distanciamiento geográfico o derivadas de un

proceso de diferenciación por distancia geográfica, empleando para esto GenAlex 6.501 (Peakall & Smouse, 2012).

Obtención de distancias genéticas entre ejemplares provenientes de diferentes cultivos en Suramérica

Se estableció la composición haplotípica de ejemplares provenientes de diferentes cultivos, para determinar si el patrón obtenido indica especialización de los insectos sobre una determinada planta de cultivo. Para los haplogrupos obtenidos se estimó la distancia genética bajo el modelo K2P, empleando Mega 6 (Tamura, et al., 2013).

Diferenciación genética entre poblaciones provenientes de diferentes cultivos

Análisis de varianza molecular (AMOVA)

De las 26 poblaciones caracterizadas molecularmente, se escogieron 12 poblaciones simpátricas que han colonizado diferentes cultivos, para analizarlas bajo un AMOVA, con el fin de controlar posibles fuentes de variación debidas a distancia geográfica. Estas poblaciones consideradas simpátricas presentaban una distancia menor a 50 km, y se agruparon en cuatro grandes grupos de la siguiente manera: Gr1. Cítricos Támesis – Tomate Aguadas; Gr2. Cítricos Las lajas – Tomate Dovio y Bolivar; Gr3. Cítricos Palmira – Tomate Palmira, Candelaria y Tenerife; Gr4. Cítricos Garzón – Tomate Garzón y Pital. El AMOVA jerárquica estimada con Arlequin 3.11 (Excoffier, et al., 2005), se realizó con el fin de comparar los valores de F_{CT} , F_{SC} y F_{ST} ; que indican respectivamente, la diferenciación entre grupos de poblaciones simpátricas, la diferencia entre las

poblaciones de diferentes cultivos dentro de grupos, y las diferencias entre todas las poblaciones analizadas. El análisis se realizó bajo 1000 permutaciones.

Índice de fijación (F_{ST}) pareados y Análisis de coordenadas principales (PCoA)

Para determinar si existe estructura genética entre poblaciones establecidas en diferentes cultivos, se estimaron valores de F_{ST} . Estos valores de F_{ST} se emplearon para determinar si existe algún patrón de estructura poblacional atribuible a cultivo de origen, por medio de un PCoA. Estas inferencias poblacionales se realizaron empleando Arlequin 3.11 (Excoffier, et al., 2005).

Número de migrantes por generación (N_M) entre poblaciones de diferentes cultivos

Se estimó con Arlequin 3.11 (Excoffier, et al., 2005), el N_M entre pares de poblaciones provenientes de diferentes hospederos, con el fin de establecer si la especialización sobre el cultivo hospedero es una barrera al flujo genético entre las poblaciones de *P. longifila*.

RESULTADOS

Código de barras del ADN, como herramienta complementaria a la clasificación taxonómica morfológica de *P. longifila* y caracterización haplotípica utilizando COI e ITS2

En total se analizaron 404 secuencias para COI y 138 secuencias para ITS2, entre todos los especímenes inicialmente identificados morfológicamente como *P.*

longifila, por el experto en Cecidomyiidae. Para COI se discriminaron en total 26 haplotipos y cinco haplotipos para ITS2. Se realizó un análisis de agrupamiento por el método de NJ (K2P), empleando los haplotipos encontrados para cada marcador molecular y se evidenció la presencia de dos clados que presentaron distancias genéticas entre sí de 11.6% para el marcador COI (Figura 1-2), estos clados también se observaron para el marcador ITS2 y con una distancia genética de 2.4% (Figura 1-3). Debido a estas distancias genéticas tan grandes encontradas con COI, los ejemplares fueron revisados nuevamente a nivel morfológico por parte del experto en taxonomía de Cecidomyiidae, Dr. Raymond Gagné, quien confirmó que además de *P. longifila*, se encontraba una especie de Cecidomyiidae muy similar, denominada *Prodiplosis floricola* (Tabla 1-1; Figura 1-2, 1-3).

Los haplotipos discriminados de COI e ITS2 tanto para *P. longifila* como para *P. floricola*, se han incluido en la base de datos del GenBank, bajo códigos únicos (Tabla 1-1). Luego de la separación de ejemplares de cada una de las especies encontradas se pudo determinar que para *P. longifila*, se encontraron en total 16 haplotipos para COI y dos haplotipos para ITS2, *P. floricola* presentó 10 haplotipos para COI y tres haplotipos para ITS2. Los análisis genéticos de la especie *P. floricola*, se tratarán en el capítulo 2 de este trabajo de investigación.

Para los análisis moleculares se tuvieron en cuenta en total 368 secuencias de COI y 108 secuencias de ITS2 de *P. longifila*. Para los análisis y caracterización poblacionales se empleó el marcador COI al presentar mayor polimorfismo, en comparación con ITS2 al presentar solo dos haplotipos (Tabla 1-1). Se obtuvo la presencia de *P. longifila* en 24 poblaciones en Colombia, en cultivos de limón tahití y limón pajarito, y en cultivos de tomate y pimentón, en Ecuador solo se encontró *P. longifila* en dos poblaciones sobre cultivos de tomate (Tabla 1-2, Figura 1-4). Los haplotipos denominados A y B, fueron los más frecuentes entre los ejemplares

obtenidos del hospedero tomate, con una amplia distribución en Colombia, encontrándose en el 90% (A) y 65% (B) de las poblaciones muestreadas para este cultivo, los haplotipos restantes tuvieron una frecuencia menor al 50%.

Las Poblaciones muestreadas en Ecuador presentaron un haplotipo único denominado K, y comparten el haplotipo J con la población Cajibío, ubicada en el suroccidente colombiano. Entre las poblaciones obtenidas de cítricos, se encontraron tres haplotipos, de los cuales los haplotipos L y M se distribuyeron en las poblaciones de Palmira y Las Lajas, en el Valle del Cauca, mientras que el haplotipo N se encontró en la población de Támesis al noroccidente de Colombia en el departamento de Antioquia, y en la población denominada Garzón en el suroccidente colombiano, departamento de Huila (Figura 1-4).

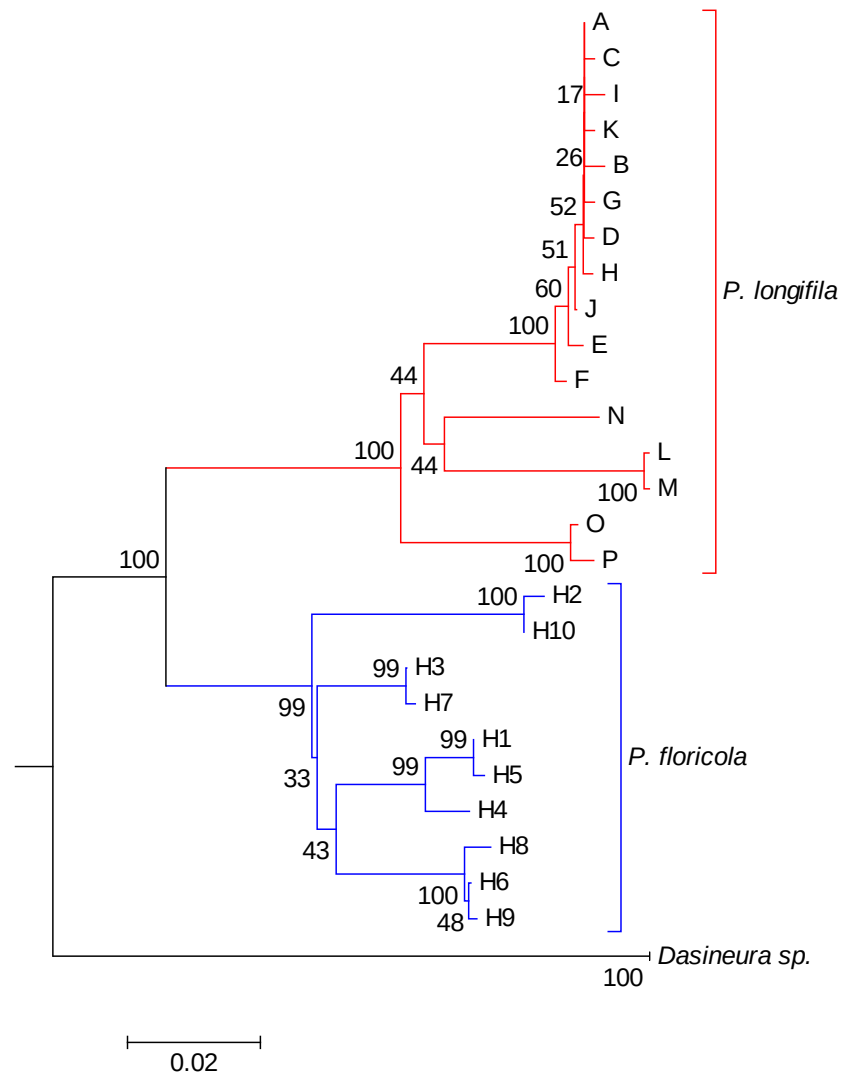


Figura 1-2. Análisis de agrupamiento por medio de método de NJ (K2P) Bootstrap 1000, de haplotipos totales para COI de ejemplares inicialmente identificados a nivel morfológico como *P. longifila*.

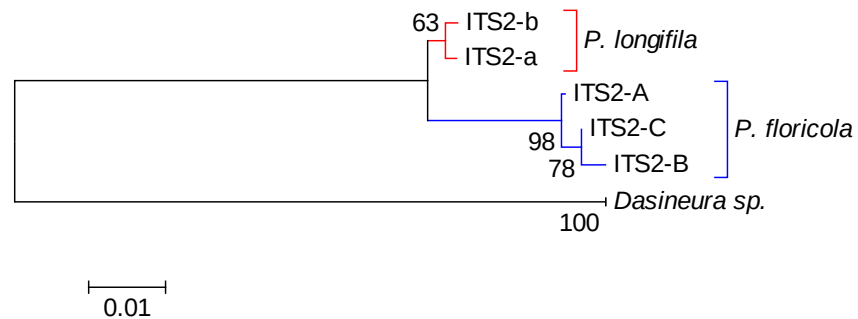


Figura 1-3. Análisis de agrupamiento de las secuencias ITS2 obtenidas en ejemplares inicialmente identificados morfológicamente como *P. longifila*, empleando el método de NJ(K2P), bootstrap 1000.

Tabla 1-1. Discriminación haplotípica de los ejemplares inicialmente determinados morfológicamente como *P. longifila*.

Marcador molecular	Especie	Haplotipo	Número de accesión de GenBank
COI	<i>P. longifila</i>	A	KM350195
		B	KM350197
		C	KM350200
		D	KM350201
		E	KM350202
		F	KM350203
		G	KM350204
		H	KM350205
		I	KM350206
		J	KM350207
		K	KM350208
		L	KM350193
		M	KM350194
		N	KM350196
		O	KM350198
		P	KM350199
	<i>P. floricola</i>	H1	KP744382
		H2	KP744383
		H3	KP744384
		H4	KP744385
ITS2	<i>P. longifila</i>	ITS2-a	KM998067
		ITS2-b	KM998069
	<i>P. floricola</i>	ITS2-A	KM998068
		ITS2-B	KM998069
		ITS2-C	KM998070

Tabla 1-2. Caracterización de las poblaciones de *P. longifila*, empleando COI. (N) número de individuos, (NH) número de haplotipos, (DH) diversidad haplotípica, (π) diversidad nucleotídica.

Población	Coordenadas		Hospedero	N	Haplotipos	NH	DH	π
	N	W						
Palmira	3.508	-76.321	Limón tahití	3	L	1	0	0
Las lajas	4.402	-76.054	Limón pajarito	3	L, M	2	0.67	0
Garzón	2.234	-75.731	Limón tahití	7	N, A	2	0.29	0.01
Támesis	5.704	-75.679	Limón tahití	2	N	1	0	0
Florida	25.504	-80.501	Limón tahití	8	O, P	2	0.43	0
Restrepo	3.75	-76.569	Tomate	12	A, B	2	0.3	0
Palmira	3.708	-76.43	Tomate	14	A, B	2	0.26	0
Dovio	4.499	-76.221	Tomate	45	A, B, C, D, E	5	0.56	0
Tenerife	3.641	-76.103	Tomate	14	A, B	2	0.54	0
Candelaria	3.408	-76.419	Tomate	4	A, B	2	0.5	0
Bolívar	4.254	-76.224	Tomate	21	A, B	2	0.32	0
Pitalito	1.846	-76.078	Tomate	39	A, I	2	0.05	0
Pital	2.27	-75.797	Tomate	2	A, B	2	1	0
Garzón	2.232	-75.601	Tomate	3	A	1	0	0
Santa Rosa	4.92	-75.651	Tomate	14	A, B, E	3	0.47	0
Palestina	5.004	-75.628	Tomate	33	A, B, E	3	0.48	0.48
Aguadas	5.607	-75.484	Tomate	14	A, B	2	0.53	0
Caqueza	4.422	-73.945	Tomate	3	G	1	0	0
Fusagasuga	4.393	-74.385	Tomate	9	A, G	2	0.22	0
Tenza	5.054	-73.303	Tomate	16	A, B, G	3	0.49	0
Peñol	6.262	-75.221	Tomate	16	B	1	0	0
Cajibío	2.561	-76.579	Tomate	25	A, B, J	3	0.45	0
San Gil	6.507	-73.127	Tomate	6	A, H	2	0.33	0
Curiti	6.621	-73.033	Tomate	11	A, F, G	3	0.47	0
Lebrija	7.101	-73.215	Tomate-Pimentón	6	A, F	2	0.33	0
Chota	0.463	-78.01	Tomate	21	J, K	2	0.52	0
Ibarra	0.568	-78.134	Tomate	17	J, K	2	0.53	0

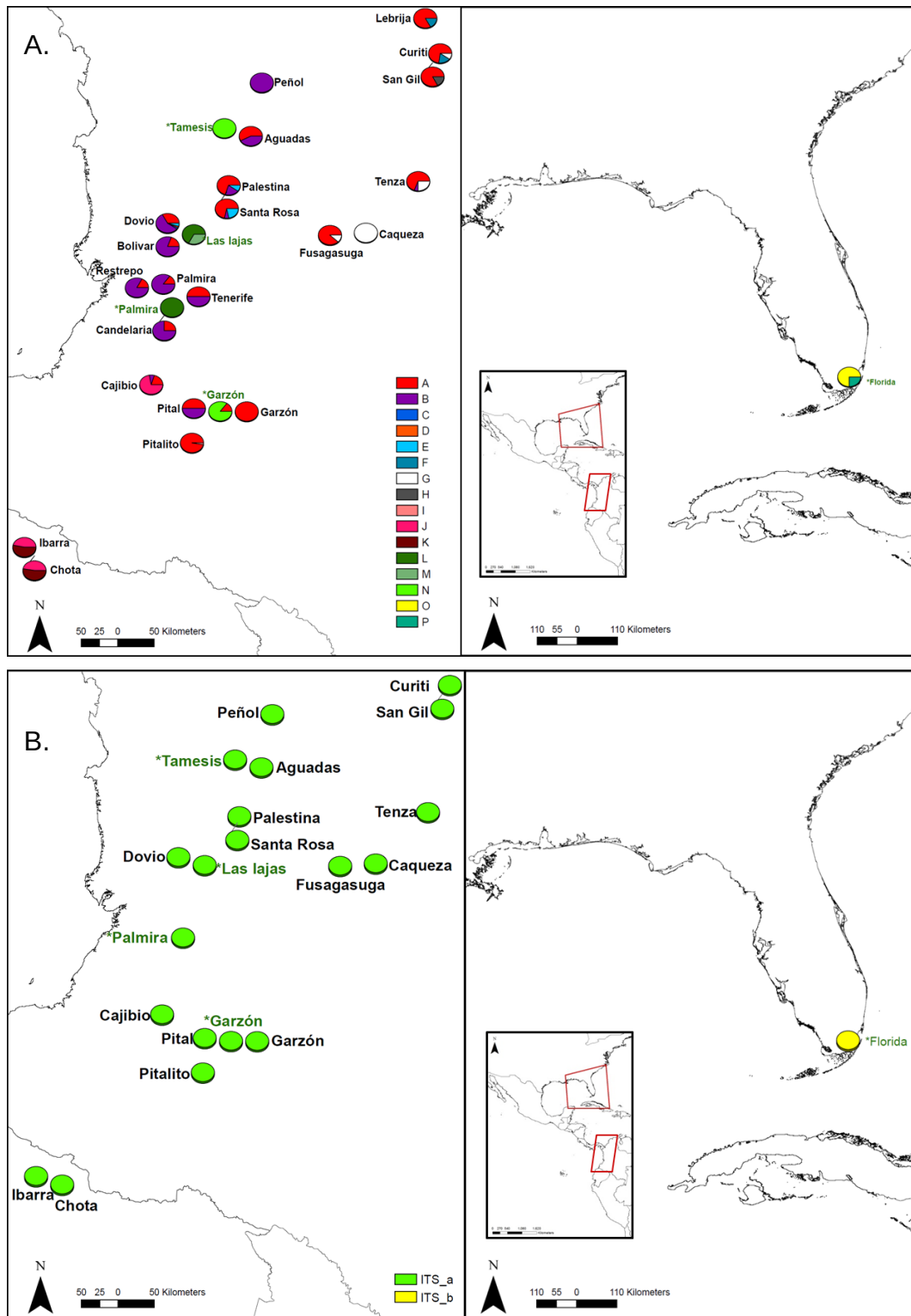


Figura 1-4 Distribución de haplotipos de *P. longifila*, en Colombia y Ecuador y Estados Unidos. A. Distribución haplotípica de COI. B. Distribución de haplotipos para ITS2.

Análisis filogenéticos

Inferencia filogenética por el método de Máxima Verosimilitud

La reconstrucción de la filogenia con el marcador COI, permitió observar dos grandes clados. El primero es un clado compuesto por los haplotipos de ejemplares de *P. longifila* obtenidos del estado de la Florida (EUA) en limón tahití y el segundo clado corresponde a ejemplares suramericanos, el cual a su vez, está dividido en dos grandes ramas. La primera se compone de ejemplares colombianos obtenidos de limón tahití y limón pajarito (cítricos); y la segunda subdivisión, agrupa a los ejemplares provenientes del hospedero tomate y pimentón (solanáceas) (Figura 1-5). Al realizar la inferencia filogenética para el marcador ITS2, se recuperan los dos grandes clados obtenidos con COI, que diferencian los ejemplares norteamericanos de los suramericanos; sin embargo no se logra diferenciar los subgrupos suramericanos asociados a cítricos de los asociados a tomate (Figura 1-6).

Inferencia filogenética por red de haplotipos y determinación de haplogrupos

Debido al bajo polimorfismo obtenido para el marcador ITS2, solo fue posible estimar la red de haplotipos para el set de haplotipos obtenido por COI. La red de haplotipos permitió discriminar tres haplogrupos, que coinciden con los clados recuperados por la inferencia filogenética empleando el mismo marcador (Figura 1-7). El primer haplogrupo se compone por los haplotipos A-K, asociados casi estrictamente al hospedero tomate, exceptuando un individuo de la población de Garzón cuyo hospedero fue limón tahití, que presentó el haplotipo A. Un segundo haplogrupo lo conformaron los haplotipos L-N, asociados estrictamente a cítricos

en Colombia. Los haplotipos P-O, asociados estrictamente a limón tahití de EUA, conformaron un haplogrupo independiente. A partir de la información obtenida de la red estimada, no fue posible inferir un haplotipo intermedio que explique la relación entre los haplogrupos asociados a cítricos con el haplogrupo asociado a tomate; sin embargo, se proponen al menos seis haplotipos que pueden explicar la conexión entre los haplogrupos obtenidos.

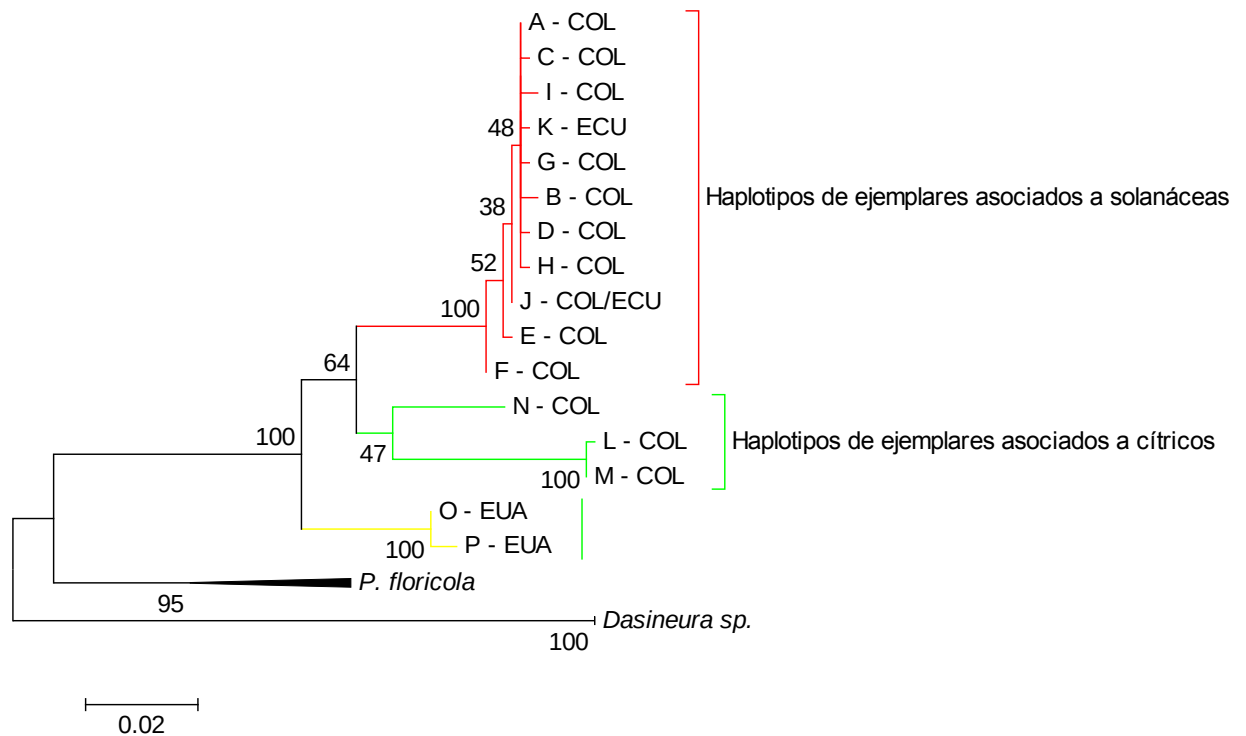


Figura 1-5. Árbol filogenético inferido por MV para 368 especímenes de *P. longifila*, usando el marcador COI, modelo HKY+G. 1000 bootstrap. Se han agrupado los clados recuperados por haplotipos.

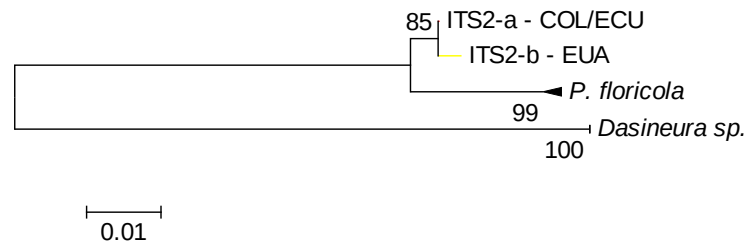


Figura1-6. Árbol filogenético estimado con el método de MV para 108 secuencias de ITS2 de *P. longifila*, bajo el modelo HKY. 1000 bootstrap. Los clados recuperados se agruparon por haplotipos.

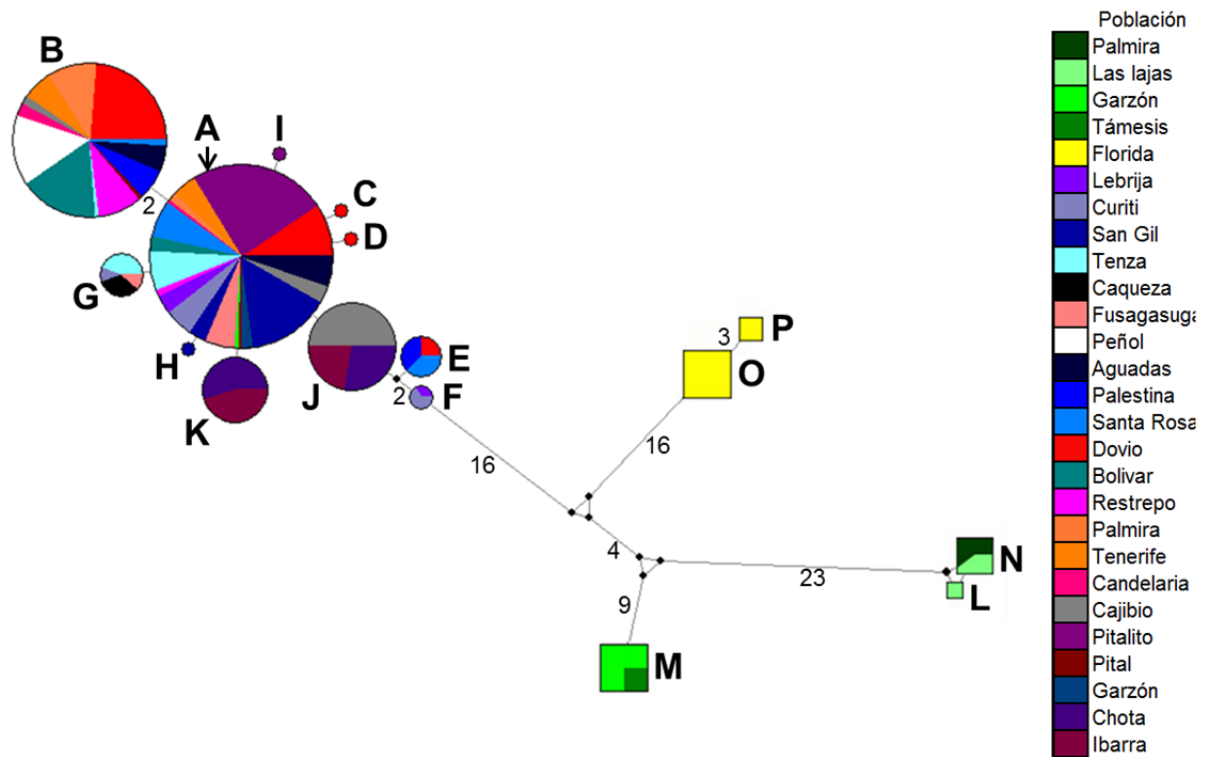


Figura 1-7. Red de haplotipos inferida por el método de median-joining, para 16 haplotipos de *P. longifila*. Los haplotipos encontrados en hospedero Tomate se representan por medio de círculos, y los cuadrados representan haplotipos asociados a hospedero limón tahití y limón pajarito, el tamaño de área representa la proporción de individuos que contiene el haplotipo. Los colores representan las poblaciones de *P. longifila*.

Las distancias genéticas dentro de cada haplogrupo se describen en la tabla 1-3, y fueron estimadas con el fin de establecer que tan homogéneas son las agrupaciones haplotípicas definidas. De acuerdo con los resultados, el haplogrupo más heterogéneo es el haplogrupo colombiano de cítricos, mientras que los restantes presentan una variación intra grupo menor a 1%.

Tabla 1-3. Distancias genéticas dentro de los haplogrupos inferidos por la red de haplotipos, estimadas con el modelo K2P.

Distancia K2P dentro de cada grupo	Dist.	%
COL cítricos (limón tahití y limón pajarito)	0.04	3.66
EUA limón tahití	0.00	0.46
COL/ECU solanáceas (tomate y pimentón)	0.00	0.45

Comparación a nivel genético entre ejemplares norteamericanos y suramericanos

Distancias genéticas (K2P)

Se estimaron las distancias genéticas bajo el modelo de K2P, entre el haplogrupo de ejemplares provenientes de Norteamérica y los haplogrupos de ejemplares suramericanos (Tabla 1-4). La distancia genética entre el haplogrupo de haplotipos de EUA y el haplogrupo colombiano, cuyo hospedero fueron cítricos, fue de 5.63%, mientras que esta misma comparación con el haplogrupo presente en COL-ECU, cuyo hospedero fueron solanáceas, arrojó una distancia genética de 6.61%. La distancia genética entre estos grupos para el marcador ITS2 fue de 0.3%.

Tabla 1-4. Distancias genéticas derivadas del modelo K2P entre haplogrupos de ejemplares separados geográficamente.

Distancia K2P entre grupos		Dist COI	%	Dist ITS2	%
COL limón tahití y limón pajarito	EUA limón tahití	0.06	5.63	0.00	0.30
COL/ECU tomate y pimentón	EUA limón tahití	0.07	6.61	0.00	0.30

Test de Mantel

De acuerdo al test de Mantel, existe una correlación positiva entre las distancias geográficas y las distancias genéticas estimadas entre las poblaciones ($R_{xy} = 0.326$; $P(r_{xy\text{-rand}} \geq r_{xy\text{-data}}) = 0.010$). Esto indica que las distancias genéticas entre poblaciones suramericanas y los ejemplares norteamericanos pueden ser producto de un proceso de aislamiento por distancia geográfica, derivando en haplotipos únicos no compartidos entre estas regiones geográficas.

Diferenciación genética entre ejemplares provenientes de diferentes cultivos en Suramérica

En Suramérica, se encontró a *P. longifila* en dos hospederos, cítricos (limón tahití y limón pajarito) y solanáceas (tomate y pimentón) (Figura 1-8); los ejemplares provenientes de cada hospedero presentaron una composición haplotípica diferente. Los ejemplares obtenidos del hospedero solanáceas presentaron 11 haplotipos de los cuales el A y el B tuvieron la mayor representación, y los restantes fueron haplotipos poco frecuentes e incluso únicos para algunas poblaciones; los ejemplares cuyo hospedero fue cítricos presentaron tres haplotipos exclusivos no compartidos con ejemplares provenientes de solanáceas (Figura 1-8). En general no se presentan haplotipos compartidos entre insectos provenientes de distintos hospederos, exceptuando el caso de un individuo proveniente de limón tahití que presentó el haplotipo A, el cual es dominante en el hospedero solanáceas (Figura 1-8). Al establecer las distancias genéticas entre haplogrupos asociados a hospederos diferentes, se encontró que estos difieren en un 5.61% (Tabla 1-5).

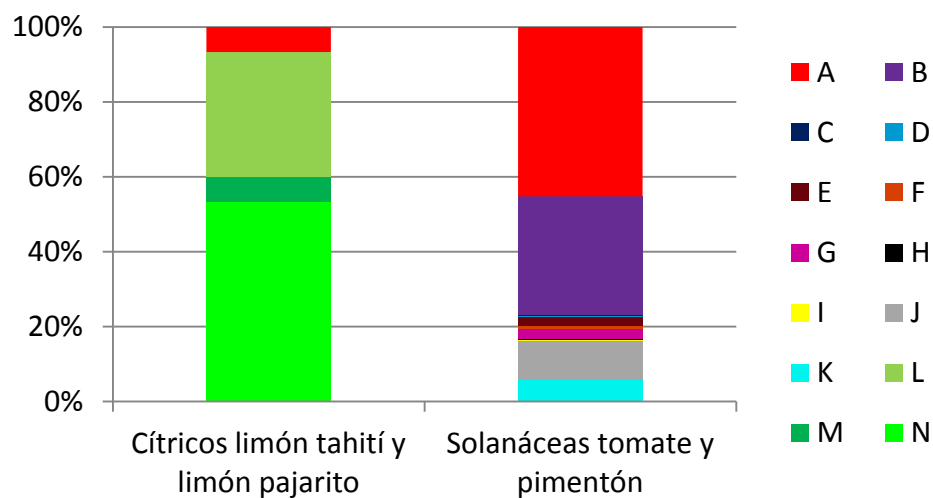


Figura 1-8. Composición haplotípica de *P. longifila* en diferentes hospederos.

Tabla 1-5. Estimación de distancias genéticas bajo el modelo de K2P, entre haplogrupos suramericanos asociados a diferentes hospederos.

Distancia K2P entre grupos		Dist.	%
COL limón tahití y limón pajarito	COL/ECU tomate y pimentón	0.06	5.61

Diferenciación genética entre poblaciones provenientes de diferentes cultivos

Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Con el fin de establecer si existía diferenciación genética poblacional atribuible a cultivo hospedero, se evaluaron poblaciones simpátricas de *P. longifila* que han colonizado diferentes hospederos, por medio de un AMOVA jerárquico (Tabla 1-6). Con este análisis, el efecto del hospedero explicó casi la totalidad de la variación encontrada en los datos, y el F_{ST} mostró una fuerte diferenciación genética entre las poblaciones simpátricas obtenidas de cítricos y tomate, dentro de los cuatro grupos establecidos (Tabla 1-6).

Tabla 1-6. Análisis de varianza molecular anidado (AMOVA), 1000 permutaciones.

Fuente de variación	% variación	Índices		Valor p
Entre grupos de poblaciones simpátricas	-36.63	F_{SC}	0.88	< 0.05
Entre poblaciones simpátricas de diferentes hospederos	119.88	F_{ST}	0.83	< 0.05
Entre poblaciones	16.75	F_{CT}	-0.37	> 0.05

Índice de fijación (F_{ST}), F_{ST} pareados, Análisis de coordenadas principales (PCoA) y número de migrantes (N_M)

Se estimaron los F_{ST} pareados y el N_M entre las poblaciones analizadas en el AMOVA (Tabla 1-7). Estos resultados mostraron que las poblaciones de *P.*

longifila, establecidas en cítricos, presentaron una alta diferenciación genética (cercana a uno), respecto a las poblaciones de este insecto establecidas en solanáceas; y un número de migrantes por generación cercano a cero. Igualmente, se observó que las poblaciones de Támesis y Garzón presentan un bajo valor de diferenciación poblacional (cercano a cero), y un estimado de número de migrantes por generación infinito. Algo similar ocurrió entre las poblaciones de Palmira y Las Lajas (F_{ST} cercano a cero y $N_M=6$). Sin embargo, entre estos pares de poblaciones se presenta una alta diferenciación poblacional pese a que los insectos colonizan el mismo hospedero, cítricos. Entre las poblaciones que colonizan solanáceas los valores de F_{ST} fueron cercanos a cero y el N_M fue en general mayor a uno.

El análisis de coordenadas principales, basado en F_{ST} entre poblaciones, muestra una clara diferenciación entre las poblaciones asociadas a tomate-pimentón, y las asociadas a limón tahití y limón pajarito (Figura 1-9). Se presenta un agrupamiento de las poblaciones que colonizan el hospedero tomate-pimentón. Además, se observa la diferenciación entre las poblaciones Las Lajas y Palmira de las poblaciones Garzón y Támesis. El cluster de poblaciones asociadas a tomate-pimentón, y el de poblaciones asociadas a limón tahití y limón pajarito no se explica por proximidad geográfica, o barreras geográficas.

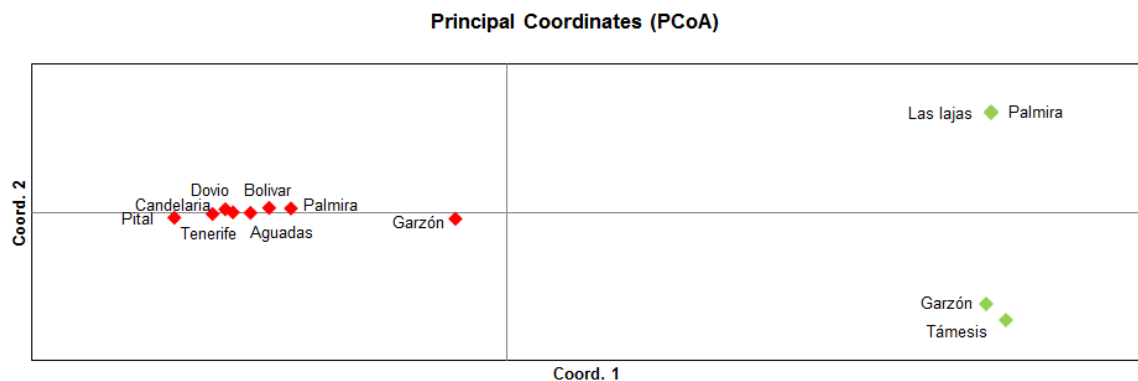


Figura 1-9. Análisis de agrupamiento PCoA, basándose en F_{ST} poblacionales. Se denotan con color rojo aquellas poblaciones de especímenes asociadas a hospedero tomate y pimentón, mientras que el verde indica que la población está asociada a limón tahití y limón pajarito.

Tabla 1-7. En el área sobre la diagonal se indican el número de migrantes (N_M), entre poblaciones analizadas bajo el AMOVA. Los valores de F_{ST} entre las poblaciones analizadas se indican en el área bajo la diagonal. En rojo se indican los valores de F_{ST} estadísticamente significativos (Valor- $p < 0.05$).

	Poblaciones	Hospedero	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Aguadas	Solanáceas		0.02	inf	1.67	0.01	0.01	1.27	13.48	inf	0.08	inf	2.51
2	Támesis	Cítricos	0.97		0.02	0.01	0.01	0	0.01	0.01	0.02	inf	0.02	0
3	Dovio	Solanáceas	-0.01	0.96		7.53	0.02	0.02	5.34	inf	inf	0.05	inf	1.45
4	Bolivar	Solanáceas	0.23	0.98	0.06		0.01	0.01	inf	inf	2.86	0.06	inf	0.25
5	Las Iajas	Cítricos	0.97	0.99	0.97	0.98		6	0.01	0.01	0.01	0.13	0.02	0
6	Palmira	Cítricos	0.98	1	0.97	0.98	0		0.01	0.01	0.01	0.12	0.01	0
7	Palmira	Solanáceas	0.28	0.99	0.09	-0.05	0.99	0.99		inf	2.03	0.07	4.25	0.17
8	Candelaria	Solanáceas	0.04	0.98	-0.09	-0.16	0.98	0.98	-0.14		inf	0.15	inf	0.32
9	Tenerife	Solanáceas	-0.07	0.97	-0.03	0.15	0.97	0.98	0.2	-0.05		0.08	inf	1.5
10	Garzón	Cítricos	0.86	-0.31	0.91	0.9	0.8	0.8	0.88	0.77	0.86		0.2	0.16
11	Pital	Solanáceas	-0.38	0.97	-0.33	0	0.97	0.98	0.11	-0.38	-0.4	0.72		1.5
12	Garzón	Solanáceas	0.17	1	0.26	0.67	0.99	1	0.75	0.61	0.25	0.76	0.25	

DISCUSIÓN

Inferencia filogenética en *P. longifila*

De acuerdo con Posada & Crandall, (2001); las redes de haplotipos son representaciones adecuadas de la variación genética intraespecífica. Estos autores plantean que la aproximación de las relaciones evolutivas entre haplotipos pertenecientes a ejemplares cercanos filogenéticamente, incluso por debajo de la jerarquía de especie, que se realiza con árboles filogenéticos presentan problemas propios de la baja divergencia genética esperada de grupos conoespecíficos, como por ejemplo la disminución de poder en el soporte estadístico al contarse con un bajo número de caracteres bajo el análisis, y la necesidad de incrementar el número de muestras en comparación con lo que se analiza a nivel interespecífico, además de la diferenciación dicotómica.

En el presente estudio, tanto la inferencia filogenética, tanto por el método de red de haplotipos, como por el método de MV, empleando el marcador COI, permitieron la identificación de clados asociados a distanciamiento geográfico y asociación a hospedero, recuperándose los mismos haplogrupos con un alto valor de soporte de nodo en el caso de la inferencia por MV; aunque la realizada para ITS2 no arroja estrictamente la misma información; y debido a que la estimación de la red de haplotipos para el marcador ITS2 no fue posible, la inferencia filogenética por el método de MV fue el método más plausible para analizar la información de estas secuencias.

El primer factor de divergencia genética, al cual se puede atribuir la formación de dos grandes clados dentro del grupo monofiletico de *P. longifila*, es el distanciamiento geográfico. Esto se evidencia en el árbol obtenido para COI por la formación del clado de EUA y el agrupamiento formado por los ejemplares provenientes de COL-ECU. En el árbol generado por ITS2 se puede corroborar esta inferencia debido a que se presentó un solo haplotipo entre ejemplares de COL-ECU mientras que el grupo de ejemplares de EUA presenta un haplotipo diferente para este marcador. El segundo factor que parece actuar en la diferenciación genética del grupo *P. longifila* es la variación de hospedero; esto es inferido por la subdivisión del grupo suramericano, al realizar la estimación filogenética por MV, estos clados discretos se conforman en primer lugar por ejemplares cuyo hospedero fueron cítricos, y en segundo lugar por ejemplares que en el 99.9% de los casos emergieron de tejidos vegetales solanáceas; el marcador ITS2 no soporta este planteamiento debido a que estas agrupaciones obtenidas por COI, no se recuperan empleando este marcador.

Al contrastar los resultados obtenidos por el método de MV, con la inferencia filogenética por red de haplotipos para COI, se verificó la formación de los grupos asociados a limón tahití en EUA, cítricos en COL, y solanáceas COL/ECU. La red

de haplotipos ofrece la ventaja de incluir en las relaciones haplotípicas, haplotipos intermedios extintos o no muestreados que explican las relaciones entre los haplogrupos identificados de forma más parsimoniosa, y permite la identificación de eventos demográficos tales como la expansión poblacional (Bandelt, et al., 1999). En este sentido, es posible inferir que en el haplogrupo asociado a solanáceas ha ocurrido un evento de expansión poblacional indicado por la formación característica en forma de estrella (Posada & Crandall, 2001), a partir de nodos derivados (haplotipos B-K) de un haplotipo o nodo fundador, en este caso el haplotipo A. Desde esta perspectiva es posible inferir que este haplotipo A es el más antiguo, pues la antigüedad del haplotipo está ligada al número de haplotipos derivados con los cuales está directamente conectado; además, por medio de esta inferencia es posible interpretar la antigüedad del haplotipo en términos de su frecuencia en las poblaciones (Posada & Crandall, 2001), se asume que el haplotipo más antiguo, prevalece con mayor frecuencia en las poblaciones y está ampliamente distribuido geográficamente; y que las variantes derivadas de este haplotipo más antiguo serán menos frecuentes y sus descendientes inmediatos generados por nuevas mutaciones tienden a permanecer en las poblaciones de origen en lugar de colonizar nuevas poblaciones o poblaciones distantes, siendo estos haplotipos mas derivados exclusivos de ciertas poblaciones o presentan un rango limitado de distribución (Bandelt, et al., 1999; Posada & Crandall, 2001). Los anteriores planteamientos podrían ser adecuados para definir un haplotipo ancestral en general; sin embargo esto solo se observa en el haplogrupo asociado a solanáceas, y los asociados a limón tahití y limón pajarito muestran un comportamiento completamente diferente, se observan haplotipos equivalentes en frecuencia, y que muestran un patrón de divergencia local por introducciones posiblemente independientes. Finalmente al tener en cuenta que las poblaciones más antiguas pueden presentar mayor diversidad genética que las más recientes, se podría sugerir a la población del Dovia como el centro de origen y de dispersión de *P. longifila* en solanáceas,

mientras que esta sugerencia no es posible realizarla para las poblaciones cuyo hospedero son cítricos.

Diferenciación genética por distanciamiento geográfico en poblaciones de *P. longifila*

Es evidente que los ejemplares de *P. longifila* provenientes de poblaciones del estado de la Florida EUA, y las poblaciones del insecto en COL-ECU, están aislados por distancias geográficas que impedirían la dispersión de los individuos entre estas poblaciones, considerando mecanismos naturales de dispersión reportados para cecidómidos y las distancias de dispersión reportadas para estas especies. De acuerdo con Bolnick & Fitzpatrick, (2007), si la distancia entre las poblaciones o aspectos ambientales entre las poblaciones, impide que los individuos se dispersen entre dichas poblaciones, ocurre aislamiento geográfico. En algunos cecidómidos se ha reportado que estos insectos se transportan pasivamente con los vientos, convirtiéndose en un mecanismo de dispersión para estas especies, tal es el caso de *Contarinia sorghicola*, que es una especie plaga asociada al cultivo de sorgo en EUA, se ha reportado que los adultos se dispersan por vientos, a más de 400 m de distancia de su sitio de emergencia (Pendleton & Teetes, 1994). Para *Sitodiplosis mosellana*, Miao, et al., (2013), reportan que este cecidómido puede transportarse en estadio adulto pasivamente entre 25 y 200 km aproximadamente.

A nivel genético, los ejemplares identificados como *P. longifila* de EUA, conforman un haplogrupo bien definido con una distancia genética intragrupo de 0.46%, al igual que los ejemplares morfológicamente identificados como pertenecientes a esta especie en ECU-COL obtenidos de solanáceas cuya distancia genética intragrupo fue de 0.45%, mientras que el grupo de COL de cítricos 3.66%. Las

distancias genéticas (basadas en COI) obtenidas de la comparación entre los ejemplares de EUA y los suramericanos, presentaron un valor promedio de 6.12%. De acuerdo con Hebert, et al., (2004), se recomienda una diferencia de 10 veces la distancia intraespecífica, para determinar que se tienen especies diferentes, considerando que las distancias genéticas intraespecíficas en general no son mayores a 1%. Teniendo en cuenta esto, encontramos que las distancias genéticas para el grupo de EUA y el de ECU-COL asociado a solanáceas, presentan distancias genéticas intragrupo menores a 1%, y que el grupo COL asociado a cítricos presenta una mayor variación con distancia intragrupo alrededor del 4%. Considerando entonces las distancias intragrupo los umbrales propuestos para la discriminación de especies de acuerdo con Hebert, et al., (2004), estarían alrededor del 5%, sin considerar el dato atípico de la distancia intragrupo del clado COL asociado a limón tahití y limón pajarito que se discutirá más adelante. Este umbral estimado está por debajo de las distancias genéticas estimadas entre clados, de ejemplares de EUA y los suramericanos, lo que evidencia que entre estas poblaciones distanciadas geográficamente se ha presentado un proceso de diferenciación genética por aislamiento geográfico. Este resultado además indica que no ocurre dispersión antropogénica entre estas poblaciones, que pueda generar flujo genético. Lo anteriormente descrito, es soportado por el test de Mantel, que indica que las distancias genéticas estimadas entre estos grupos, pueden ser explicadas por las distancias geográficas encontradas.

La región analizada del ITS2 presentó un bajo polimorfismo entre las poblaciones EUA y suramericanas (distancia genética de 0.3%). Sin embargo, la presencia de los dos haplotipos diferentes que no se comparten entre Norteamérica y Suramérica, apoyan la hipótesis de diferenciación por aislamiento geográfico, al igual que COI, aunque este marcador nuclear es quizás muy conservado en

comparación con el mitocondrial para este grupo, lo que le da más relevancia a las pocas diferencias detectadas.

Diferenciación por especialización en un hospedero

Al analizar la composición haplotípica que de los ejemplares cuyo hospedero fue cítricos o solanáceas, encontramos que se presentan haplotipos exclusivos para el caso de insectos en cada hospedero, salvo la excepción de un individuo que presento el haplotipo A, propio de insectos que colonizan solanáceas lo que puede ocurrir por error en la ovoposición sobre un hospedero no nativo para el individuo. Lo anterior indica de manera indirecta que existe fidelidad por parte de los insectos a un hospedero particular, y que difícilmente insectos de poblaciones en cítricos pajarito ovopositaran en plantas de tomate y pimentón, y viceversa. Estos resultados concuerdan con la inferencia filogenética por MV y red de haplotipos, donde se aprecia la diferenciación entre ejemplares por hospedero de procedencia. La fidelidad en la ovoposición sobre un hospedero se considera un factor relevante para favorecer el proceso de diferenciación genética entre poblaciones simpátricas, debido a que la escogencia del hospedero por parte de la madre, predispone a su descendencia a entrecruzarse en ese mismo hospedero (Dorchin, et al., 2009).

Existe evidencia de que el fenómeno de especiación simpátrica, en insectos fitófagos puede ocurrir partiendo de la formación de razas asociadas a hospederos cuyo aislamiento reproductivo es emergente y existe flujo genético entre dichas razas (Via, 2001; Drès & Mallet, 2002; Bolnick & Fitzpatrick, 2007), este proceso de diferenciación entre poblaciones, no necesariamente involucra cambios morfológicos, por lo que en ciertos grupos esto puede derivar en la formación de especies crípticas entre las cuales hay aislamiento reproductivo (Drès & Mallet, 2002; Stireman, et al., 2005).

Los haplogrupos identificados en *P. longifila*, que se asocian a un hospedero particular, muestran una diferenciación genética del 5.6%, que es mayor al umbral planteado anteriormente del 5%, basándose en 10 veces el valor de las distancias genéticas dentro de cada grupo, para la delimitación de especies. Teniendo esto en consideración estas distancias indican que hay diferentes especies, y la carencia de caracteres morfológicos que las distingan sugiere que estas son especies crípticas. Sin embargo, por definición las especies crípticas son especies biológicas que erróneamente se clasifican bajo un mismo nombre, por lo que es necesario complementar la información de los datos moleculares con observaciones que pongan en evidencia el aislamiento reproductivo entre estos grupos para aseverar que existen especies crípticas en *P. longifila*, tales como ensayos de preferencia de ovoposición en diferentes hospederos, y entrecruzamientos de individuos de diferentes hospederos.

La distancia genética intragrupo reportada para el haplogrupo asociado a cítricos (3.7%), es muy elevada considerando lo esperado como variación intraespecífica para COI, de acuerdo con Hebert, et al., (2003) y Hebert, et al., (2004), este dato atípico puede explicarse por la gran diferenciación que presenta el haplotipo N, respecto al L-M. Este haplotipo es el único haplotipo en las poblaciones Támesis y Garzón, lo que indica que estas poblaciones no necesariamente son producto de la misma introducción, que genero la colonización de cítricos en las poblaciones vallecaucanas de Lajas y Palmira que presentan dos haplotipos similares. Otro escenario posible es que en estas localidades, se presenten presiones de selección constantes que generen la homogenización de la población o la variación genética de estas poblaciones sea producto de un cuello de botella.

Pese a que la presente investigación es la primera de su tipo en el género *Prodiptosis*, en la familia Cecidomyiidae, el fenómeno de especiación críptica por especialización sobre un hospedero, se ha reportado para poblaciones simpátricas de *D. oxycoccana* asociadas a *V. macrocarpon* y *V. corymbosum* (Cook, et al., 2011; Mathur, et al., 2012); en *D. folliculi* sobre *S. rugosa* y *S. gigantea* (Dorchin, et al., 2009). Estos estudios emplean evidencia de tipo genético (región COI), como complemento a pruebas de cruzamiento entre individuos de poblaciones de diferentes hospederos, ensayos directos de preferencia de ovoposición, y otros aspectos de historia natural de los insectos en sus plantas hospederas, para concluir que evidentemente existe aislamiento reproductivo que ha concluido en la formación de especies crípticas. En *A. borrichia* (Stokes, et al., 2012), cuyas poblaciones se asocian a *B. frutescens*, *I. frutescens*, e *I. imbricata*, se sugiere la formación de razas asociadas a hospedero, debido a que los resultados indican que existe flujo genético entre las poblaciones de diferentes hospederos y el aislamiento reproductivo no está completamente comprobado.

Los análisis poblacionales apoyan la hipótesis de diferenciación genética por especialización sobre un hospedero. El AMOVA muestra que casi la totalidad de la variación genética se debe a las diferencias entre las poblaciones que han colonizado cítricos, y además se muestra una estructura poblacional fuerte entre dichas poblaciones, producto de la carencia de haplotipos compartidos entre ejemplares de diferentes hospederos, y la alta distancia genética entre los haplotipos característicos de cada grupo. Al analizar la diferenciación entre pares de poblaciones y el número de migrantes, se observa que entre poblaciones de insectos de diferentes cultivos la estructura poblacional es significativamente alta, por consiguiente el número de migrantes es cero. Entre las poblaciones asociadas a solanáceas se evidencia la existencia flujo genético, incluso entre poblaciones que no son cercanas geográficamente, obteniéndose en general valores de F_{ST} que no son significativamente diferentes de cero, lo que puede indicar movimiento

antropogénico entre estas poblaciones ya que en algunos casos, estas están separadas por distancias geográficas que sobrepasan el rango de dispersión que se reporta para otros cecidómidos. Entre las poblaciones de insectos cuyo hospedero fue limón tahití y limón pajarito, se evidencia que solo hay flujo genético entre Támesis y Garzón, pese a que se encuentran distanciadas geográficamente, lo que podría indicar dispersión antropogénica, mientras que el flujo entre Las Lajas y Palmira es más factible que ocurra de forma pasiva por la proximidad geográfica.

Los análisis basados en COI, soportan la idea de que en Suramérica, *P. longifila* ha sufrido un proceso de diferenciación poblacional que ha derivado en la formación de especies crípticas. A favor de la hipótesis de formación de especies crípticas se tiene el indicio de fidelidad al hospedero sugerido por la composición haplotípica entre poblaciones de diferentes hospederos y el número de migrantes por generación que se observa entre poblaciones de diferentes cultivos (cercano a cero), esto indica que hay un proceso de aislamiento reproductivo entre estos grupos. Adicional a lo anterior, Henández, (2014), encuentra que *P. longifila* en Colombia, al colonizar cítricos, los adultos ovopositan en los botones florales y las larvas se alimentan de las estructuras reproductivas de las flores, mientras que en solanáceas los insectos ovopositan en brotes vegetativos tiernos, frutos tiernos y estructuras florales, y las larvas consumen estas estructuras; mostrando entonces un comportamiento diferente en cuanto a la explotación del recurso que depende del hospedero a colonizar. Esto complementa y apoya la propuesta de que el grupo *P. longifila* presenta especies crípticas, sin embargo, es necesario obtener información de historia natural de estas poblaciones aquí caracterizadas para aseverar que *P. longifila* en Suramérica es actualmente un complejo de especies crípticas (Drès & Mallet, 2002; Bolnick & Fitzpatrick, 2007; Dorchin, et al., 2009).

La ausencia de polimorfismo para ITS2, entre los ejemplares de diferentes hospederos, parece no soportar la hipótesis de formación de razas asociadas a

hospedero, sin embargo parece que esta región del genoma nuclear no presenta el polimorfismo observado en otros grupos, y la diferenciación fue considerablemente baja, incluso al compararla con lo obtenido para *P. floricola*. Además, es necesario incrementar el número de marcadores moleculares e incorporar a futuros estudios aspectos de historia natural de las poblaciones con el fin de determinar si existe aislamiento reproductivo y los factores involucrados en el mismo.

CONCLUSIONES

- Los análisis filogenéticos permitieron evidenciar clados divergentes atribuibles a distanciamiento geográfico y especialización en un hospedero.
- Los ejemplares norteamericanos y suramericanos de *P. longifila*, no son idénticos genéticamente y los marcadores moleculares empleados sugieren que se ha presentado un proceso de diferenciación por distanciamiento geográfico.
- Los resultados obtenidos sugieren la formación especies crípticas asociadas a hospederos en el taxón objeto de estudio en Suramérica.
- El código de barras del ADN (COI), fue una herramienta útil como complemento a identificación taxonómica morfológica de *P. longifila*.

- Aunque el marcador ITS2 no es recomendable para investigaciones en genética de poblaciones en *Prodiplosis*, es útil como complemento a la región COI como código de barras del ADN.

CAPÍTULO 2

PRIMER REPORTE DE *Prodiplosis floricola* (FELT) (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE), EN COLOMBIA Y ASPECTOS GENERALES DE SU DINÁMICA POBLACIONAL

INTRODUCCIÓN

Dentro de Cecidomyiidae, Gagné, (2010) reportó alrededor de 6100 especies, algunas de ellas importantes en agricultura, como especies plaga de cultivos, depredadores de otros insectos y ácaros. Sin embargo, poco es conocido sobre esta familia de dípteros en el neotrópico, aunque se sabe que son insectos de talla pequeña difíciles de identificar y pobremente estudiados (Gagné, 1986; Gagné, 1994; Alford, 2007; Gagné, 2010).

P. floricola, contrario a la mayoría de especies fitófagas de Cecidomyiidae, presenta un amplio rango de hospedero, es así como se han asociado miembros de tres familias diferentes de plantas a este insecto (Gagné, 1986; Gagné, 2010). Esta especie se ha reportado en Estados Unidos, Nueva York, en *Spiraea salicifolia* (Rosaceae); *Clematis virginiana*. (Ranunculaceae) (Gagné, 1986) (Gagné, 2010). En Suramérica se ha reportado en Brasil, en el Distrito Federal de Brasil y Sao Paulo, en *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) (Gagné, 1986; Oliveira, 1997; Carregaro, et al., 2009). Como característico del género, *P. floricola* se alimenta de brotes florales, no es formadora de agallas y es multivoltina (Gagné, 1986).

En Colombia, *P. floricola* se encontró en *C. latifolia* y *C. aurantifolia* (Rutaceae) en los departamentos de Huila, Valle del Cauca, y Antioquia, gracias al análisis de la

región COI e ITS2. No existen reportes previos o antecedentes de este insecto en el país, y a nivel global la investigación en torno a esta especie es escasa. Por lo tanto se planteó como objetivo caracterizar molecularmente, las poblaciones de *P. floricola*, encontradas en Colombia, mediante código de barras del ADN (COI) y el espaciador interno ITS2, y de esta forma realizar inferencias sobre el origen, patrón de dispersión y estructura poblacional de la especie en el país.

ANTECEDENTES

Prodiplosis floricola Felt, 1907

P. floricola fue inicialmente detectado en Nueva York, Estados Unidos, en flores de *S. salicifolia* y se encontró también atacando brotes florales de *C. virginiana*. Posteriormente se identificó en Brasil, cuyo hospedero fue *C. brasiliense* (Gagné, 1986). Poco se conoce de la biología de este insecto, aunque se sabe que las hembras ovopositan en los botones florales, la posterior alimentación de las larvas a partir de estos botones florales genera la pérdida de estas estructuras y por ende pérdidas en los cultivos (Oliveira, 1998).

En Brasil este insecto es una de las diez principales especies asociadas a *C. brasiliense* (Demolin Leite, et al., 2012); sin embargo estudios que involucren la especie son escasos. *P. floricola* se ha incluido en reportes de fauna asociada a *C. brasiliense* por parte de Carregaro, et al., (2009), y estudios realizados por parte de Oliveira, (1997), y Oliveira, (1998) se enfocan en el uso de hormigas para reducir infestaciones de diferentes especies de insectos, entre estos *P. floricola*.

En el presente trabajo, se detecta la presencia de *P. floricola*, con ayuda de herramientas moleculares (código de barras del ADN), las cuales permitieron

discriminar estos insectos como pertenecientes a la especie *P. floricola* y no a la especie *P. longifila*, identificación que fue corroborada por Raymod Gagné quien es experto mundial en Cecidomyiidae. En Colombia no existen antecedentes sobre la presencia de este insecto, razón por la cual los análisis moleculares de los ejemplares de *P. floricola* analizados intentan contribuir a una mejor comprensión de su dinámica y genética poblacional.

La genética de poblaciones y los insectos plaga

Los resultados obtenidos de análisis de genética de poblaciones pueden contribuir a la formulación de estrategias de manejo de insectos plaga. La caracterización de la filogeografía, la estructura y diversidad genética contribuyen a esclarecer la dinámica de colonización y de expansión de las especies introducidas; además de contribuir a inferir el potencial que tiene una especie para convertirse en plaga, y las etapas de invasión en las cuales se debe prestar un manejo particular (Sakai, et al., 2001). Otro aporte que hace la genética de poblaciones radica en la identificación de poblaciones de origen y rutas de introducción de especies invasoras (Guillemaud, et al., 2011).

Uso de marcadores moleculares en el estudio de la dinámica de colonización de especies plaga

Los marcadores moleculares son útiles en el estudio de la estructura poblacional e inferencia de rutas de introducción de especies plaga. Por esta razón, pueden ser usados para inferir la diversidad genética en las poblaciones fundadoras, y al comparar con poblaciones nativas, se puede determinar la variación perdida durante eventos fundadores, y cuellos de botella generados en la colonización (Sakai, et al., 2001; Grapputo, et al., 2005). Igualmente, el uso de marcadores

moleculares con diferentes modos de herencia puede arrojar una mejor aproximación a la historia demográfica de las especies plaga (Grapputo, et al., 2005).

El ADN mitocondrial, como marcador molecular, es útil ante el fenómeno de múltiples introducciones y múltiples fuentes de origen de las poblaciones establecidas (Villablanca, et al., 1998). Entre las regiones mitocondriales empleadas para estudios filogenéticos, evolutivos y de caracterización poblacional en insectos, se encuentra el gen *Citocromo oxidasa I* (COI). El COI se ha propuesto como región de código de barras del ADN en metazoos (Hebert, et al., 2003; Jinbo, et al., 2011) tras el desarrollo de cebadores universales por parte de Folmer, et al., (1994). Dentro del genoma nuclear, la región ITS2 se ha propuesto, también, como región de código de barras del ADN, pues posee la variabilidad suficiente para distinguir entre especies cercanas e inclusive a niveles intraespecíficos (Ji, et al., 2003; Yao, et al., 2010).

Dentro de Cecidomyiidae, el COI ha sido usado en la caracterización poblacional de especies plaga de cultivos tales como *A. borrichia*, *A. yushimai*, *Contarinia sp.*, *D. oxycoccana*, *D. folliculi*, *Prodiplosis sp.* (Yukawa, et al., 2003; Dorchin, et al., 2009; Uechi, et al., 2011; Mathur, et al., 2012; Stokes, et al., 2012; Ortega, et al., 2014). El análisis de estos insectos con el código de barras del ADN ha permitido revelar la presencia de especies crípticas asociadas a la planta huésped o al aislamiento geográfico. Con este estudio buscó caracterizar molecularmente poblaciones colombianas de *P. floricola* mediante COI e ITS2; y de esta forma contribuir al conocimiento de su variabilidad genética, estructura de las poblaciones, flujo de genético, y posibles centros de origen de dispersión del insecto en el país, aspectos relevantes para el establecimiento de estrategias de manejo del insecto en el país.

HIPÓTESIS

Poblaciones de insectos invasores producto de un evento fundador presentan haplotipos similares derivados en general de un set reducido de individuos, se espera que las poblaciones encontradas de este insecto en Colombia sean producto de un evento fundador con un número de haplotipos reducidos para *COI* e *ITS2*.

OBJETIVO

Caracterizar molecularmente poblaciones colombianas de *P. floricola*, detectadas en cítricos, mediante código de barras del ADN (*COI*) y el espaciador interno *ITS2*

Objetivos específicos

- Describir la diversidad genética en poblaciones colombianas de *P. floricola*.
- Establecer si existe estructura genética entre las poblaciones del insecto establecidas en Colombia.
- Inferir patrones de dispersión para la especie partiendo de relaciones haplotípicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de insectos

Los ejemplares de *P. floricola* se obtuvieron durante el desarrollo del trabajo de investigación de Henández, (2014). El uso de los marcadores moleculares COI e ITS2 permitió la discriminación de esta especie separándola de la especie congénica *P. longifila*. La identificación de la especie se confirmó morfológicamente, con la colaboración del taxónomo Raymond Gagné, de acuerdo con Gagné, (1986). Se encontraron en total cuatro poblaciones de este insecto, establecidas en limón pajarito y limón tahití, en el Valle del Cauca, Huila y Antioquia.

Obtención de secuencias de las regiones COI e ITS2

La extracción de ADN genómico, cuantificación de ADN y amplificación de las regiones COI e ITS2; así como la secuenciación, edición y alineamiento de las secuencias se realizó según lo descrito en el capítulo 1.

Análisis de datos

Diversidad genética en las poblaciones colombianas de *P. floricola*

El total de haplotipos se obtuvo por medio de Alequin 3.11 (Excoffier, et al., 2005), tanto para COI como para ITS2. Estos haplotipos fueron depositados en la base de datos del GenBank (Ver tabla 1-1 del Capítulo 1), y empleando este mismo programa se calcularon los índices de diversidad genética para cada una de las cuatro poblaciones de *P. floricola* en Colombia.

Estructura genética y flujo genético de las poblaciones de *P. floricola*

Se estimó un análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las cuatro poblaciones de *P. floricola*, con el fin de inferir la diferenciación poblacional entre las mismas, para esto se usó Arlequin 3.11 (Excoffier, et al., 2005). Para determinar entre cuales poblaciones ocurría flujo genético, se estimó el F_{ST} y número de migrantes entre pares de poblaciones, empleando Arlequin 3.11 (Excoffier, et al., 2005).

Inferencia filogenética

Inferencia filogenética por el método de Máxima Verosimilitud

Las relaciones evolutivas entre los ejemplares de *P. floricola*, se estimaron por el método de máxima verosimilitud (MV), bajo el modelo Hasegawa, Kishino, y Yano (1985) con sitios invariantes (HKY+I) para la region COI; y bajo el modelo HKY para la región ITS2; empleando el programa Mega 6 (Tamura, et al., 2013). Como grupo externo se designaron dos ejemplares miembros de la familia Cecidomyiidae, *Dasineura sp.* y *P. longifila*, cuyas secuencias se obtuvieron, también, en la presente investigación.

Inferencia filogenética por Red de Haplotipos y determinación de haplogrupos

Se elaboró una red de haplotipos de COI, con el fin de inferir patrones de divergencia poblacional, y haplogrupos asociados a origen de procedencia, utilizando el método de median-joining network (Watterson & Guess, 1977; Posada & Crandall, 2001).

Estimación de distancias genéticas (Distancia K2P)

Con la finalidad de establecer la magnitud de las diferencias genéticas entre haplogrupos detectados por la inferencia filogenética, se estimaron las distancias genéticas entre grupos, e intragrupo, bajo el modelo de Kimura de dos parámetros empleando Mega 6 (Tamura, et al., 2013).

RESULTADOS

Diversidad genética en las poblaciones colombianas de *P. floricola*

36 ejemplares de cuatro poblaciones de los departamentos del Valle del Cauca, Huila y Antioquia, fueron analizados encontrándose diez haplotipos para COI, de estos ejemplares, y tres haplotipos para ITS2 (Ver tabla 1-1 del Capítulo 1). Debido al bajo número de haplotipos detectados con el marcador ITS2, las poblaciones fueron caracterizadas molecularmente con el marcador COI.

En el caso del marcador COI, de los diez haplotipos encontrados, el haplotipo H1 estuvo ampliamente distribuido en todas las poblaciones del insecto. Las poblaciones que presentaron mayor diversidad fueron Garzón (Huila) y Las Lajas (Valle del Cauca) con seis y cinco haplotipos respectivamente, mientras Támesis (Antioquia) presentó solo dos haplotipos H1 y H9, y se encontró al haplotipo H1 fijado en la población Palmira (Valle del Cauca) (Tabla 2-1; Figura 2-1(a)). Para el marcador ITS, de los tres haplotipos encontrados, el ITS2-B presentó una distribución en todas las poblaciones, y los otros dos fueron compartidos parcialmente entre Garzón, Las Lajas y Támesis, no se contó con secuencias de ejemplares de Palmira (Figura 2-1(b)).

Tabla 2-1. Caracterización de las poblaciones de *P. floricola*, empleando COI. (N) número de individuos, (NH) número de haplotipos, (DH) diversidad haplotípica, (π) diversidad nucleotídica.

Población	Coordenadas		Hospedero	N	Haplotipos	NH	DH	π
	N	W						
Palmira	3.508	-76.321	Limón tahití	3	H1	1	0	0
Las Lajas	4.402	-76.054	Limón tahití, limón pajarito	18	H1-H5	5	0.56	0.02
Garzón	2.234	-75.731	Limón tahití	10	H1,H6-10	6	0.84	0.03
Támesis	5.704	-75.679	Limón tahití	5	H1, H9	2	0.4	0.02

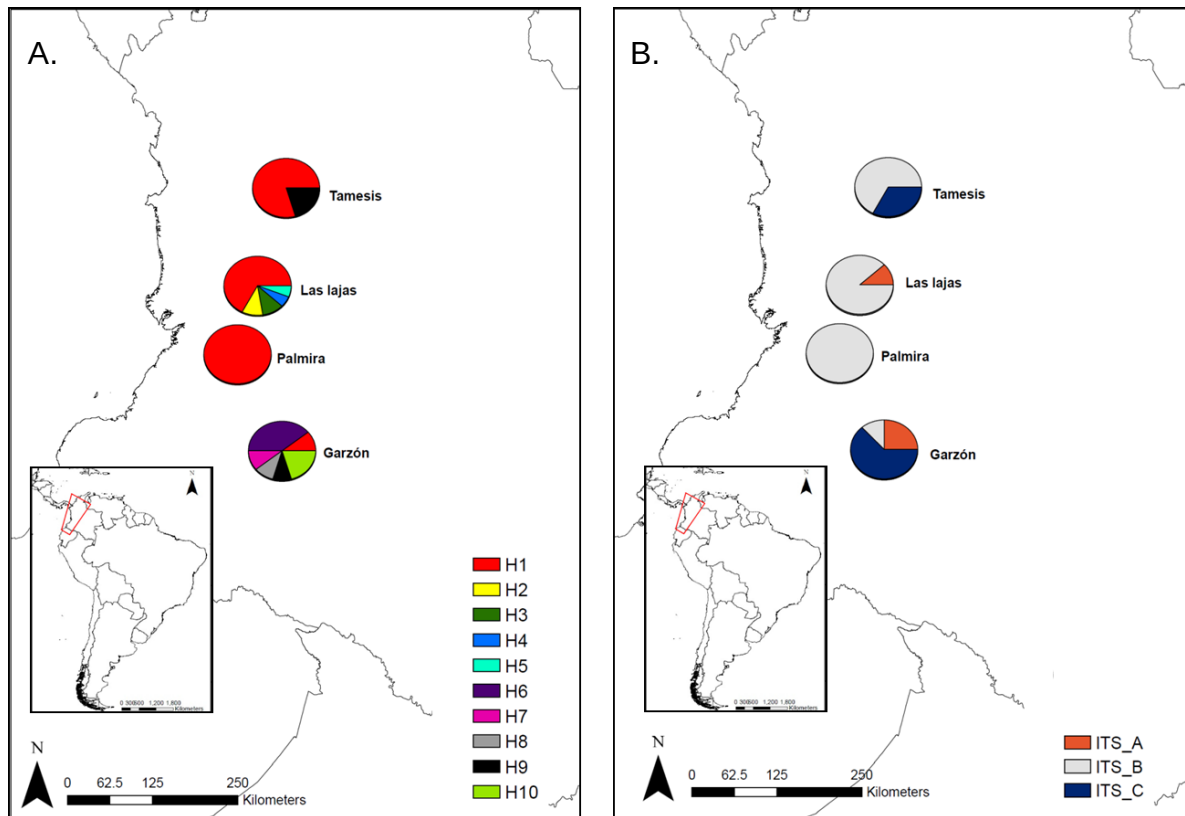


Figura 2-1. Distribución en Colombia de haplotipos de *P. floricola*. A. Haplotipos de COI. B. Haplotipos de ITS2.

Estructura genética y flujo genético de las poblaciones de *P. floricola*

Para determinar si existían diferencias entre las poblaciones de *P. floricola*, se realizó un análisis de varianza molecular. De acuerdo con este análisis (Tabla 2-2), si hay diferenciación genética, aunque baja, entre las poblaciones, lo que

puede deberse a la predominante presencia del haplotipo H1, mientras que los restantes nueve haplotipos H2-H10, son locales y de baja frecuencia. El mayor porcentaje de variación encontrado en el análisis es atribuible a las diferencias entre individuos dentro de las poblaciones bajo estudio (79.5%) (Tabla 2-2).

Para determinar la estructura genética entre pares de poblaciones, se estimaron los F_{ST} pareados y el número de migrantes (N_M). De acuerdo a los F_{ST} pareados (Tabla 2-3), La población Garzón, presentó una diferenciación baja respecto a Las lajas y Palmira, mientras que respecto a Támesis no se evidenció diferenciación. Las lajas, Palmira y Támesis no presentaron diferenciación poblacional entre ellas, lo que puede ser atribuible a la alta frecuencia de un haplotipo común (H1), entre estas poblaciones. El número de migrantes es alrededor de un migrante por generación entre Garzón y las restantes poblaciones, mientras que entre Las lajas, Palmira y Támesis el número de migrantes estimado indica un flujo genético alto (Tabla 2-3).

Tabla 2-2. Análisis de varianza molecular (AMOVA), 1000 permutaciones.

Fuente de variación	% variación	Fst	p-valor
Entre poblaciones	20.5	0.20497	< 0.05
Dentro de poblaciones	79.5		

Tabla 2-3. Inferencia de estructura poblacional para *P. floricola* en Colombia. En el área sobre la diagonal se indican el número de migrantes (N_M) entre poblaciones. Los valores de F_{ST} entre las poblaciones analizadas se indican en el área bajo la diagonal. En rojo se indican los valores de F_{ST} estadísticamente significativos (Valor-p < 0.05).

Población	1	2	3	4
1 Palmira		infinito	0.9329	infinito
2 Las lajas	-0.05445		1.36574	infinito
3 Garzón	0.34894	0.26799		1.39394
4 Támesis	-0.13208	-0.04548	0.264	

Inferencia filogenética por el método de Máxima Verosimilitud y Red de Haplotipos

Para reconstruir las relaciones filogenéticas entre los ejemplares de *P. floricola*, se realizaron análisis de Máxima verosimilitud (MV) para las secuencias obtenidas de COI e ITS2. Al analizar las secuencias mitocondriales estas no reflejaron estrictamente, una asociación de ejemplares por localidad de origen (Figura 2-2). Sin embargo, se evidenció que uno de los grandes clados se componía de ejemplares de Garzón y Las lajas en un 99%, mientras que el otro clado se compone principalmente, de ejemplares encontrados en Las lajas, Palmira, y Támesis. El árbol obtenido del análisis de MV para secuencias de ITS2 (Figura 2-2), no mostró un patrón de asociación de ejemplares por población de origen, las distancias genéticas entre estos haplotipos. Inferidas bajo el modelo K2P, son menores a 1% (0.3 -0.6%), el haplotipo ITS2-A se muestra como el haplotipo basal, el cual lo contienen ejemplares de Garzón y Las lajas.

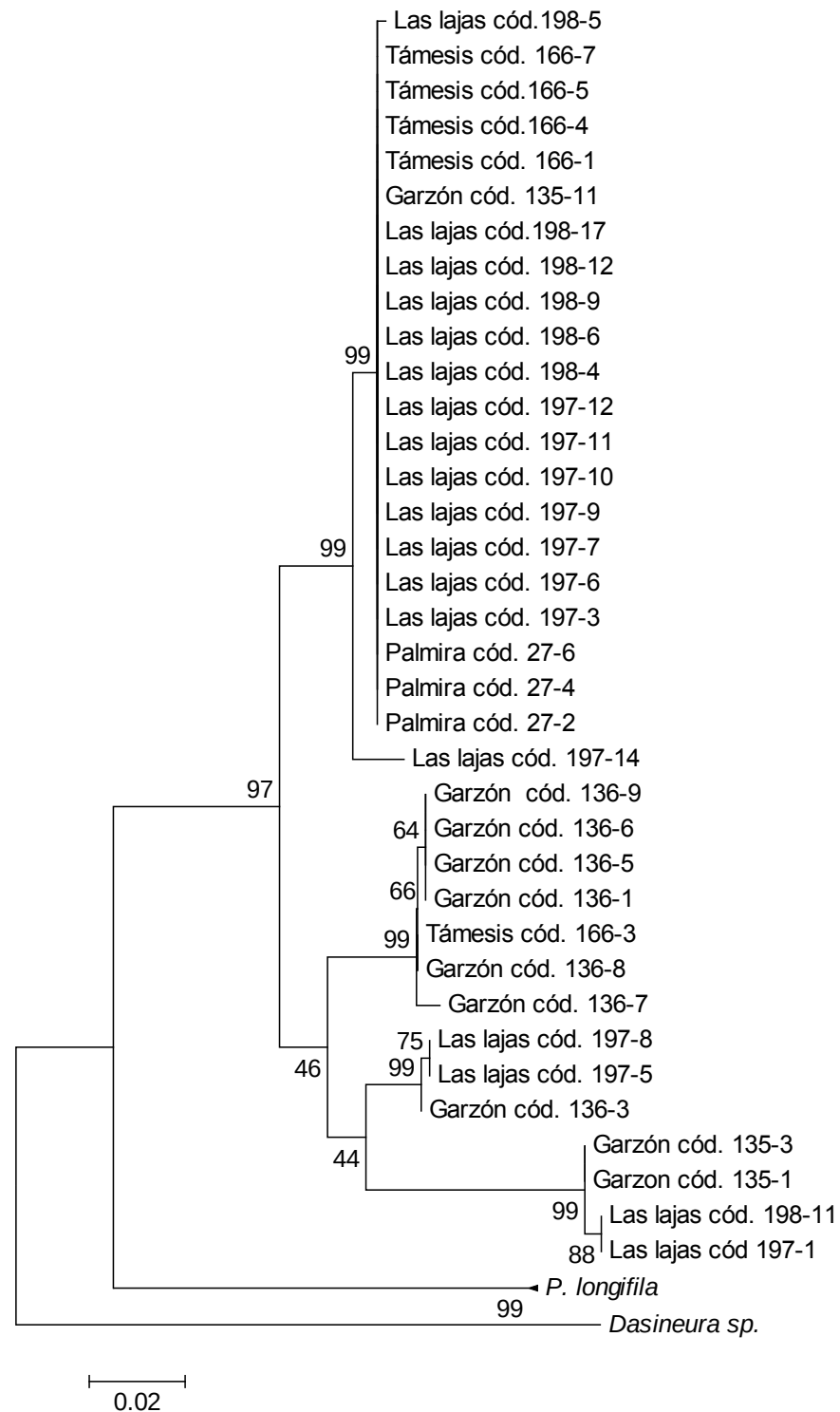


Figura 2-2. Árbol filogenético inferido por MV para especímenes de *P. floricola*, usando el marcador COI, modelo HKY+I. 1000 bootstrap.

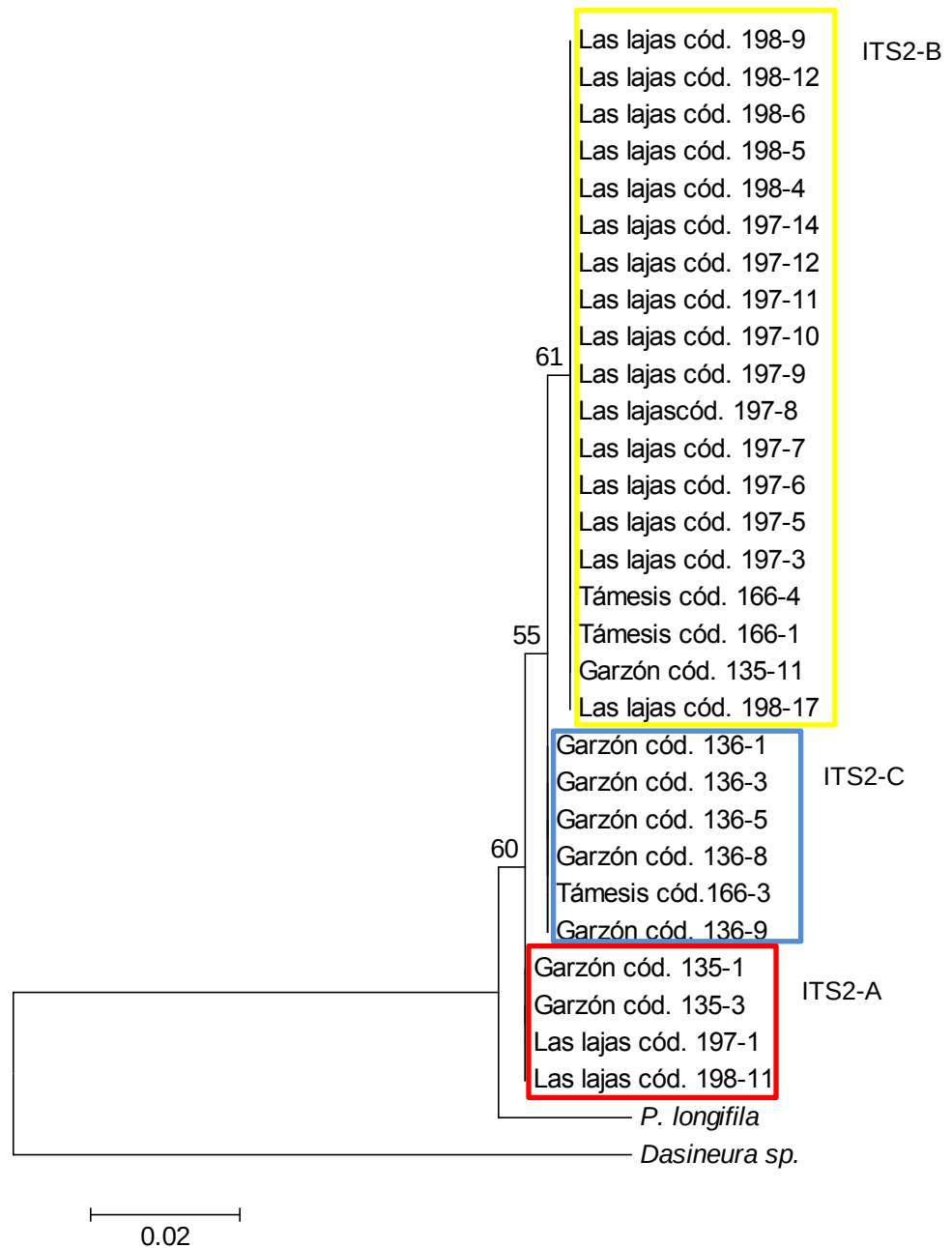


Figura 2-3. Árbol filogenético estimado con el método de MV para secuencias de ITS2 de *P. floricola*, bajo el modelo HKY. 1000 bootstrap.

La relación entre los haplotipos mitocondriales se determinó por medio de una red de haplotipos (Figura 2-4). Esta red indica una asociación entre cuatro haplogrupos cuya distancia genética intragrupo se encontró alrededor del 1%, y la distancia genética entre grupos estuvo entre el 3 y 6% (Tabla 2-4; 2-5)

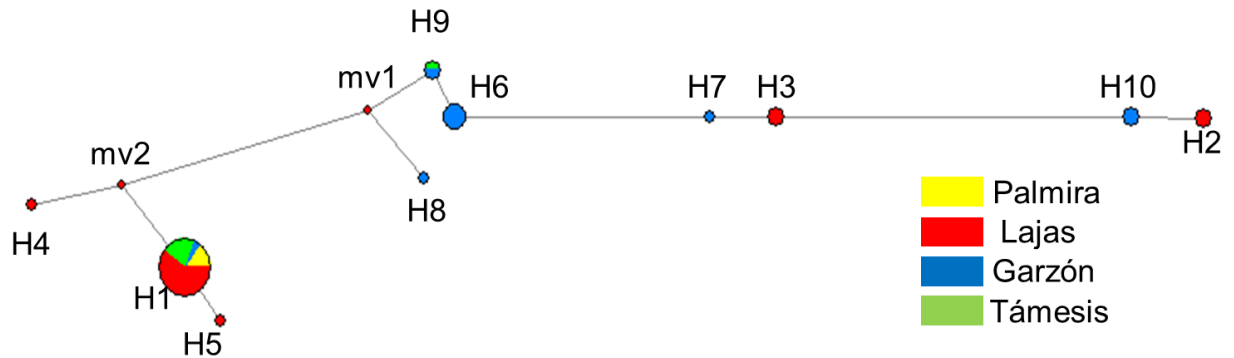


Figura 2-4. Red de haplotipos inferida por el método de median-joining, para 10 haplotipos de COI de *P. floricola*. Los haplotipos se representan por medio de círculos, los colores representan las poblaciones bajo estudio. El área de cada circunferencia es proporcional a la frecuencia de individuos por haplotipo.

Tabla 2-4. Distancias genéticas estimadas bajo el modelo K2P dentro de los haplogrupos inferidos por la red de haplotipos.

Haplogrupo	Haplotipos	Distancia	% Distancia
G1	H1, H4, H5	0.01	1.03
G2	H6, H8, H9	0.00	0.41
G3	H3, H7	0.00	0.15
G4	H2, H10	0.00	0.30

Tabla 2-5. Distancias genéticas entre haplogrupos, estimadas bajo el modelo K2P.

Grupos a comparar	Distancia	% Distancia
G 1 G 4	0.06	6.36
G 1 G 3	0.04	4.1
G 4 G 3	0.05	4.81
G 1 G 2	0.04	4.2
G 4 G 2	0.05	5.39
G 3 G 2	0.03	3.47

DISCUSIÓN

De acuerdo con Gagné, (2010), *P. floricola* se ha reportado en Estados Unidos y Brasil, y asociado a las especies vegetales *S. salicifolia*, *Clematis sp.*, y *C. brasiliense*. En Suramérica es una plaga secundaria asociada a *C. brasiliense* en Brasil. Los adultos del insecto ovopositan en los brotes florales de este hospedero y las larvas se alimentan principalmente de estos brotes (Oliveira, 1997; Carregaro, et al., 2009; Schoereder, et al., 2010; Demolin Leite, et al., 2012) En el presente estudio, *P. floricola*, se encontró asociada exclusivamente a limón tahití y limón pajarito, las larvas de *P. floricola* se alimentan de los brotes florales (Henández, 2014). Además, se encontró que las poblaciones de este insecto, en Colombia, comparten este recurso con poblaciones de la especie congénérica *P. longifila*.

Los resultados del presente estudio muestran mayor diversidad genética mitocondrial que nuclear, y la mayor diversidad genética a nivel mitocondrial es encontrada en las poblaciones Las lajas y Garzón, mientras que a nivel nuclear todos los haplotipos caracterizados para el marcador ITS2 se encuentran en Garzón. No encontrar diferenciación genética apreciable entre las poblaciones analizadas, con un intercambio de migrantes que aunque variable entre algunas poblaciones, es constante, puede indicar que este insecto se mueve entre sitios por medios naturales propios de la especie, como por acción de otros factores o agentes no naturales. Dada la poca capacidad de dispersión reportada para cecidómidos, en la que se indica que el viento es el principal medio natural de transporte de estos insectos (Pendleton & Teetes, 1994; Miao, et al., 2013), se puede sugerir que las poblaciones de *P. longifila* estudiadas, presentan dispersión antrópica. Este tipo de dispersión explicaría el flujo genético encontrado y la falta de estructura poblacional de las poblaciones de *P. floricola*. Además, las

poblaciones estudiadas no mostraron fragmentación, diferenciación por aislamiento geográfico y en los análisis filogenéticos no se evidenciaron clados atribuibles a núcleos de procedencia; pese a que las distancias geográficas entre dichas poblaciones están por encima de las distancias geográficas en las que cecidómidos como *C. sorghicola* y *S. mosellana* se han encontrado transportándose pasivamente (Pendleton & Teetes, 1994; Miao, et al., 2013).

Teniendo en cuenta la estructura de los árboles filogenéticos con secuencias de COI e ITS2, se observa que ejemplares de Garzón y las Lajas, aparecen como parte de los grupos basales que conforman el árbol; sin embargo, al comparar los resultados del árbol obtenido para COI, con la información obtenida de la red de haplotipos, se concluye que no es posible establecer un centro de origen que indique la procedencia de todos los haplotipos obtenidos. Al introducir organismos, mediante transporte antrópico, las poblaciones de estas especies logran establecer solo una fracción de la diversidad genética de la población de origen (Liebhold & Tobin, 2008), partiendo de estos eventos fundadores, se espera que las poblaciones derivadas presenten baja diversidad genética, sin embargo las poblaciones de *P. floricola* presentan 10 haplotipos mitocondriales, que no derivan de un haplotipo intermedio muestreado. Estos resultados sugieren que las poblaciones de *P. floricola* en Colombia son producto de múltiples introducciones.

Esta hipótesis es corroborada por las distancias genéticas obtenidas al comparar los cuatro haplogrupos identificados en la red de haplotipos mitocondriales. La presencia de haplotipos altamente diferenciados dentro de la misma población, sugiere que múltiples introducciones de diferentes fuentes han ocurrido recientemente, y el transporte antrópico es un factor relevante para el manejo de la proliferación y propagación de esta especie (Pérez-Portela, et al., 2013), en el contexto de estas poblaciones, diferentes introducciones pueden contribuir a incrementar la variación o diversidad genética contrarrestando efectos de cuellos

de botella generados en etapas tempranas de colonización. Las actividades antrópicas son uno de los factores que promueven y modulan invasiones en agricultura (Lockwood, et al., 2005), convirtiéndose en vectores de los organismos plaga, promoviendo la colonización de nuevos sitios geográficos, a la expansión geográfica de poblaciones fundadoras, y al flujo e intercambio genético entre poblaciones establecidas (Guillemaud, et al., 2011).

Debido a que muchas de las plagas en agricultura son invasores recientes, el uso de la genética de poblaciones en la inferencia de las rutas y formas de introducción es importante para formular estrategias de manejo de las plagas en los cultivos (Guillemaud, et al., 2011). La identificación de las rutas de introducción y de la población de origen de las plagas introducidas, puede aportar al conocimiento del ambiente biótico y abiótico al cual la plaga está adaptada, y a la caracterización de aspectos relevantes como susceptibilidad o resistencia de pesticidas de la población de origen, potenciales predadores y parasitoides de la plaga; contribuyendo al diseño de estrategias de control del organismo problema (Roderick & Navajas, 2003; Cox, 2004; Guillemaud, et al., 2011).

En el presente estudio, se contó con ejemplares de poblaciones colombianas, no se cuenta con una muestra representativa del rango de distribución de la especie, por lo que no es posible determinar el centro de origen de dispersión del insecto, y no es posible determinar cuáles son las poblaciones de origen de las introducciones de *P. floricola* en Colombia. Por lo anterior es necesario incluir en futuros estudios muestras de poblaciones en Estados Unidos, y Brasil, y de esta forma abordar hipótesis relacionadas a aspectos demográficos de la especie, e identificar rutas de introducción a tener en cuenta en planes de manejo de este insecto.

CONCLUSIONES

- El presente reporte de *P. floricola* en Colombia, colonizando cítricos, constituye un nuevo reporte de hospedero y de distribución para la especie.
- Se sugiere que en Colombia, *P. floricola* presenta dispersión antrópica y las poblaciones actuales son producto de múltiples introducciones.
- Se recomienda extender el estudio a poblaciones brasileras y estadounidenses de *P. floricola* para inferir rutas de introducción y aspectos de historia demográfica de la especie.

DISCUSIÓN GENERAL

Código de barras del ADN como herramienta en la definición del estatus taxonómico de *P. longifila*

El código de barras del ADN como iniciativa de Hebert, et al., (2003); presenta una metodología para definir la identificación y delimitación de especies que se basa en caracteres moleculares, particularmente la región COI en metazoos. En la presente investigación, un análisis de agrupamiento de las secuencias de COI e ITS2 de ejemplares identificados inicialmente por morfología como *P. longifila*, permitió revelar la presencia de la especie congénérica *P. floricola*, lo que fue corroborado por el taxónomo experto en el grupo Cecidomyiidae. Las distancias genéticas entre estas especies congénéricas fue de 11.6% para el marcador COI. Resultados similares se encuentran en otros géneros de Cecidomyiidae, como es el caso de *Dasineura*. Las especies congénéricas de *Dasineura* analizadas en el estudio de Mathur, et al., (2012), presentaron distancias interespecíficas derivadas de K2P entre el 7 y 22%.

De acuerdo con Yao, et al., (2010), la región ITS2 puede ser usada como un marcador universal para el código de barras del ADN, tanto en plantas como en animales; y como región complementaria al COI en la delimitación de especies en animales. Estos autores encontraron, en promedio, distancias genéticas (K2P), interespecíficas de 37.61%, e intraespecíficas de 5.22%, al analizar un set de datos de 28 géneros de diferentes órdenes de animales, con más de 20 especies cada género. En el presente estudio las especies *P. longifila* y *P. floricola* presentaron una distancia genética del 2.4%, bajo el mismo modelo para la región ITS2, estos valores más bajos de distancia genética se pueden deber a que en contraste con Yao, et al., (2010), solo se compararon especies congénéricas,

mientras que en el estudio realizado por estos autores se compararon especies de diferentes jerarquías taxonómicas incluyendo diferentes clases, ordenes, familias etc; y es esperado que las distancias genéticas incrementen a medida que se comparan especies pertenecientes a jerarquías superiores (Diferentes familias, ordenes, etc.).

En Suramérica se ha reportado la presencia de *P. longifila* en Perú, Ecuador, y Colombia, en solanáceas y asparagáceas; mientras que *P. floricola* se ha reportado en Brasil en *C. brasiliense* (Gagné, 1986; Oliveira, 1997; Gagné, 2010). En el presente estudio se encontró a las especies *P. longifila* y *P. floricola*, sobre cultivos de limón tahití y limón pajarito; en solanáceas, solo se encontró a *P. longifila*. El reporte de *P. longifila* sobre cítricos en Colombia, es el primer reporte de la especie sobre este hospedero en Suramérica; y el reporte de *P. floricola* sobre cítricos, constituye un reporte nuevo de hospedero para la especie. Pese a que las especies coexisten de forma simpátrica sobre cítricos, las poblaciones de *P. floricola* presentaron mayor diversidad de haplotipos y mayor distancia genética intraespecífica en comparación con *P. longifila* en este hospedero; sin embargo en ambos casos las relaciones entre haplotipos indican que las poblaciones de estos insectos son producto de múltiples introducciones, y no es posible identificar un centro de origen o un solo centro de diversificación para estas especies en cítricos en Colombia. Cabe resaltar que gracias a la rigurosa identificación morfológica realizada en adultos y las secuencias obtenidas para los marcadores COI e ITS2 en el presente estudio, es confiable la identificación de las especies *P. longifila* y *P. floricola* en estadios larvales y pupas sin necesidad de la obtención de adultos.

CONCLUSIONES GENERALES

- El código de barras del ADN, es una herramienta útil como complemento a identificación taxonómica morfológica de *P. longifila*.
- Tanto el marcador COI como el ITS2, permitieron la diferenciación de las especies congénicas, empleando análisis de agrupamientos sencillos que generaron clados discretos con valores de soporte de nodos cercanos a 100%.
- El marcador ITS2 es conservado en los cecidómidos bajo estudio, por lo que no es recomendable para investigaciones en genética de poblaciones de estos insectos, sin embargo es útil como complemento a la región COI como código de barras del ADN.

AGRADECIMIENTOS: A Raymond Gagné del United States Department of Agriculture, Agricultural research service (ARS-USDA) y a Jorge E. Peña del Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), University of Florida, Homestead, Florida USA. Al G.I. Estudios Ecogenéticos y de Biología Molecular, Universidad del Valle, al G.I. Interacciones Tri-tróficas, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. A la Universidad del Valle, la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y COLCIENCIAS, por la cofinanciación del Proyecto 1120-521 “DETERMINACIÓN DE BIOTIPOS EN *PRODIPLOSIS* Y PREDICCIÓN DE SU DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA EN COLOMBIA”. A COLCIENCIAS por Convocatoria 566-2012 programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores, No. del plan de trabajo: p-2012-2423 “DETERMINACIÓN DE BIOTIPOS EN EL TOSTÓN *Prodioplosis longifila* (DIPTERA: CECIDOMYIIDAE) EN COLOMBIA, MEDIANTE CÓDIGO DE BARRAS DEL ADN”.

LITERATURA CITADA:

- Alford, D. V., 2007. *Pest of Fruits Crops: A Colour Handbook*. United States of America: Academic Press, Elsevier.
- Bandelt, H.-J., Forster, P. & Röhl, A., 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), pp. 37-48.
- Berlocher, S. H. & Feder, J. L., 2002. Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy?. *Annual Review of Entomology*, Volumen 47, pp. 773-815.
- Bickford, D. y otros, 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, Volumen 22, pp. 148-155.
- Bolnick, D. I. & Fitzpatrick, B. M., 2007. Sympatric Speciation: Models and Empirical Evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, Volumen 38, p. 459-487.
- Brown, J. W., Miller, S. E. & Horak, M., 2003. Studies on New Guinea moths. Description of a new species of *Xenothictis* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae: Archipini). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, Issue 105, pp. 1043-1050.
- Bush, G. L., 1969. Mating behavior, host specificity, and the ecological significance of sibling species in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). *The American Naturalist*, Volumen 103, pp. 669-672.
- Bush, G. L., 1975. Modes of animal speciation. *Annual Reviews*, Volumen 6, pp. 339-364.
- Carregaro, J. B., Diniz, I. R., Hay, J. D. & Morais, H. C., 2009. Herbivorous insects in flower-buds of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae), with special emphasis on Lepidoptera. *Revista Brasileira de Zoociências*, 11(3), pp. 255-259.
- Chung, P., 2000. *Biology, behaviour and management of the gall midge complex on hot peppers*. Jamaica: Division of Technology, Training and Technical Information, Rural Agricultural Development Authority (RADA).
- 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*, Issue 22, pp. 252-271.
- Collins, F. H. & Paskewitz, S. M., 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, Volumen 5, p. 1-9.
- Cook, M. A., Ozeroff, S. N., Fitzpatrick, S. M. & Roitberg, B. D., 2011. Host-associated differentiation in the reproductive behaviour of cecidomyiid midges on cranberry and blueberry. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, Volumen 141, pp. 8-14.
- Cox, G. W., 2004. *Alien Species and Evolution*. Washington: Island Press.
- Demolin Leite, G. L. y otros, 2012. SEASONAL ABUNDANCE OF HEMIPTERANS ON CARYOCAR BRASILIENSE (MALPIGHIALES: CARYOCARACEAE) TREES IN THE CERRADO. *Florida Entomologist*, 95(4), pp. 862-872.
- Dent, D., 2000. *Insect Pest Management*. 2a ed. s.l.:CABI Publishing.
- Dorchin, N. y otros, 2009. Behavioural, ecological and genetic evidence confirm the occurrence of host-associate differentiation in goldenrod gall-midges. *Journal of Evolutionary Biology*, Volumen 22, pp. 729-739.

- Drès, M. & Mallet, J., 2002. Host Races in Plant-Feeding Insects and Their Importance in Sympatric Speciation. *Biological Sciences*, 357(1420), pp. 471-492.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, Volumen 1, pp. 47-50.
- Folmer, O. y otros, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, Volumen 3, pp. 294-299.
- Gagné, R. J., 1986. Revision of Prodiplosis (Diptera: Cecidomyiidae) with descriptions of three new species. *Annals of the Entomological Society of America*, Volumen 79, pp. 235-245.
- Gagné, R. J., 1994. *The Gall Midges Of The Neotropical Region*. United States of America: Cornell University Press.
- Gagné, R. J., 2010. *Update for A catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. Version digital 1..* [En línea]
Available at:
http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12754100/Gagne_2010_World_CatalCa_Cecidomyiidae.pdf
[Último acceso: 20 Abril 2015].
- Gagné, R. J. & Solinas, M., 1996. The Rondani Cecidomyiidae (Diptera). *Insecta Mundi*, Volumen 10, pp. 69-76.
- Gallego, D. & Galián, J., 2001. The internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of the rDNA differentiates the bark beetle forest pests *Tomicus destruens* and *T. piniperda*. *Insect Molecular Biology*, 10(5), pp. 415-420.
- 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), pp. 1128-1132.
- Grapputo, A. y otros, 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology*, 14(14), pp. 4207-4219.
- Guillemaud, T., Ciosi, M., Lombaert, E. & Estoup, A., 2011. Biological invasions in agricultural settings: insights from evolutionary biology and population genetics. *Comptes Rendus Biologies*, 3(334), pp. 1-29.
- Hackett, B. J. y otros, 2000. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and undercover a cryptic taxon. *Insect Molecular Biology*, 9(4), pp. 369-374.
- Haddad, R. & Pozo, M., 1994. Morfología y comportamiento de Prodiplosis sp. en papa *Solanum tuberosum*. XXXVI Convención Nacional de Entomología, p. 17.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, Volumen 41, pp. 95-98.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, Volumen 270, pp. 313-321.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. & Francis, C. M., 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS One*, 2(10), pp. 1657-1663.

- Hebert, P. D. & Ryan, G., 2005. The Promise of Barcoding for Taxonomy. *Society of Systematic Biologists*, 5(54), pp. 852-859.
- Henández, L. M., 2014. *Caracterización del daño y distribución geográfica de Cecidomyiidae (Diptera) y sus parasitoides asociados a Solanáceas y Limón tahití en Colombia*, Palmira: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- Hwang, J., Yoon, T., Suh, K. & Bae, Y., 2013. Molecular phylogeny evidence of altitudinal distribution and habitat adaptation in Korean Ephemera species (Ephemeroptera: Ephemeridae). *Entomological Research*, Issue 43, pp. 40-46.
- Jaramillo, J. y otros, 2007. Manual Técnico: Buenas prácticas agrícolas en la producción de Tomate bajo condiciones protegidas. *CORPOICA. Gobernación de Antioquia, Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias*, p. 314.
- Jinbo, U., Kato, T. & Ito, M., 2011. Current progress in DNABarcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*, Volumen 14, pp. 107-124.
- Ji, Y.-J., Zhang, D.-X. & He, L.-J., 2003. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*, Volumen 3, pp. 581-585.
- Kocher, T. D. y otros, 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*, 16(86), pp. 6196-6200.
- Liebholt, A. M. & Tobin, P. C., 2008. Population Ecology of Insect Invasions and Their Management. *Annual Review of Entomology*, Issue 53, p. 387-408.
- Li, Y. y otros, 2011. Population structure and colonization of *Bractrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in China, inferred from mtDNA COI sequences. *Journal of Applied Entomology*, Issue 136, pp. 241-251.
- Lockwood, J. L., Cassey, P. & Blackburn, T., 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, Issue 20, p. 223-228.
- 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*, 3(5), pp. 153-165.
- Malausa, T. y otros, 2011. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Applied Entomology*, Issue 135, pp. 142-155.
- Marinucci, M. y otros, 1999. Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the maculipennis complex inferred from ITS2 sequence analysis. *Insect Molecular Biology*, 8(4), pp. 469-480.
- Mathur, S., Cook, M. A., Sinclair, B. J. & Fitzpatrick, S. M., 2012. DNA Barcodes Suggest Cryptic Speciation in *Dasineura oxycoccana* (Diptera: Cecidomyiidae) on Cranberry, *Vaccinium macrocarpon*, and Blueberry, *V. corymbosum*. *Florida Entomologist*, 95(2), pp. 387-394.
- Miao, J. y otros, 2013. Long-Distance Wind-Borne Dispersal of *Sitodiplosis mosellana* Géhin (Diptera:Cecidomyiidae) in Northern China. *Journal of Insect Behavior*, 26(1), pp. 120-129.
- Musters, D. K., Collins, F. H., Brandling-Bennett, A. D. & Were, J. O., 1990. Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *The EMBO Journal*, Volumen 9, pp. 3989-3996.

- Mutanen, M. y otros, 2012. DNA barcodes reveal that the widespread European tortricid moth *Phalonidia manniana* (Lepidoptera: Tortricidae) is a mixture of two species. *Zootaxa*, Issue 3262, pp. 1-21.
- Oliveira, P. S., 1997. The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology*, Issue 11, pp. 323-330.
- Oliveira, P. S., 1998. Interaction Between Ants and Plants Bearing Extrafloral Nectaries in Cerrado Vegetation. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 2(27), pp. 161-176.
- Ortega, E. y otros, 2014. Molecular identification of gall midge *Prodiplosis* sp. Gagné in *Asparagus officinalis* L. crops by partial amplification of the gene cytochrome oxidase I. *Idesia (Chile)*, 32(4), pp. 29-41.
- Peakall, R. & Smouse, P. E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update.. *Bioinformatics*, Volumen 19, pp. 2537-2539.
- Pendleton, B. B. & Teetes, G. L., 1994. Sorghum midge dispersal from sorghum. *Southwestern Entomologist*, 19(1), pp. 1-9.
- Peña, J. E., Gagné, R. & Duncan, R., 1989. Biology and characterization of *Prodiplosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae) on lime in Florida. *The Florida Entomologist*, Volumen 72, pp. 444-450.
- Peña, J. E. & Mead, F. W., 1998a. Citrus gall midge, *Prodiplosis longifila* (Gagné). *University of Florida Extension Document EENY*, Volumen 5, p. 2.
- Peña, J. E. & Mead, F. W., 1998b. Featured creatures, citrus gall midge, *Prodiplosis longifila* (Gagné). *University of Florida and Florida Department of Agriculture and Consumer Services*..
- Pérez-Portela, R., Arranz, V., Rius, M. & Turon, X., 2013. Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities. *Scientific Reports*, 3(3197), pp. 1-10.
- Posada, D. & Crandall, K. A., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, Volumen 16, pp. 37-45.
- Robert, E. C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, Volumen 32, pp. 1792-1797.
- Roderick, G. K. & Navajas, M., 2003. Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Reviews*, Issue 4, pp. 889-898.
- Ruiz, F. y otros, 2010. Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Volumen 105, pp. 899-903.
- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S. & Lodge, D., 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Issue 32, pp. 305-332.
- Santos, A., Besnard, G. & Quicke, D. L., 2011. Applying DNA barcoding for the study of geographical variation in host-parasitoid. *Molecular Ecology Resources*, Volumen 11, pp. 46-59.
- Saraste, M., 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 4(23), pp. 331-336.
- Schoereder, J. H. y otros, 2010. The arboreal ant community visiting extrafloral nectaries in the Neotropical cerrado savanna. *Terrestrial Arthropod Reviews*, Volumen 3, pp. 3-27.

- Smith, M. A. y otros, 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Issue 103, pp. 3657-3662.
- Stireman, J. O., Nason, J. D. & Heard, S. B., 2005. Host-associated genetic differentiation in phytophagous insects: general phenomenon or isolated exceptions? evidence from a goldenrod-insect community. *Evolution*, 59(12), pp. 2573-2587.
- Stokes, K., Stiling, P., Gilg, M. R. & Rossi, A. M., 2012. The gall midge *Asphondylia borrichiae* (Diptera: Cecidomyiidae): An indigenous example of host-associated genetic divergence in sympatry. *Environmental Entomology*, Volumen 41, pp. 1246-1254.
- Tamura, K. y otros, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.. *Molecular Biology and Evolution*, Volumen 30, pp. 2725-2729.
- Thomas, Y. y otros, 2003. Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. I. sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. *Society for the Study of Evolution*, Volumen 57, pp. 261-273.
- Turelli, M., Barton, N. H. & Coyne, J. A., 2001. Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, Volumen 16, pp. 330-343.
- Uechi, N. y otros, 2011. New information on host plants and distribution ranges of an invasive gall midge, *Contarinia maculipennis* (Diptera: Cecidomyiidae), and its congeners in Japan. *Applied Entomology and Zoology*, Issue 46, pp. 383-389.
- Valarezo, O., Cañarte, E., Navarrete, B. & Arias, M., 2003. *Prodiplosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae) principal plaga de tomate en Ecuador. *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias*, p. 95.
- Ventura, L. & Ayquipa, G., 1999. *Ciclo biológico y aspecto del comportamiento de Prodiplosis longifila en espárrago cultivado en Virú, Trujillo*. Tumbes, Perú, s.n., p. 29.
- Via, S., 1999. Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. Gene flow restriction and habitat choice. *Evolution*, Volumen 53, pp. 1446-1457.
- Via, S., 2001. Sympatric speciation in animals: the Ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7), pp. 381-389.
- Villablanca, F. X., Roderick, G. K. & Palumbi, S., 1998. Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Molecular Ecology*, Issue 7, p. 547-560.
- Walker, T. J., 1964. Cryptic species among sound-producing Ensiferan Orthoptera (Gryllidae and Tettigoniidae). *The Quarterly Review of Biology*, Volumen 39, pp. 345-355.
- Walton, C. y otros, 2007. Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. *Infection, Genetics and Evolution*, Volumen 7, pp. 93-102.
- Watterson, G. A. & Guess, H. A., 1977. Is the most frequent allele the oldest. *Theoretical Population Biology*, Volumen 11, pp. 141-160.
- Yao, H. y otros, 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *Plos One*, 5(10), pp. 1-9.
- Yukawa, J., Uechi, N., Horikiri, M. & Tuda, M., 2003. Description of the soybean pod gall midge, *Asphondylia yushimai* sp. n. (Diptera: Cecidomyiidae), a major pest of soybean and findings of host alternation. *Bulletin of Entomological Research*, Issue 93, pp. 73-86.