

Aproximación a la filogenia de *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) con el uso de un fragmento del gen de la citocromo oxidasa I (COI)

Clara Inés Saldamando^{1, 2} & Edna Judith Marquez^{1, 3}

1. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biociencias, UNALMED, Calle 59A No 63-20. Medellín, Colombia. Edificio 11-208; cisaldam@unal.edu.co
2. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Corporación para Investigaciones Biológicas CIB-UNALMED, Cra 72 No 78B-141. Medellín, Colombia.
3. Universidad Nacional de Colombia, Grupo de investigación en Biotecnología Animal, UNALMED, Calle 59A No 63 - 20. Medellín, Colombia. Edificio 11-208; ejmarque@unal.edu.co

Recibido 11-VII-2011. Corregido 16-I-2012. Aceptado 08-II-2012.

Abstract: Approach to *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) phylogeny based on the sequence of the cytochrome oxidase I (COI) mitochondrial gene. The genus *Spodoptera* includes 30 species of moths considered important pests worldwide, with a great representation in the Western Hemisphere. In general, Noctuidae species have morphological similarities that have caused some difficulties for assertive species identification by conventional methods. The purpose of this work was to generate an approach to the genus phylogeny from several species of the genus *Spodoptera* and the species *Bombyx mori* as an out group, with the use of molecular tools. For this, a total of 102 *S. frugiperda* larvae were obtained at random in corn, cotton, rice, grass and sorghum, during late 2006 and early 2009, from Colombia. We took ADN samples from the larval posterior part and we analyzed a fragment of 451 base pairs of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI), to produce a maximum likelihood (ML) tree by using 62 sequences (29 Colombian haplotypes were used). Our results showed a great genetic differentiation (K2 distances) amongst *S. frugiperda* haplotypes from Colombia and the United States, condition supported by the estimators obtained for haplotype diversity and polymorphism. The obtained ML tree clustered most of the species with bootstrapping values from 73-99% in the interior branches; with low values also observed in some of the branches. In addition, this tree clustered two species of the Eastern hemisphere (*S. littoralis* and *S. litura*) and eight species of the Western hemisphere (*S. androgea*, *S. dolichos*, *S. eridania*, *S. exigua*, *S. frugiperda*, *S. latifascia*, *S. ornithogalli* and *S. pulchella*). In Colombia, *S. frugiperda*, *S. ornithogalli* and *S. albula* represent a group of species referred as “the *Spodoptera* complex” of cotton crops, and our work demonstrated that sequencing a fragment of the COI gene, allows researchers to differentiate the first two species, and thus it can be used as an alternative method to taxonomic keys based on morphology. Finally, the ML tree did not cluster *S. frugiperda* with *S. ornithogalli*, suggesting that both species do not share the same recent ancestral even though they coexist in cotton. We suggest sequencing other genes (mitochondrial and nuclear) to increase our understanding of this genus evolution. Rev. Biol. Trop. 60 (3): 1237-1248. Epub 2012 September 01.

Key words: phylogeny, *Spodoptera*, cryptic species, gene COI.

El género *Spodoptera* Guenee, 1852 (Noctuidae: Amphipyryinae) está compuesto por un grupo de especies de polillas consideradas plagas de gran impacto económico, ya que se alimentan de cultivos de maíz, algodón, sorgo, arroz, pastos y maní, entre otros (Passoa 1991, Pogue 2002). La mayoría de sus especies,

se encuentran distribuidas en el hemisferio occidental (Pogue 2002), aunque algunas de ellas se encuentran en el hemisferio oriental (Heppner 1998). Entre las especies más conocidas en el continente Americano se encuentran: *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *S. ornithogalli* (Guenee), *S. albula* (Walker), *S.*

exigua (Hübner), *S. eridania* (Stoll), *S. androgea* (Stoll), *S. latifascia* (Walker), *S. dolichos* (Fabricius), *S. pulchella* (Herrich-Schäffer), y en África y el Mediterráneo las especies: *S. litura* (Fabricius) y *S. littoralis* (Boisduval) (Brown & Dewhurst 1975). Todas estas polillas han sido reconocidas por representar “especies crípticas”, debido a que su morfología externa es muy similar a nivel de la larva y el adulto. Por ejemplo, *S. frugiperda*, *S. ornithogalli* y *S. albula* son especies crípticas reconocidas como el complejo *Spodoptera* del cultivo de algodón (Santos-Amaya *et al.* 2009) dada la gran similitud morfológica de sus larvas en sus primeros estadios larvales y representan especies simpátricas en el departamento del Tolima en Colombia.

Las especies de la familia Noctuidae, entre las que se incluyen especies del género *Spodoptera*, se caracterizan por presentar dificultad en la identificación bien sea por medio de caracteres morfológicos con el uso de su morfología (Yela & Kitching 1999) y/o su composición molecular (Wagner 2001, Mitchell *et al.* 2006). Por ello, su evolución no ha presentado una divergencia bien establecida. Muchas de estas especies pueden compartir haplotipos plesiomórficos o ancestrales ya que todavía no han tenido suficiente tiempo evolutivo para generar mutaciones autapomórficas (Mitchell *et al.* 2006).

Uno de los trabajos más recientes sobre la filogenia de la superfamilia Noctuidae fue realizado por Mitchell *et al.* (2006). En este trabajo, los autores utilizaron secuencias de dos genes nucleares: el factor de elongación (EF-1 α , un fragmento de 1 200 [base pairs] bp) y la dopa decarboxilasa (DDC, un fragmento entre 700-1 100 [base pairs] bp), con el fin de establecer las relaciones filogenéticas de las familias de los nóctuidos. Ellos encontraron que la mayoría de las ramas del árbol construido con el algoritmo de máxima verosimilitud (ML) tenían valores de bootstrapping entre 50-80% de soporte. Este árbol se afectó por la ubicación de la familia Noctuidae como grupo parafilético de las familias Arctiidae y Lymantriidae y todas las familias quadrifinas (las

cuales presentan este tipo de venación, vena MA2, en las alas posteriores). Por otro lado, un trabajo sobre la filogenia de los nóctuidos basada en la morfología de adultos y larvas de esta superfamilia realizado por Yela & Kitching (1999) también generó agrupaciones con problemas en el establecimiento de las relaciones monofiléticas para los nóctuidos. Estos autores, al igual que Mitchell *et al.* (2006) argumentan que una de las dificultades en establecer la filogenia de esta familia, es la gran cantidad de especies existentes en la misma, debido a que tiene alrededor de 25 000 (Wagner 2001). Además, estas especies tienen una gran disparidad morfológica y gran homogeneidad en cuanto su patrón básico de reconocimiento, produciendo muchas homoplasias. Yela & Kitching (1999) concluyen en su trabajo que para mejorar el análisis filogenético de esta familia, se requiere el uso de caracteres morfológicos de sus larvas y adultos, en conjunto con el uso de marcadores moleculares y de la historia de vida (biología). Estos autores además, apoyan la importancia de establecer la filogenia de estas polillas, dada su relevancia dentro de un contexto ecológico (por su gran diversidad) y uno agronómico (por ser plagas importantes de cultivos). La idea de Yela & Kitching (1999) también es apoyada por Mitchell *et al.* (2006) ya que ellos enfatizan la necesidad de esclarecer la filogenia de este grupo combinando herramientas de la morfología y de la biología molecular particularmente porque ellos encontraron que la asociación de estas polillas hacia su planta hospedera tiene una relación latitudinal, lo cual se puede analizar a gran escala con el uso de herramientas moleculares.

Dada la importancia de la biología molecular como apoyo para mejorar el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas de los nóctuidos, y en particular de las relaciones ancestro descendiente de *Spodoptera* sp., el objetivo de este estudio fue realizar una filogenia de algunas especies del género *Spodoptera* con el uso de la secuenciación de un fragmento del gen de la citocromo oxidasa I (COI) como una primera aproximación del establecimiento de las relaciones filogenéticas existentes entre

las especies de este género que ya han sido secuenciadas para este gen y cuya base de datos se encuentra en el Genbank. El uso del gen COI en este trabajo presenta varias ventajas dentro de las cuales se encuentran (Freeland 2005): a) el ADN mitocondrial es fácil de aislar, dada su alta abundancia en las células, b) este ADN presenta herencia materna y por lo tanto ausencia de recombinación que permite establecer una historia evolutiva del grupo taxonómico a estudiar, c) tiene altas tasas de mutación en diferentes partes de la molécula, d) la respiración celular ha sido muy estudiada y por lo tanto la actividad del gen COI muy conocida, e) su estructura y tamaño es muy conservada en todos los organismos aeróbicos, f) este ADN presenta regiones altamente conservadas seguidas de unas regiones altamente variables que permiten estudiar la diferenciación genética entre poblaciones de una misma especie y entre especies de un mismo género, y g) tiene gran aplicabilidad en una gran cantidad de insectos (Lunt *et al.* 1996, Freeland 2005). Sin embargo, para llevar a cabo un estudio filogenético de un grupo, lo ideal es utilizar secuencias de varios genes mitocondriales y nucleares, debido a que en muchos casos la interpretación de la evolución de un grupo taxonómico puede ser afectada más por la tasa evolutiva del gen analizado, que por la evolución real de este grupo (Freeland 2005) y muchos de los trabajos en insectos y particularmente, Lepidopteros tienen en cuenta el gen nuclear del factor de elongación y los genes mitocondriales COI y COII para el establecimiento de filogenias en lepidopteros. Ejemplos de esto son: las polillas del género *Copitarsia* (Lepidoptera: Noctuidae) (Pogue & Simmons 2008), las mariposas del género *Byclychus* (Kirby 1871) (Monteiro & Pierce 2001), de las polillas del género *Eois* (Geometridae) (Strutzenberger *et al.* 2010) entre otras especies. Por esta razón, los resultados obtenidos en este estudio deben ser vistos como una aproximación, más que como una resolución total de las relaciones evolutivas de algunas de las especies de *Spodoptera*, puesto que presentan gran similitud

morfológica, pero diferenciación genética entre ellas (Mitchell *et al.* 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y recolectas: Un total de 1 652 larvas de *S. frugiperda* fueron recolectadas al azar en cultivos de maíz, algodón, arroz, pasto y sorgo, a finales del 2006 y principios del 2009, en los departamentos de Tolima, Córdoba, Meta, Antioquia y Valle del Cauca en Colombia para el desarrollo de análisis de estructura poblacional del insecto en Colombia. Las recolectas se hicieron de larvas y no de adultos, debido a que se deseaba determinar si los haplotipos de *S. frugiperda* presentaban algún tipo de asociación con estos cultivos.

Una vez recolectadas, las larvas fueron almacenadas en tubos de plástico de 1.5mL con etanol al 70%, etiquetados con el lugar de recolección y planta hospedera, y enviadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal UNAL-MED-CIB (Corporación para Investigaciones Biológicas) en donde fueron almacenadas al vacío a -70°C hasta su procesamiento. De estas larvas, Salinas (2010) identificó un 10% de sus individuos con el uso de las claves de Tood & Poole (1980). Dentro de algunas de las características que permitieron la correcta identificación de esta especie se encuentran la presencia de propatas desde el segmento abdominal A3-A6, *crochets* presentes, tres setas en el grupo SV en la propata del segmento abdominal 6 (A6), cuerpo liso o cubierto con gránulos convexos o cónicos, espiráculo en el segmento abdominal 8 (A8) ubicado lateralmente y margen posterior del lóbulo anal convexo, no lobulado o sin tubérculos, entre otras.

Extracción de ADN mitocondrial: Un fragmento de la parte posterior de las larvas fue utilizado por Salinas (2010) para la extracción de ADN en 102 muestras, la cual se llevó a cabo con el protocolo CTAB con las modificaciones (Black & Duteau 1997) que aparecen a continuación: Cada fragmento fue homogenizado con nitrógeno líquido y depositado en un tubo eppendorf de 1.5mL, se adicionó 400µL

de buffer de extracción CTAB (2X), 4 μ L de β -mercaptoetanol y 20 μ L de Proteinasa K. Cada tubo fue incubado por 1hr a 65 $^{\circ}$ C y mezclado por inversión suave cada 10min. Cada muestra fue centrifugada por 6min a 12 000rpm a 10 $^{\circ}$ C, y luego la solución fue transferida a un nuevo tubo. A cada tubo se le agregaron 500 μ L de cloroformo alcohol-isoamílico frío (24:1) y fue centrifugado por 30min a 12 000rpm a 10 $^{\circ}$ C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y el procedimiento se repitió con un volumen igual de cloroformo alcohol-isoamílico y fue centrifugado nuevamente por 30min a 12 000rpm a 10 $^{\circ}$ C. El nuevo sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, se adicionó un volumen equivalente de cloroformo frío (100%) y se centrifugó por 20min a 12 000rpm a 10 $^{\circ}$ C. El sobrenadante resultante fue transferido a otro tubo y se adicionó 400 μ L de isopropanol puro frío. El ADN fue precipitado por refrigeración a -20 $^{\circ}$ C por 1hr y luego centrifugado por 30min a 12 000 rpm a 4 $^{\circ}$ C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado con 500 μ L de etanol frío (100%) y centrifugado por 6min a 12 000rpm a 4 $^{\circ}$ C; este procedimiento se repitió y el pellet fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 50 μ L de buffer TE (1X) (TRIS HCL 100mM y EDTA 10mM, pH 8.0). Finalmente, el RNA fue removido adicionando 1 μ L de RNasa e incubando a 37 $^{\circ}$ C por 1hr.

Amplificación y secuenciación del gen citocromo oxidasa I-COI: La amplificación por PCR del gen COI fue realizada por Salinas (2010) en una mezcla de reacción de 50 μ L que contenía 5 μ L de buffer de PCR, 3 μ L de MgCl₂, 1 μ L de dNTPs, 2 μ L del cebador sentido, 2 μ L del cebador contra sentido y 1 μ L de Taq polimerasa. El programa de amplificación en termociclador fue: 94 $^{\circ}$ C (3min), seguido de 30 ciclos de 94 $^{\circ}$ C (1min) 59 $^{\circ}$ C (1min), 72 $^{\circ}$ C (1min), y un segmento final de extensión de 72 $^{\circ}$ C por 10min (My Cycler Termal Cycler, Biorad). La amplificación del COI se llevo a cabo con el par de cebadores JM76 F (5'GAGCTGAATTAGGRACCTCCAGG3') y COI 1483 R (5'GCTGGTGGTAAATTTT-GATAT3') (Invitrogen). Cada producto

amplificado fue visualizado en una cámara de electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 2.0 μ L de bromuro de etidio. Las muestras fueron enviadas a Macrogen Inc. (Corea del Sur) para su posterior purificación y secuenciación.

Análisis de secuencias: El Genbank tiene almacenadas 105 secuencias del género *Spodoptera* de un fragmento del gen de la citocromo oxidasa I (COI), sin embargo 34 fueron tomadas en cuenta en este trabajo (Cuadro 1), debido a que muchas representaban un mismo haplotipo de una especie. A estas se le adicionaron 29 secuencias de *S. frugiperda* de Colombia que representaron haplotipos diferentes de la especie, identificados con la distancia genética de Kimura dos parámetros (α =transiciones y β =transversiones) (Nei & Kumar 2000). Estas 62 secuencias fueron tenidas en cuenta para establecer el grupo interno del árbol filogenético y como grupo externo se tomó la secuencia del gen COI del gusano de seda *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae).

Todas las secuencias fueron editadas a mano con Bioedit (Hall 1999) y alineadas con el algoritmo Clustal W (Larkin *et al.* 2007, Chenna *et al.* 2003) en el programa Mega 5.0 (Tamura *et al.* 2011). Adicionalmente, el modelo de evolución nucleotídica también fue obtenido con este programa. El nivel de entropía de la secuencia, fue evaluado con Bioedit (Hall 1999). Este estimador fue utilizado para determinar si la variación nucleotídica del fragmento del gen COI era constante. Las comparaciones de las secuencias de ADN que incluyeron la identificación de los haplotipos (H), sitios polimórficos (p =lugares en la secuencia en la que ocurrió el polimorfismo), sitios segregantes (s =número de sitios variables en todo un grupo de secuencias), diversidad nucleotídica $\Pi=\pi/L$, π =promedio de las diferencias nucleotídicas entre dos secuencias elegidas al azar de una población, L =longitud de la secuencia (Nei & Li 1979), polimorfismo nucleotídico $\theta=s/\alpha$ número de sitios nucleotídicos segregantes "s" en una muestra de " α " número de secuencias (Watterson 1975) y test de neutralidad de $D_{Tajima}=\pi-(s/\alpha/(V([\pi-(s/\alpha)]))$ (Tajima 1989)

CUADRO 1
Secuencias del gen COI de las especies
del género *Spodoptera* obtenidas del Genbank
y sus números de accesoión

TABLE 1
Sequences of the COI gene of the species
of the genus *Spodoptera* obtained from the Genbank
and their accession numbers

| Especie | Número de accesoión |
|-----------------------------------|---------------------|
| <i>S. androgea</i> SNRP 14637 | GU159405 |
| <i>S. androgea</i> SNRP 56249 | GU159412 |
| <i>S. androgea</i> SNRP 56330 | GU159414 |
| <i>S. dolichos</i> h1 | HM756086 |
| <i>S. dolichos</i> h2 | HM756087 |
| <i>S. dolichos</i> h3 | HM756088 |
| <i>S. eridania</i> h1 | HM756081 |
| <i>S. eridania</i> h5 | HM756085 |
| <i>S. exigua</i> h1 | HM756077 |
| <i>S. exigua</i> h2 | HM756078 |
| <i>S. exigua</i> h4 | HM756080 |
| <i>S. frugiperda</i> CS3 | HM136595 |
| <i>S. frugiperda</i> CS4 | HM136589 |
| <i>S. frugiperda</i> RS2 | HM136594 |
| <i>S. frugiperda</i> RS3 | HM136595 |
| <i>S. frugiperda</i> RS4 | HM136596 |
| <i>S. latifascia</i> SRNP 16058 | GU159437 |
| <i>S. latifascia</i> SRNP 5115 | GU159443 |
| <i>S. latifascia</i> SRNP 56776 | GU159445 |
| <i>S. littoralis</i> | HM756074 |
| <i>S. litura</i> h1 | HM756090 |
| <i>S. litura</i> h2 | HM756091 |
| <i>S. litura</i> h3 | HM756092 |
| <i>S. litura</i> h4 | HM756093 |
| <i>S. ornithogalli</i> HBL 002326 | GU088102 |
| <i>S. ornithogalli</i> HBL 002327 | GU088101 |
| <i>S. pulchella</i> h2 | HM756076 |
| <i>S. pulchella</i> h1 | HM756075 |

fueron estimadores obtenidos con el programa DNAsp V5 (Librado & Rozas 2009). Un árbol de genes fue obtenido con las 63 secuencias mediante el uso del algoritmo de máxima verosimilitud (ML) (Guindon & Gascuel 2003) con el programa Mega 5.0. Este algoritmo fue escogido debido a que representa uno de los métodos más robustos para establecer topologías de árboles, ya que dentro de sus

funciones está encontrar la mejor longitud de las ramas del árbol, teniendo en cuenta: 1) la probabilidad anterior de que un nodo "0" del árbol tenga el nucleótido " $x_0g_{x_0}$ " relativo a la frecuencia con la que se encuentra este nucleótido " g_{x_0} " en todas las secuencias analizadas, 2) la probabilidad $P_{ij}(t)$ de que el nucleótido "i" mute al nucleótido "j" en un tiempo "t", y 3) la tasa de evolución de sustituciones nucleotídicas esperadas $v=4rt$, siendo r =tasa de sustitución nucleotídica y t =tiempo evolutivo, por lo que la función de la longitud de la rama es $lk=giP_{ij}(v)$ y al sumar todas las ramas del árbol para obtener su topología, se obtendría la función de verosimilitud $\ln L = \sum \ln L_k$ (Nei & Kumar 2000). Este árbol de ML se utilizó para visualizar la similitud genética entre las secuencias de *S. frugiperda* de cada uno de los haplotipos encontrados en Colombia y las secuencias de las demás especies del género *Spodoptera* después de la realización de 500 bootstraps (Felsenstein 1985) para asegurar la topología del árbol ML.

RESULTADOS

Los resultados sobre la entropía de un fragmento de 451 pares de bases del gen de la citocromo oxidada I (COI) mostró que su variación nucleotídica es confiable según la grafica (Entropía vs Posición de alineamiento) que arrojó el programa Bioedit ya que la variación de la entropía en todas las secuencias permaneció en rangos de valores de entropía muy similares. Por otro lado, el polimorfismo nucleotídico y demás estimadores relacionados con la variación genética en este fragmento, mostraron en general que la combinación de las secuencias de *S. frugiperda* de Colombia con las secuencias de otras polillas del mismo género de Estados Unidos, África y Europa produjo un aumento en el número de haplotipos, y también un aumento en la diversidad de haplotipos (Cuadro 2). Otro estimador que presentó grandes diferencias genéticas entre OTUS fue el de la diversidad nucleotídica (Π) (Cuadro 1). La inclusión de secuencias de *S. frugiperda* de Colombia junto con las demás

CUADRO 2

Estimadores de sitios segregantes (s), número de haplotipos (Hd) diversidad (θ) y polimorfismo nucleotídico (π) y test D de Tajima en las especies de *Spodoptera*

TABLE 2

Estimators of the segregant sites (s), haplotype number (Hd), diversity (θ) and nucleotide polymorphism (π) and the Tajima test D in the species of *Spodoptera*

| | <i>S. frugiperda</i> Colombia | <i>S. frugiperda</i> & USA Colombia | <i>Spodoptera</i> Genbank | <i>S. f.</i> Colombia & <i>Spodoptera</i> Genbank |
|----------------------|----------------------------------|--|------------------------------|--|
| Tamaño | 451 | 451 | 451 | 451 |
| Número de individuos | 28 | 39 | 34 | 63 |
| Sitios segregantes | 257 | 320 | 255 | 335 |
| Haplotipos | 26 | 34 | 32 | 57 |
| Hd | 0.995 | 0.993 | 0.996 | 0.997 |
| Sd Hd | 0.011 | 0.007 | 0.008 | 0.003 |
| Π | 0.23083 | 0.3485 | 0.18704 | 0.3345 |
| Sd Π | 0.04725 | 0.02638 | 0.03927 | 0.01955 |
| θ | 0.15724 | 0.18415 | 0.18704 | 0.17297 |
| Sd θ | 0.00981 | 0.05398 | 0.03927 | 0.04613 |
| D Tajima | 1.5396 | 1.7242 | 0.5002 | 1.2624 |
| | p>0.1 | p>0.05 | p>0.1 | p>0.1 |

del género produjo un aumento del estimador de diversidad nucleotídica, demostrando que las poblaciones colombianas de *S. frugiperda* presentan una gran diferenciación genética no solamente con haplotipos de otras especies del mismo género, sino también con secuencias de la misma especie recolectadas en los Estados Unidos (Cuadro 2). Esto último se corrobora con un análisis de distancias genéticas de Kimura 2 parámetros, realizado entre los haplotipos de *S. frugiperda* de Colombia y Estados Unidos, ya que las distancias entre Colombia y Estados Unidos alcanzaron valores de 1.0721 ± 0.0181 , mientras que las distancias genéticas de los haplotipos dentro de Colombia tuvieron valores cercanos a 0.3107 ± 0.4959 y las distancias promedio de Estados Unidos y Colombia, valores cercanos a 0.4953 ± 0.5425 .

Por otro lado, el árbol de ML obtenido, se produjo después de analizar el modelo de sustitución nucleotídica en 62 secuencias. El modelo de sustitución que se ajustó a la evolución del gen COI en estas secuencias fue GTR+G (BIC=8 668, 286, $\ln L = -2 767. 177$). La frecuencia promedio de los nucleótidos

de las secuencias fue de $A=0.338$, $C=0.140$, $G=0.119$ y $T=0.354$, siendo en este caso A y T las bases más frecuentes en estas secuencias, como se ha encontrado en otros insectos (Lunt *et al.* 1996, Freeland 2005). Este árbol agrupó el 86% de las secuencias de *S. frugiperda* de Colombia en un mismo clado con un bootstrap de 100%, lo cual asegura que éstos haplotipos se unieron entre sí dada su gran similitud genética (Fig. 1). Este grupo se encuentra conformado por secuencias de haplotipos del insecto recolectado en cultivos de maíz, algodón, sorgo y arroz en cinco departamentos colombianos, y su agrupación refleja una asociación del haplotipo a su planta hospedera. Esto debido a que la mayoría de haplotipos de los insectos recolectados en algodón se encuentran más cercanos entre sí indistintamente del departamento del cual provienen. Además, algunos de los haplotipos recolectados en maíz, agruparon a los haplotipos de algodón, y los haplotipos del Tolima recolectados en arroz y sorgo se agruparon entre sí. El énfasis dado a tales cultivos en este trabajo se produjo, ya que en investigaciones previas se demostró la presencia de dos

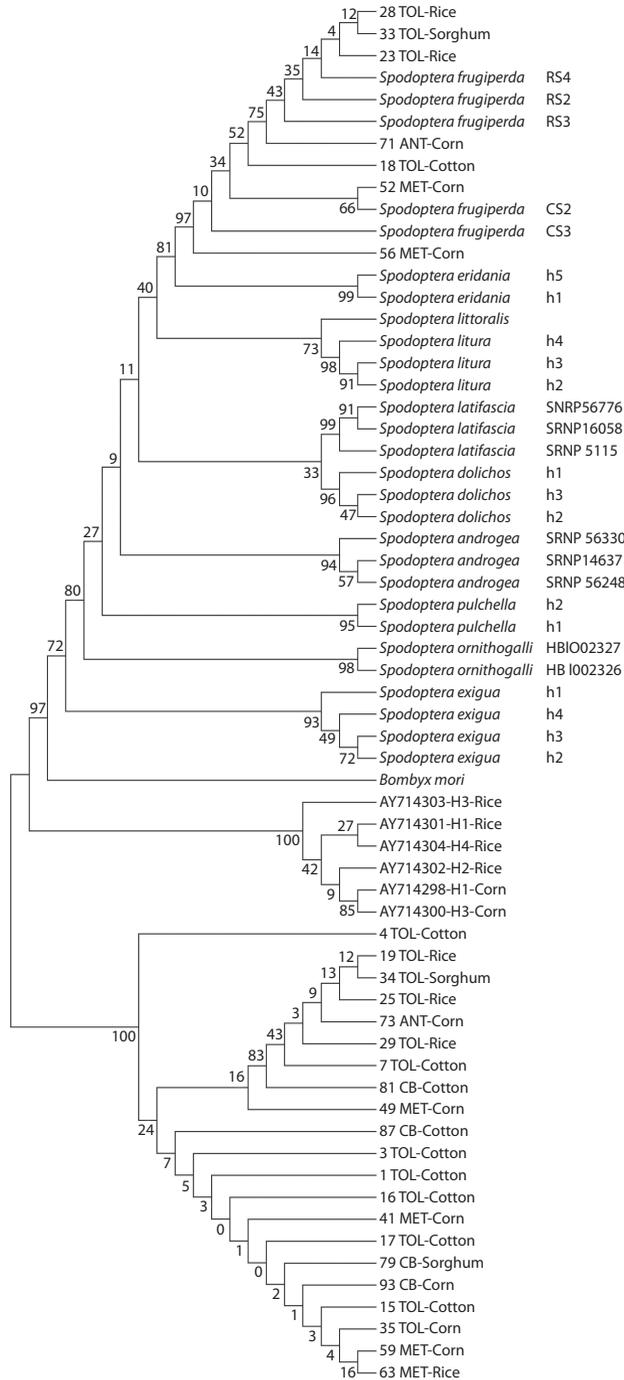


Fig. 1. Árbol consenso de máxima verosimilitud (ML) obtenido para las 62 secuencias de las especies del género *Spodoptera* y el modelo de sustitución nucleotídica general reversal time (GRT) (Ant=Antioquia, CB=Córdoba, Met=Meta, Tol=Tolima).
Fig. 1. Consensus ML tree obtained from 62 sequences of species of the genus *Spodoptera* and the nucleotide substitution model general reversal time (GRT) (Ant=Antioquia, CB=Córdoba, Met=Meta, Tol=Tolima).

biotipos de *S. frugiperda* en el Tolima. El biotipo de maíz, fue más frecuentemente encontrado en cultivos de maíz, algodón y sorgo, y el biotipo de arroz, más abundantemente en cultivos de arroz. Adicionalmente, las secuencias de *S. frugiperda* que se agruparon en otra parte del árbol ML, formaron un grupo compuesto por secuencias de Tolima, Meta y Antioquia en conjunto con secuencias de *S. frugiperda* de los Estados Unidos. Estas agrupaciones se produjeron entre secuencias provenientes del mismo cultivo, ya que las secuencias de Estados Unidos con símbolos CS (*corn strain*=biotipo de maíz) se unieron a secuencias colombianas del insecto recolectadas en maíz y de la misma manera, secuencias de Estados Unidos con símbolos RS (*rice strain*=biotipo de arroz) se unieron a secuencias colombianas del insecto recolectadas en arroz.

DISCUSIÓN

Dadas las altas estimaciones de las distancias genéticas obtenidas para las especies del género *Spodoptera* y en particular entre los OTUS de *S. frugiperda* de Colombia y Estados Unidos obtenidos en este trabajo, se sugiere que ambos OTUS de los dos países son diferentes especies (dada la evidencia molecular). Estos resultados se corroboran con el hecho de que valores altos de distancias genéticas de Nei (que asumen neutralidad en el gen y tasa de sustitución nucleotídica Jukes y Cantor de $\frac{1}{4}$) entre diferentes especies de moscas de la fruta del género *Drosophila* han sido utilizadas por Coyne & Orr (1998) para comparar estas distancias con el nivel de aislamiento reproductivo entre sus especies. Coyne & Orr (1998) encontraron que las especies verdaderas (reconocidas con el concepto biológico de especie) presentan distancias genéticas mayores o iguales a 0.5. Igualmente, valores de distancias genéticas de Nei entre 0.49-0.87 fueron valores representativos para establecer la diferenciación genética de dos especies de mariposas del género *Heliconius* sp. (Jiggins & Davies 1998), por lo que las distancias K2 obtenidas para los haplotipos de *S. frugiperda*

de Colombia y Estados Unidos son mucho más altos comparados con estas especies de mariposas neotropicales y con las distancias genéticas encontradas para *Drosophila* sp.

Adicionalmente, las agrupaciones formadas entre algunas secuencias de *S. frugiperda* colombianas con secuencias de esta especie de Estados Unidos, puede reflejar la retención de polimorfismos genéticos ancestrales de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* entre estas secuencias (Lunt *et al.* 1996, Busato *et al.* 2004, Prowell *et al.* 2004, Vélez-Arango *et al.* 2008). Otro caso de retención de polimorfismos ancestrales, lo presenta la polilla *Ostrinia nubilalis* puesto que esta divergió en dos razas asociadas al maíz (*Zea mays*) y artemisia (*Artemisia vulgaris*) (Martel *et al.* 2003). Ambas razas presentan polimorfismos ancestrales a nivel del gen *Ldh* de la aloenzima lactato deshidrogenasa, ya que estas dos razas son simpátricas, pero comparten similitudes nucleotídicas en este gen a pesar de no presentar flujo genético entre ellas en las regiones de Francia en las que fueron recolectadas (Dopman *et al.* 2005).

En el árbol de ML, las secuencias de Estados Unidos de *S. frugiperda* recolectadas en cultivos de maíz y arroz se agruparon dependiendo del cultivo en las cuales se encontraron. Estos resultados demuestran que los haplotipos de maíz y arroz de este país, se mueven dentro de cada uno de estos cultivos y por lo tanto muestran una asociación a su planta hospedera respectiva. Este mismo resultado fue obtenido por Lewter *et al.* (2006) en un trabajo en el que analizaron 71 secuencias de *S. frugiperda* de Estados Unidos y en el que encontraron tres haplotipos exclusivos del cultivo de maíz y cuatro haplotipos exclusivos del cultivo de arroz. Los haplotipos identificados por estos últimos autores fueron utilizados en el presente trabajo para compararlos con los haplotipos de la misma especie en Colombia. Los números de accesión de las secuencias de Estados Unidos de *S. frugiperda* son: AY714298 (Florida, Arkansas, Misisipi y California, recolectado en maíz), AY714299 (Florida, recolectado en maíz), AY714300 (Florida, recolectado en maíz), AY714301 (Florida,

recolectado en arroz), AY714302 (Florida, Arkansas, recolectado en arroz), AY714303 (Florida, Arkansas, recolectado en arroz) y AY714304 (Florida, recolectado en arroz).

Por otro lado, respecto a las otras especies del género *Spodoptera* analizadas en este estudio, se encontró que el árbol concenso ML agrupó haplotipos de la misma especie entre sí, por ejemplo *S. eridania* y sus dos haplotipos h1 y h5, *S. litura* y sus tres haplotipos h4, h3 y h2, *S. latifascia* y sus tres haplotipos SRNP, *S. dolichos* y sus tres haplotipos h1, h2 y h3, *S. androgea* y sus tres haplotipos SRNP, *S. pulchella* y sus dos haplotipos h1 y h2, *S. ornithogalli* y sus dos haplotipos HLB y *S. exigua* y sus cuatro haplotipos h1, h2, h3 y h4. Todas estas agrupaciones muestran que las secuencias existentes dentro de cada especie son más similares entre sí que con otras especies, demostrando que el árbol de ML refleja la historia evolutiva del género (valores de bootstrap dentro de cada especie variaron entre 73-99%). Este árbol también agrupó a *S. frugiperda* (secuencias AY) con *S. exigua*, por un lado y con *S. eridania* por el otro, estas agrupaciones tienen valores de bootstrap entre el 85-99%. Adicionalmente, el árbol ML no agrupó a *S. ornithogalli* con *S. frugiperda* demostrando que ambas especies no presentan un ancestro común reciente (con un ramaje de bootstrap de 97%). Este resultado es importante para Colombia, ya que ambas especies son morfológicamente muy similares, lo cual genera confusión cuando son recolectadas en estados larvales en cultivos de algodón en este país (Santos-Amaya *et al.* 2009). Los resultados obtenidos aquí comprueban que estas especies presentan gran diferenciación genética a nivel del gen COI de la mitocondria, por lo que este gen representa un buen marcador molecular y una alternativa para distinguir estas especies crípticas, particularmente cuando en sus estadios larvales no se pueden diferenciar estas dos especies. Es importante mencionar que en este trabajo no se analizaron secuencias de *S. albula* (puesto que no se encuentran disponibles en el Genbank), y esta especie también es parte del complejo *Spodoptera* del algodnero.

Nuevos trabajos sobre secuenciación de este gen requiere su inclusión para dilucidar mejor las relaciones ancestro descendiente entre las especies de este complejo.

Por otro lado, las especies *S. litura* y *S. littoralis* se agruparon cercanamente en el árbol de ML, lo cual se esperaría dada su distribución geográfica en Europa y Asia (hemisferio oriental). Igualmente, las especies *S. latifascia*, *S. dolichos*, *S. androgea* y *S. pulchella*, se agruparon entre sí y dicha agrupación refleja sus rangos de distribución en América (hemisferio occidental). *Bombix mori* se agrupó más cercanamente a *S. exigua*, lo cual no se esperaba en nuestros resultados, puesto que pertenece a otra familia de lepidópteros. Este resultado puede significar que este grupo externo no presenta suficiente diferenciación genética con el género *Spodoptera*. No obstante, el árbol de ML mostró agrupaciones de especies de este género esperadas según su filogeografía, mostrando que esta secuencia no sesgó los resultados obtenidos en este trabajo.

Adicionalmente, estimadores de polimorfismo nucleotídico calculados en *S. frugiperda* de Colombia muestran que las poblaciones de esta especie en este país presentan una gran diferenciación genética con las poblaciones de la misma especie en Estados Unidos. Estos estimadores corroboran las agrupaciones obtenidas con el árbol de ML. La diferenciación genética de las poblaciones de *S. frugiperda* es tan elevada, que cuando sus haplotipos son combinados con los haplotipos de especies del mismo género, sus valores de polimorfismo nucleotídico aumentan, al igual que sus distancias genéticas. Estos resultados demuestran que los haplotipos de *S. frugiperda* de Colombia podrían representar una especie diferente a los haplotipos de esta especie en Estados Unidos, esta diferenciación se da a pesar de que la capacidad de dispersión del insecto sea muy alta (Nagoshi *et al.* 2008, Salinas 2010). Esto significa que la diferenciación genética en esta especie está fuertemente influenciada por una separación geográfica entre ambos países. Los resultados obtenidos son una aproximación a las relaciones filogenéticas del género

Spodoptera, por ello futuros trabajos con este grupo se deberían enfocar en analizar secuencias de otros genes mitocondriales y nucleares, además de analizar más caracteres morfológicos y de la biología de las especies de este taxon como lo sugerido por Yela & Kitching (1999). Sin embargo, el uso del gen nuclear ribosomal rRNA y los genes mitocondriales ND1 y tRNA para el análisis filogenético de la superfamilia Noctuidae realizado por Weller *et al.* (1994) no produjo árboles monofiléticos para este taxon, significando que la búsqueda de los caracteres morfológicos y los loci más adecuados puede ser difícil y compleja para este grupo.

Finalmente, respecto al test de neutralidad de Tajima, todas las secuencias del género *Spodoptera* no fueron significativas respecto a este estimador, demostrando la neutralidad del gen analizado. Esto permite sugerir que las poblaciones de estas especies no se han encontrado en estados de expansión ni reducción drásticos que afecten su variabilidad genética (Nei & Kumar 2000).

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan su agradecimiento a Haidy Salinas-Hernández por el desarrollo de la parte molecular utilizada en este trabajo que hace parte de su tesis de maestría en Ciencias-Entomología. A CORTOLIMA por otorgar el permiso de captura y acceso a los recursos genéticos de *S. frugiperda* en Tolima (Resolución 843, agosto 2007), y al Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial de Colombia por el permiso de recolecta y acceso a recurso genético (4120E1-44703, 24 de Abril de 2008). Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia (Código Quipu 201010007294, 20101009540) y por Colciencias (Instituto Colombiano para la Ciencia y la Tecnología) (Contrato número: 1118-452-21042) (colectas de larvas). Ambos

proyectos fueron otorgados a la investigadora principal Clara Saldamando.

RESUMEN

En este trabajo se secuenció un fragmento de 451pb del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (COI) en 62 secuencias del género *Spodoptera* y una secuencia de *Bombix mori* (grupo externo). Los resultados mostraron gran diferenciación genética (distancia K2) entre los haplotipos de *Spodoptera frugiperda* de Colombia y Estados Unidos, según los estimadores de diversidad haplotípica, diversidad y polimorfismo nucleotídicos calculados. Un árbol de ML agrupó las especies con valores de bootstrap entre 73-99% en las ramas internas. No obstante algunas ramas presentaron bajos valores de bootstrap. Este árbol formó un grupo constituido por las especies del hemisferio oriental (*S. littoralis* y *S. litura*) y también agrupó las especies localizadas en el hemisferio occidental (*S. androgea*, *S. dolichos*, *S. eridania*, *S. exigua*, *S. frugiperda*, *S. latifascia*, *S. ornithogalli* y *S. pulchella*). Esto demuestra que el árbol agrupó las especies con base en su origen geográfico. Contrariamente, el árbol no agrupó a *S. frugiperda* con *S. ornithogalli*, demostrando que a pesar de que ambas coexisten en el cultivo de algodón, no comparten un ancestro común reciente. En Colombia, estas especies forman parte del "complejo *Spodoptera*" del algodón, y nuestros resultados demuestran que la secuenciación de este gen permite diferenciarlas sin necesidad del uso de claves taxonómicas de sus estadios larvales. Este trabajo es una aproximación a la filogenia de este género, por lo cual la inclusión de más genes (mitocondriales y nucleares) son necesarios para futuros trabajos.

Palabras clave: filogenia, *Spodoptera*, especies crípticas, gen COI.

REFERENCIAS

- Black, W.C. & N.M. Duteau. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studie, p. 361-373. In J.M. Crampton, C.B. Beard & C. Louis (eds.). The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual. Chapman & Hall, Londres, Inglaterra.
- Brown, E.S. & C.F. Dewhurst. 1975. The genus *Spodoptera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Africa and the Near East. B. Entomol. Res. 65: 221-262.
- Busato, G.R., A.D. Gruztmacher, A.C. De Oliveira, E.A. Vieira, P.A. Zimmer, M.M. Kopp, J. De Bandeira & T. Magalães. 2004. Analise da estrutura e

- diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas as culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. *Neotrop. Entomol.* 33: 709-716.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, J.T. Gibson, D.G. Higgins & J.D. Thompson. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31: 3497-3500.
- Coyne, J.A. & H.A. Orr. 1998. The evolutionary genetics of speciation. *Philos. T. R. Soc. Lond. B.* 353: 287-305.
- Dopman, D.B., L. Pérez, S.M. Bogdanowicz & R.G. Harrison. 2005. Consequences of reproductive barriers for genealogical discordance in the European corn borer. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 14 706-14 711.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Freeland, J. 2005. *Molecular Ecology*. Wiley, Londres, Inglaterra.
- Guindon, S. & O. Gascuel. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.
- Hall, T.A. 1999. Bioedit. A user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acid S.* 41: 95-98.
- Heppner, J.B. 1998. *Spodoptera* armyworms in Florida (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry Entomological Circular 390, Florida, Estados Unidos.
- Jiggins, C.D. & N. Davies. 1998. Genetic evidence for a sibling species of *Heliconius charithonia* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 64: 57-67.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson & D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2 947-2 948.
- Lewter, J.A., A.L. Szalanski, R.N. Nagoshi, R.L. Meagher, C.B. Owens & R.G. Luttrell. 2006. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla. Entomologist* 89: 63-67.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP V5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lunt, D.H., D.X. Zhang, J.M. Szymura & G. Hewitt. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 5: 153-165.
- Martel, C., A. Rejasse, F. Rousset, M.T. Bethenod & D. Bourguet. 2003. Host plant associated genetic differentiation in northern French populations of the European corn borer. *Heredity* 90: 141-149.
- Mitchell, A., C. Mitter & J.C. Regier. 2006. Systematics and evolution of the cutworm moths (Lepidoptera: Noctuidae): evidence from two protein-coding nuclear genes. *Syst. Entomol.* 1: 21-46.
- Monteiro, A. & N.E. Pierce. 2001. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1a gene sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 18: 264-281.
- Nagoshi, R.N., R.L. Meagher, K. Flanders, J. Gore, R. Jackson, J. Lopez, J.S. Armstrong, G.D. Buntin, C. Sansone & R. Leonard. 2008. Using haplotypes to monitor the migration of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Texas and Florida. *J. Econ. Entomol.* 101: 742-749.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford, Oxford, Inglaterra.
- Nei, M. & W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5 269-5 273.
- Passoa, S. 1991. Color identification of economically important *Spodoptera* larvae in Honduras (Lepidoptera: Noctuidae). *Insecta Munda* 5: 185-196.
- Pogue, M.G. 2002. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem. A. Entomol. Inst.* 43: 1-202.
- Pogue, M.G. & R.B. Simmons. 2008. A new pest species of *Copitarsia* (Lepidoptera: Noctuidae) from the neotropical region feeding on *Asparagus* and cut flowers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101: 743-762.
- Prowell, D.P., M. McMichael & J.F. Silvain. 2004. Multilocus genetic analysis of host use, introgression and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 1034-1044.
- Salinas, H. 2010. Identificación de haplotipos de *Spodoptera frugiperda* en algunas poblaciones de Colombia para el estudio del comportamiento migratorio de la especie. Tesis Maestría en Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

- Santos-Amaya, O., O. Delgado-Restrepo, J. Argüelles & E. Aguilera-Garramuño. 2009. Evaluación del comportamiento del complejo *Spodoptera* con la introducción de algodón transgénico al Tolima, Colombia. *Rev. Corpoica Cienc. Tec. Agropec.* 10: 24-32.
- Strutzenberger, P., G. Brehm, F. Bodner & K. Fiedler. 2010. Molecular phylogeny of *Eois* (Lepidoptera, Geometridae): evolution of wing patterns and host plant use in a species rich group of Neotropical moths. *Zool. Scripta* 39: 603-620.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA 5. Molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2 731-2 739.
- Todd, E.L. & R.W. Poole. 1980. Keys and illustrations for the armyworm moths of the noctuid genus *Spodoptera* Guenée from the Western Hemisphere. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 73 : 722-738.
- Vélez-Arango, A.M., R.E. Arango, D. Villanueva, E. Aguilera & C.I. Saldamando. 2008. Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Rev. Col. Entomol.* 34: 145-150.
- Wagner, D.L. 2001. *Moths*. Academic, Londres, Inglaterra.
- Watterson, G. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.* 7: 256-276.
- Weller, S.J., D.P. Pashley, J.A. Martin & J.L. Constable. 1994. Phylogeny of noctuid moths and the utility of combining independent nuclear and mitochondrial genes. *Syst. Biol.* 43: 194-211.
- Yela, J.L. & I.J. Kitching. 1999. La filogenia de Noctuidos, repasada (Lepidoptera: Noctuidae). Noctuid phylogeny revisited (Lepidoptera: Noctuidae). *Bol. Soc. Entomol. Aragonesa* 26: 485-520.