



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca mediante el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) y la región nuclear FR

Daniela Cano Calle

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia
2015

Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca mediante el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) y la región nuclear FR

Daniela Cano Calle

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias – Biotecnología

Directora:

Ph.D., MSc., Bióloga, Clara Inés Saldamando Benjumea

Codirector:

PhD., Médico, Rafael Eduardo Arango Isaza

Línea de investigación

Ecología y Evolución de insectos

Grupo de Investigación

Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2015

(Dedicatoria)

A Dios por darme fuerzas para terminar mis estudios y por brindarme el entusiasmo y la sabiduría necesaria para concluir este logro en mi camino profesional.

A mis padres y mis hermanos por su incondicional compañía. Por ser mi motor, por ser los mejores modelos a seguir y porque han sido mi mayor apoyo. Ellos son mi razón de ser... espero que siempre se encuentren orgullosos de mí.

A Julio por estar apoyándome, acompañándome y sobre todo por alentarme a seguir adelante con mis metas.

A todos los adoro.

Agradecimientos

Le agradezco a mi directora de tesis, Dra. Clara Inés Saldamando Benjumea y a mi codirector Rafael Eduardo Arango Isaza por las orientaciones, el seguimiento y la supervisión continúa de esta investigación, además, por brindarme el apoyo para que desarrollara y culminara este proyecto. A mis compañeros y amigos que forman parte del grupo de investigación Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB por colaborarme, apoyarme y brindarme su amistad incondicional, igualmente, por facilitarme su laboratorio donde pude desarrollar toda mi tesis de maestría. A los asistentes Jhon Alexander Agudelo y Adolfo Arias por colaborarme con las colectas de *Spodoptera frugiperda*. A la Universidad Nacional de Colombia (Sede-Medellín) y a Colciencias por la formación académica y por ayudarme a crecer profesionalmente y por ser el ente financiador del proyecto.

Resumen

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) es un insecto plaga del maíz, arroz, algodón, sorgo y pastizales. Presenta dos formas biológicas (biotipos o razas) (maíz y arroz) que son idénticas morfológicamente, pero que difieren en varios aspectos tales como su composición genética, su aislamiento reproductivo y su tolerancia a insecticidas y controladores biológicos. En este trabajo se realizó la identificación molecular de estos biotipos a partir de larvas recolectadas en cultivos de maíz, arroz, algodón, sorgo, pasto mulato, caña de azúcar y sorgo dulce en los departamentos del Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca con el uso de dos marcadores moleculares: una PCR-RFLP del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (COI) y una PCR del gen nuclear FR (For Rice). Los análisis moleculares permitieron diferenciar tres poblaciones de *S. frugiperda*: a) biotipo de maíz, b) biotipo de arroz y c) un grupo de individuos clasificados como “híbridos” entre estos dos biotipos, producto del cruce entre hembras del biotipo de maíz y machos del biotipo de arroz y viceversa. Los individuos genotipificados e identificados como “biotipo de maíz” se recolectaron en cultivos de maíz, sorgo, sorgo dulce, caña de azúcar, algodón, y con poca frecuencia en arroz y pasto mulato. Los individuos genotipificados como “biotipo de arroz” se encontraron en cultivos de arroz y pasto mulato principalmente. Estos biotipos presentaron una diferenciación genética significativa ($\Phi_{iPT} = 0,376$, $g_i = 13,370$, $P < 0.001$, para el gen COI, $\Phi_{iPT} = 0,50$, $g_i = 13,354$, $P < 0.001$, para el gen FR), por lo que el flujo genético entre éstos es reducido. Dos dendrogramas obtenidos con la distancia genética de Nei y el algoritmo UPGMA (Unweighted paired groups with arithmetic mean) para cada marcador molecular separó dos poblaciones genéticamente diferenciadas: una compuesta por el biotipo de maíz y la otra por el biotipo de arroz. Aunque la topología de cada árbol difiere, dado que los marcadores moleculares son distintos, la mayoría de sus ramas separaron a los dos biotipos de este insecto. Los resultados demuestran la importancia que tiene llevar a cabo la diferenciación molecular de estos dos biotipos, dado que bajo condiciones de laboratorio, ambos difieren significativamente en su tolerancia a insecticidas y a

controladores biológicos. El biotipo de arroz es más tolerante que el biotipo de maíz a insecticidas y el de maíz más tolerante a endotoxinas del *Bacillus thuringiensis* que el biotipo de arroz. Los resultados de este trabajo demuestran que la transferencia de genes que confieren tolerancia a controles químicos y biológicos en estos dos biotipos es baja o casi nula, ya que se encontró en este estudio que el flujo genético entre los biotipos de maíz y arroz de esta polilla es muy bajo, esto podría explicar las causas por las cuales ambos responden diferentemente en su manejo en condiciones de campo.

Palabras claves: *Spodoptera frugiperda*, biotipos, enzima *MspI*, enzima *SacI*, PCR-RFLP

Abstract

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) is a polyphagous insect of major economic impact in the Western hemisphere and it has genetically differentiated into two strains (i.e., corn and rice) that are morphologically identical at the level of larvae and adult but differs in their wing shape and in their genetics. In 2008, corn and rice strains of this pest were identified from Tolima department in Colombia. This work continues the molecular identification of these two strains in three other regions of Colombia and three other crops (grass, sugarcane and sweet sorghum). Our results showed that both strains are associated to the same hosts as reported in 2008. The corn strain was more abundant in corn, cotton, sorghum, sugarcane and sweet sorghum whereas the rice strain was more abundant in grass and rice ($\chi^2 = 282.31$, $df = 39$, $p < 0.0001$). This host plant association reflects a population genetic differentiation in Colombia with values of PhiPT (COI) = 0.376, $P < 0.001$, PhiPT (FR) = 0.50, $P < 0.001$ for all crops. The UPGMA dendrograms obtained with Nei genetic distances separated most of rice strain populations from the other crops suggesting that is genetically differentiated from the corn strain. The results demonstrate the importance to differentiate these two strains in nature since these two populations significantly differ in their tolerance to both insecticides and *Bacillus thuringiensis* endotoxins under laboratory conditions and thus transference of genes that confer resistance to any control is low given the results obtained here because the gene flow estimated between them is very reduced.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, biotypes, *MspI* enzyme, *SacI* enzyme, PCR-RFLP

Contenido

Resumen.....	V
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas.....	XI
Introducción.....	1
1. Capítulo 1	3
1.1. Hipótesis	3
1.2. Objetivos	4
1.2.1. General	4
1.2.2. Específicos	4
1.3. Marco Teórico	5
1.3.1. <i>S. frugiperda</i> como plaga	5
1.3.2. <i>Spodoptera frugiperda</i> y sus biotipos	6
1.3.3. Aislamiento reproductivo en los biotipos de <i>S. frugiperda</i>	7
1.3.4. Biotipos de <i>S. frugiperda</i> y su tolerancia a insecticidas y al <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
1.4. Metodología	10
1.4.1. Recolección del insecto	10
1.4.2. Extracción de ADN	10
1.4.3. PCR RFLP de la región COI del ADN mitocondrial	10
1.4.4. PCR de la región FR del ADN nuclear	11
1.4.5. Análisis estadístico	11
1.4.6. Análisis de diferenciación molecular	11
1.4.7. AMOVA (Analysis of Molecular Variance)	12
2. Capítulo 2	15
2.1. Resultados	15
2.1.1. Identificación de los biotipos de <i>S. frugiperda</i>	15

2.2	Discusión	27
3.	Capítulo 3	31
3.1.	Conclusiones y Recomendaciones	31
3.1.1.	Conclusiones	31
3.1.2	Recomendaciones	32
	Bibliografía	33

Lista de figuras

- Figura 2- 1.** Amplificaciones de los productos de PCR-RFLP del gen COI (569 pb) y sus respectivas digestiones con la enzima *MspI* (497 pb y 72 pb). Muestras de maíz del Meta que presentan digestión (biotipo de maíz). M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb, CP-: Control Negativo de la PCR, CD-: Control Negativo de la digestión, C+: Control Positivo..... 15
- Figura 2- 2.** Amplificaciones de los productos de PCR-RFLP del gen COI (569 pb) y sus respectivas digestiones con la enzima *SacI* (419 pb y 150 pb). Muestras de arroz del Valle del Cauca que presentan digestión (biotipo de arroz). M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb, CP-: Control Negativo de la PCR, CD-: Control Negativo de la digestión C+: Control Positivo 16
- Figura 2- 3.** Amplificaciones de los productos de PCR de la región FR del ADN nuclear. Muestras de pasto mulato de Córdoba (biotipo de arroz) fragmentos por encima de 500 pb. M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb, C-: Control Negativo, C+: Control Positivo..... 16
- Figura 2- 4.** Distribución de los biotipos e híbridos de *S. frugiperda* en los departamentos por cultivo. TM: Tolima-maíz, CA: Córdoba-arroz, CSD: Córdoba-sorgo dulce, CM: Córdoba maíz, CPM: Córdoba- pasto mulato, CAL: Córdoba- algodón, CS: Córdoba-sorgo, MS: Meta-sorgo, MM: Meta- Maíz, MA: Meta arroz, VS: Valle del Cauca- sorgo, VA: Valle del Cauca- arroz, VM: Valle del Cauca-maíz, VC: Valle del Cauca- caña de azúcar. 21
- Figura 2- 5.** Individuos de *S. frugiperda* clasificados como biotipo de maíz y arroz. a) Distribución de biotipos por cultivo usando la región COI. b) Distribución de biotipos por cultivo usando la región FR. c) Distribución de biotipos e híbridos por cultivo usando las dos regiones..... 22
- Figura 2- 6.** Dendrograma basado en distancias de Nei y el algoritmo UPGMA para el marcador COI. 25
- Figura 2- 7.** Dendrograma basado en distancias de Nei y el algoritmo UPGMA para el marcador FR. 26

Lista de tablas

Tabla 2- 1. Número de larvas de *S. frugiperda* genotipificadas provenientes de siete plantas hospederas diferentes recolectadas en cuatro departamentos de Colombia. 17

Tabla 2- 2. Tabla de contingencia para los marcadores moleculares COI, FR y los dos marcadores en conjunto para determinar la distribución diferencial de los biotipos de *S. frugiperda* y sus híbridos en los cuatro departamentos. TM: Tolima-maíz, CA: Córdoba-arroz, CSD: Córdoba-sorgo dulce, CM: Córdoba maíz, CPM: Córdoba- pasto mulato, CAL: Córdoba- algodón, CS: Córdoba- sorgo, MS: Meta-sorgo, MM: Meta- Maíz, MA: Meta arroz, VS: Valle del Cauca- sorgo, VA: Valle del Cauca- arroz, VM: Valle del Cauca-maíz, VC: Valle del Cauca- caña de azúcar. 19

Tabla 2- 3. Tabla de contingencia para los marcadores moleculares COI, FR y los dos marcadores en conjunto para determinar la distribución diferencial de los biotipos e híbridos de *S. frugiperda* en los diferentes cultivos. $P < 0,0001$. TM: Tolima-maíz, CA: Córdoba-arroz, CSD: Córdoba-sorgo dulce, CM: Córdoba maíz, CPM: Córdoba- pasto mulato, CAL: Córdoba- algodón, CS: Córdoba- sorgo, MS: Meta-sorgo, MM: Meta- Maíz, MA: Meta arroz, VS: Valle del Cauca- sorgo, VA: Valle del Cauca- arroz, VM: Valle del Cauca-maíz, VC: Valle del Cauca- caña de azúcar. 20

Tabla 2- 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para la región COI entre y dentro de las poblaciones de *S. frugiperda*. gl: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, Var: varianza estadística P: probabilidad 24

Tabla 2- 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para la región FR entre y dentro de las poblaciones de *S. frugiperda*. gl: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, Var: varianza estadística, P: probabilidad. 24

Introducción

Spodoptera frugiperda (FAW) (J. E. Smith, 1797) es una polilla migratoria de origen tropical que se encuentra en distintos hospederos, por lo que se le considera como polífaga. Sin embargo, este insecto es la plaga principal en el cultivo de maíz (*Zea mays*), y secundaria en arroz (*Oryza sativa*), pastos, sorgo (*Sorghum* spp.), algodón (*Gossypium hirsutum*), alfalfa (*Medicago sativa*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), entre otros cultivos (García et al. 2002). Por consiguiente, FAW es una plaga de gran importancia en Colombia, ya que las pérdidas económicas en los cultivos de maíz pueden llegar hasta el 35% (Villamizar et al. 2012).

En 1986, Dorothy Pashley identificó dos poblaciones de *S. frugiperda* que eran idénticos morfológicamente pero diferentes genéticamente y fisiológicamente y los denominó “Biotipo de Maíz” y “Biotipo de Arroz”, plantas hospederas de mayor preferencia. Sin embargo, se ha podido evidenciar que la asociación a la planta hospedera no es exclusiva, ya que el biotipo de arroz se puede encontrar en arroz, pastos y maíz pero en bajas cantidades, y el biotipo de maíz se puede hallar en los cultivos de maíz (en altas proporciones), algodón y sorgo (Nagoshi y Meagher, 2003a, 2004, Prowell et al. 2004, Vélez-Arango et al. 2008).

Por otro lado, diferentes estudios se han realizado en la línea de investigación “ecología y evolución” de insectos creados por la profesora Clara Inés Saldamando Benjumea del grupo de investigación Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB, la cual se basó principalmente en el estudio de la biología evolutiva, genética de poblaciones y genética de tolerancia /resistencia de los biotipos de *S. frugiperda* en Colombia. Estos biotipos fueron identificados por primera vez en el Tolima, por medio de una PCR-RFLP del gen COI y la región en tándem FR (For Rice) evidenciando que el biotipo de maíz se encuentra con mayor frecuencia en los cultivos de maíz, seguido de algodón y sorgo y

que el biotipo de arroz con mayor frecuencia en arroz, seguido de maíz, algodón y sorgo (Vélez-Arango et al. 2008). En el segundo trabajo los autores comprobaron que hay una diferenciación poblacional significativa ya que hay una reducción del flujo genético entre los cultivos de maíz, sorgo y algodón con respecto a los cultivos de arroz ($\Phi_{iPT} = 0,41$, $p < 0.001$ para COI, $\Phi_{iPT} = 0.19$, $p < 0.001$ para FR), posiblemente por diferencias en el comportamiento de oviposición de las hembras ya que las hembras ovipositan dependiendo a su planta hospedera. Asimismo, estos biotipos presentan aislamiento precigótico comportamental parcial debido a que las hembras de maíz raramente se aparean con los machos del biotipo de arroz pero las hembras del biotipo de arroz no son excluyentes con los machos con los cuales se aparean (Saldamando et al. 2014). Los biotipos también presentan aislamiento reproductivo postcigóticos ya que en las generaciones híbridas entre ellos, pasan por una reducción en el éxito reproductivo comparado con sus líneas parentales (Velásquez-Vélez et al. 2011). Por otro lado, los biotipos de este insecto también presentan diferencias significativas en la tolerancia a insecticidas, como es el caso del metomil y la lambda cialotrina (Ríos –Diez y Saldamando-Benjumea, 2011) y a las endotoxinas del *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac y Cry1Ab (Ríos –Diez et al. 2012). En el caso de los insecticidas, el biotipo de arroz es más tolerante que el biotipo de maíz, mientras que con las endotoxinas del Bt, el biotipo de maíz es más tolerante que el de arroz.

Dados todos los estudios realizados en Colombia por el grupo de investigación, el propósito de este trabajo es continuar con la investigación realizada por Vélez-Arango et al. (2008), para ello se realizó una genotipificación del insecto en los departamentos Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca en Colombia con el fin de identificar los biotipos de *Spodoptera frugiperda* y sus correspondientes híbridos en siete plantas hospederas, maíz, sorgo, pasto mulato, algodón, sorgo dulce, arroz y caña de azúcar.

1. Capítulo 1

1.1. Hipótesis

Hipótesis A

Ho: No existen biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima, y Valle del Cauca.

Ha: Si existen biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima, y Valle del Cauca.

Hipótesis B

Ho: Los biotipos de *S. frugiperda* de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca no presentan distribución diferencial en los cultivos de maíz, sorgo, pasto mulato, algodón, sorgo dulce, arroz y caña de azúcar

Ha: Los biotipos de *S. frugiperda* de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca si presentan distribución diferencial en los cultivos de maíz, sorgo, pasto mulato, algodón, sorgo dulce, arroz y caña de azúcar

Hipótesis C

Ho: Las poblaciones de *S. frugiperda* de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca no presentan diferenciación poblacional.

Ha: Las poblaciones de *S. frugiperda* de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca si presentan diferenciación poblacional.

1.2. Objetivos

1.2.1.General

Identificar los biotipos de *Spodoptera frugiperda* y sus correspondientes híbridos en siete plantas hospederas de maíz, sorgo, pasto mulato, algodón, sorgo dulce, arroz y caña de azúcar en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima, y Valle del Cauca.

1.2.2.Específicos

- Identificar los biotipos de *S. frugiperda* con el uso de una PCR RFLP del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (COI) en los cultivos de maíz, sorgo, pasto mulato, algodón, sorgo dulce, arroz y caña de azúcar en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima, y Valle del Cauca.
- Identificar los biotipos de *S. frugiperda* con el uso de una PCR del gen nuclear FR (For Rice) en los cultivos de maíz, sorgo, pasto mulato, algodón, sorgo dulce, arroz y caña de azúcar en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima, y Valle del Cauca.
- Determinar si los biotipos de maíz y arroz de los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima, y Valle del Cauca presentan diferenciación poblacional.

1.3. Marco Teórico

1.3.1. *S. frugiperda* como plaga

S. frugiperda es una polilla que en estado larval genera grandes pérdidas económicas en el sector agrario que alcanza hasta el 35% de daños en los cultivos de maíz (Torres y Cotes 2005, Villamizar et al. 2012). Su distribución geográfica a través del país es amplia puesto que, en gran parte del país el área de siembra de cultivos que sirven como hospederos de la plaga es grande, generando una capacidad de dispersión mayor. En el 2012 el área de siembra para estos cultivos fue 43.844 Ha para algodón, 207.206 Ha para caña de azúcar, 493.898 Ha de arroz, 527.245 Ha para maíz y 18.336 Ha para sorgo (Agronet, 2012).

Las larvas recién emergidas de *S. frugiperda* son de color verde pálido y la cabeza durante el segundo estadio es de color naranja-marrón. Durante los primeros días las larvas jóvenes se alimentan de las hojas cercanas a la tierra y, posteriormente, después de una semana, se desplazan hacia la parte más alta de la planta de maíz, consumiéndose todo el tejido de la hoja a excepción de las venas y nervio central. Las densidades en estado larval por planta pueden ser no muy altas, en promedio son de uno a dos larvas por planta en infestaciones fuertes, ya que las larvas pueden exhibir un comportamiento canibal, es decir las larvas de mayores instares se alimentan de las de menor instar. Durante el día las larvas se encuentran alojadas y escondidas en el cogollo de la planta. En apariencia el gusano cogollero presenta una pronunciada "Y" invertida y tubérculos de color negro del cual surgen pelos dispuestos en todo el cuerpo. La pupa del gusano cogollero se encuentra en el suelo y se pueden identificar por la textura suave y curtida que es de color rojizo-marrón. Los adultos son de color grisáceo con una envergadura que pueden llegar a medir alrededor de 3.8 cm. Las alas anteriores del macho son de color gris con manchas blancas cerca de las puntas de las alas. Por el contrario, las alas delanteras de la hembra presenta las mismas características, pero las manchas son poco pronunciadas (Bohnenblust y Tooker, 2012).

Los huevos de *S. frugiperda* estas dispuestos en el follaje de la planta de maíz en masas de 100-200; las larvas eclosionan de 2-3 días. Normalmente presenta seis instares en el estado de larva más un estado de pupa que se da en el suelo. Las larvas de primer estado son capaces de producir un hilo de seda, lo que les permite caer o ser soplados (llamado vuelo en globo) a otras zonas (Barlow y Kuhar, 2009; Capinera, 2000). Los adultos de este insecto suelen tener hábitos nocturnos, iniciando la búsqueda de alimento en las horas de la tarde antes de que caiga el sol, así como también, se da el proceso de apareamiento. El ciclo de vida se completa en aproximadamente 30 días en verano (Luginbill, 1928; Spark, 1979).

Las larvas de *S. frugiperda* causan daños significativos al tejido vegetal en las plantas de maíz. Las larvas jóvenes consumen inicialmente un lado del tejido de la hoja, dejando intacta el otro lado de dicha hoja. Sin embargo, cuando se encuentran en el segundo o tercer estadio, las larvas empiezan a alimentarse desde el borde de la hoja hacia adentro y, a su vez, forman agujeros en estas. Cuando la alimentación de la larva se produce en el cogollo de la planta se presenta una fila de perforaciones características en las hojas. Las larvas en estadios mayores provocan defoliaciones extensas, dejando solo las

nervaduras y los tallos de las plantas de maíz o una apariencia de rasgado en las hojas. De igual forma, las larvas de esta plaga no solo se alimenta del follaje sino también de flores, yemas, cogollo entre otros, reduciendo la productividad de la planta a cero (Capinera, 2000).

1.3.2. *Spodoptera frugiperda* y sus biotipos

En 1986 Dorothy Pashley Prowell, encontró la presencia de biotipos de *S. frugiperda* cuando genotipificó con aloenzimas una población del insecto provenientes de cultivos de maíz, arroz y pasto, encontrando que los individuos tomados en maíz difieren significativamente en cinco aloenzimas de las poblaciones colectadas en arroz y pasto. Época en la cual fueron llamados por primera vez “biotipos”. Según Drès y Mallet (2002) éstos se caracterizan por: a) poblaciones que exhiben polimorfismos en pocos genes neutrales con insuficiente evidencia de asociación con una planta hospedera, b) razas hospederas que en simpatria se diferenciaron genéticamente, pero que presentan poca evidencia de hibridación o flujo genético, c) verdaderas razas hospederas con diferenciación genética demostrada y con niveles significativos de hibridación, d) especies hermanas con diferenciaciones genéticas marcadas que muestran bajas tasas de hibridación o cuya hibridación no ocurre. En consecuencia, las poblaciones de *S. frugiperda* se podrían considerar en una etapa de especiación.

Sin embargo, las técnicas moleculares han sido la mejor herramienta para realizar la identificación de estos dos biotipos maíz y arroz, puesto que, su frecuencia es mayor en estos cultivos, y a su vez son idénticos morfológicamente pero difieren en su fisiología y su composición genética. El biotipo de maíz, se ha encontrado asociado a cultivos de maíz, algodón y sorgo, por el contrario, el biotipo de arroz a cultivos de arroz y pastizales (Prowell 1986, Prowell 1998, Nagoshi y Meagher 2003a, 2004; Prowell et al. 2004). Los biotipos han sido hallados en diversos países, como lo son: Colombia (Vélez-Arango et al., 2008; Saldamando- Benjumea y Vélez-Arango 2010) Argentina (Clark et al. 2007, Nagoshi et al. 2012, Juárez et al. 2012), Brasil (Juárez et al. 2012), Costa Rica, México, República Dominicana, Puerto Rico (Prowell et al. 2004) y Estados Unidos (Prowell 1986, Lu et al. 1992, Lu et al. 1994, Meagher y Gallo-Meagher 2003, Nagoshi y Meagher 2003a, 2003b, 2004, Prowell et al. 2004, Nagoshi et al. 2007b).

A nivel molecular los biotipos de *S. frugiperda* presentan polimorfismo genético encontrándose que las esterasas B, C y D son únicas en el biotipo de maíz y las esterasas E y F están presentes solo en el biotipo de arroz, la presencia de híbridos exhiben una mezcla de las esterasas de ambos biotipos, por lo tanto, hay individuos que contienen esterasas B y F, C y E (Prowell 1986, Prowell et al. 2004). Por otro lado, se han realizado diversos estudios para la identificación molecular de los biotipos con el ADN mitocondrial en el gen Citocromo Oxidasa I por medio de una técnica de PCR RFLP en el cual se amplifica un fragmento de 569 pb, y luego, se generan unos cortes con las enzimas de restricción *MspI* y *SacI* por separado, con la primera enzima produce dos fragmentos uno de 497 pb y 72 pb únicamente en el biotipo de maíz mientras que en el biotipo de arroz no se genera digestión (Lu y Adang 1996, Levy et al. 2002, Meagher y Gallo-Meagher 2003, Vélez-Arango et al 2008), y con la segunda enzima se generan dos fragmentos uno de 459 pb y 110 pb solamente en el biotipo de arroz y no en el biotipo de maíz (Juárez et al. 2012). Estos biotipos a su vez han sido encontrados usando una región en tándem del ADN nuclear llamado FR (“For Rice strain”) que genera productos de amplificación mayores a 500 pb en forma de barrido (smear) únicamente en el biotipo

de arroz y de cero a tres bandas menores a 500 pb en el biotipo de maíz (Lu et al. 1994, Nagoshi y Meagher 2003a, 2004, Vélez-Arango et al 2008). De igual forma, se han usado otros marcadores moleculares como los AFLP's en insectos de Estados Unidos siendo este una herramienta útil para su identificación (McMichael y Prowell 1999, Busato et al 2004, Clark et al. 2007), sin embargo, Lobo Hernández y Saldamando Benjumea (2012), realizaron estudios con este marcador molecular en poblaciones de *S. frugiperda* provenientes de varios departamentos de Colombia (Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca) y encontraron una alta variabilidad genética en la especie respecto a este marcador, pero esta variabilidad fue tan alta que no se encontraron bandas diagnóstico para identificar a los biotipos de este insecto, por ello los autores concluyeron que los AFLP son útiles para trabajos en genética de poblaciones de esta polilla, pero no para identificar sus biotipos. Por esta razón, el uso de los marcadores moleculares COI y FR ha sido una herramienta indispensable para la identificación de los biotipos de *S. frugiperda* y también ha sido muy útil para la presencia de híbridos en este insecto. Nagoshi y Meagher (2003 a y b), Nagoshi et al. (2007a) y Vélez- Arango et al. (2008) han encontrado que los híbridos (entre los biotipos de maíz y arroz de este insecto presentan digestión con la enzima de restricción *MspI* y a su vez amplificaciones por encima de 500 pb de la región FR (++) , e híbridos sin digestión con la enzima *MspI* y fragmentos menores de 500 pb del marcador molecular FR.

1.3.3. Aislamiento reproductivo en los biotipos de *S. frugiperda*

S. frugiperda presenta dos "biotipos" que son indistinguibles morfológicamente a nivel de larva y de adulto, pero son reconocidos como posibles nuevas especies según Drès y Mallet (2002) o razas de plantas hospederas de maíz y arroz según Prowell (1988), puesto que se encuentran con mayor frecuencia en estos cultivos.

Estos biotipos han sido denominados especies verdaderas debido a que en ellos se han observado diferentes tipos de aislamiento reproductivo precigótico y postcigótico. En Estados Unidos y en Colombia se ha encontrado que el aislamiento precigótico es de varios tipos: 1) temporal: debido a que el biotipo de maíz tiende aparearse en los dos primeros tercios de la noche, mientras que el biotipo de arroz en el último tercio (Prowell et al. 1992, Scholf et al. 2009). Sin embargo, en Colombia no se encontró este tipo de temporalidad, pues ambos biotipos se apareaban al mismo tiempo en la noche. Los biotipos Colombianos, se diferencian en el ciclo de vida, pues el biotipo de maíz tiene un ciclo de vida más rápido que el biotipo de arroz, por lo cual cuando el primero es adulto, el segundo es una larva, esto puede impedir el flujo genético libre entre estos dos biotipos en la naturaleza (Velázquez-Vélez et al. 2011), 2) comportamental parcial: dado que rara vez las hembras del biotipo del maíz se aparean con los machos del biotipo del arroz, aunque el cruce recíproco si produce progenie (Prowell y Martin 1987, Saldamando et al. 2014), 3) químico: ya que en poblaciones de Florida (US) se ha encontrado que la composición de feromonas difiere entre los biotipos, puesto que las hembras del biotipo de maíz presentan una concentración mayor del componente de feromona Z11-16:Ac (m) que las hembras del biotipo de arroz, y menor concentración de los otros componentes (Z9-14:Ac (M), 14:Ac (a), Z11-14:Ac (b), 12:Ac (c), Z9-12:Ac, Z7-12:Ac (Groot et al. 2008); además se ha observado preferencia de machos por las feromonas de hembras de su mismo biotipo en el campo (Prowell et al. 1992); y 4) ecológico: debido a que los biotipos se ubican principalmente en dos plantas hospederas: maíz y arroz, significando que las hembras podrían diferenciarse en su comportamiento de oviposición (Prowell et al. 2004).

Respecto al aislamiento postcigótico entre los biotipos de *S. frugiperda*, un trabajo realizado por Groot et al. (2010) demostró una baja fertilidad de los individuos de las generaciones F1, F2 y retrocruces. Resultados similares, pero más amplios respecto a este tipo, fueron encontrados en Colombia, por Velásquez-Vélez et al. (2011), en los biotipos de *S. frugiperda* del Tolima, ya que ellos hallaron una inviabilidad en las hembras reducida particularmente en la generación F1, y una baja fertilidad en las líneas F1 y F2. Adicionalmente, ellos observaron que hubo una reducción en el peso de las pupas de las generaciones híbridas y una diferencia significativa en el tiempo de desarrollo, siendo el biotipo de maíz el más rápido en su crecimiento comparado con el biotipo de arroz.

Otra investigación en la que también se encontró aislamiento reproductivo en *S. frugiperda* fue la realizada por López-Edwards et al. (1999) en México, en la que cruces de adultos entre poblaciones aisladas geográficamente de cultivos de maíz, no produjeron progenie (cruces entre individuos de Aguascalientes (del centro de México), Yucatán (del Golfo de México) y Nuevo León (del Golfo de México) vs. individuos de Colima y Sinaloa (ambas de la costa Pacífica).

1.3.4. Biotipos de *S. frugiperda* y su tolerancia a insecticidas y al *Bacillus thuringiensis*

Bajo condiciones de laboratorios varias investigaciones han encontrado que los biotipos de *S. frugiperda*, presentan una respuesta diferencial de tolerancia a insecticidas y al *B. thuringiensis*. En Estados Unidos se encontró que las larvas del biotipo del maíz son más tolerantes a insecticidas como el carbaril, diazinon, cipermetrina, metil paration y metomil, respecto a las larvas del biotipo del arroz, además, este biotipo es más tolerante a cultivos transgénicos de algodón que contienen la endotoxina (Cry1Ac) del *B. thuringiensis* (Adamczyk et al. 1997). En Colombia, bajo condiciones de laboratorio, también se demostró que la susceptibilidad de los biotipos a insecticidas y a endotoxinas difiere entre ellos, puesto que el biotipo de maíz es más susceptible a los insecticidas lambdacialotrina y metomil que el biotipo de arroz (Ríos-Diez y Saldamando-Benjumea 2011). No obstante, lo contrario ocurre con las endotoxinas del *B. thuringiensis*, debido a que el biotipo de arroz es más susceptible a las endotoxinas Cry1Ac y Cry1Ab que el biotipo de maíz (Ríos-Diez et al. 2012). Estos últimos resultados corroboran un trabajo realizado por Zenner de Polanía et al. (2008) en el que se encontró que poblaciones del insecto provenientes de maíz son más tolerantes al Cry1Ac que las poblaciones de arroz. Sin embargo, en este último, no se genotipificaron las larvas de *S. frugiperda* colectadas en dichos cultivos, lo cual es indispensable, puesto que, Vélez-Arango et al. (2008) demostró que el biotipo de arroz también puede encontrarse en cultivos de maíz en bajas proporciones.

Los resultados encontrados en Colombia y en Estados Unidos sobre la susceptibilidad a insecticidas y al *B. thuringiensis* son diferentes entre estos dos países, puesto que, en condiciones del laboratorio, en Colombia el biotipo de arroz es más tolerante a insecticidas que el biotipo de maíz, mientras que en Estados Unidos ocurre lo contrario. Además, a pesar de que en ambos países el biotipo de maíz es más tolerante a las endotoxinas Cry1Ac y Cry1Ab que el biotipo de arroz en el laboratorio, las concentraciones que toleran las poblaciones colombianas son superiores (Ríos-Diez y Saldamando-Benjumea 2011, Ríos-Diez et al. 2012). Estos resultados se podrían

explicar por el origen de las poblaciones evaluadas: país tropical vs templado, puesto que, difieren tanto en el manejo de los cultivos, así como también, en la estructura poblacional encontrada entre ambos lugares como lo reportaron Salinas-Hernández y Saldamando-Benjumea (2011) en un trabajo basado en la secuenciación del gen de la citocromo oxidasa I con el que encontraron que no existe flujo genético entre las poblaciones de este insecto entre estos dos países, por ello las respuestas a insecticidas y a controles biológicos difieren entre estas dos localidades, ya que no tienen contacto genético. De la misma manera, dado que hay un flujo genético reducido entre los biotipos de maíz y arroz del Tolima, el traspaso de genes que confieren resistencia a insecticidas y al *B. thuringiensis* es restringido entre estas dos poblaciones, ya que como lo reportaron Saldamando y Vélez-Arango (2010) y Velásquez Vélez et al. (2011) la posibilidad de hibridación entre ellos es muy baja en la naturaleza. En el trabajo realizado por Vélez-Arango et al. (2008) un bajo porcentaje de híbridos entre los biotipos fue encontrado en departamento del Tolima. Estos híbridos presentan la combinación de los genomas de los biotipos de maíz y arroz, por lo que pudieron haber heredado los genes que confieren resistencia a insecticidas y al *B. thuringiensis*. El bajo número de híbridos entre estos dos biotipos se podría explicar por la baja viabilidad y fertilidad hallada en las hembras F1 (Velásquez-Vélez et al. 2011), por lo que las densidades de sus poblaciones sería baja en la naturaleza, y por lo tanto, el número de individuos que portaría los genes que confieren resistencia a controles químicos y biológicos sería bajo.

1.4. Metodología

1.4.1. Recolección del insecto

Se colectaron larvas en los cultivos de maíz (*Zea mays* L.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), sorgo (*Sorghum* spp.), sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), arroz (*Oryza sativa*), algodón (*Gossypium hirsutum*) y pasto mulato (*Brachiaria* Híbrida cv. Mulato II) en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca. Los insectos colectados se transportaron en etanol al 70% en tubos eppendorf de 1.5 ml y se enviaron al laboratorio de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB en la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) en donde fueron almacenados a -80°C.

1.4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN de *S. frugiperda* se realizó por el método CTAB (Vélez-Arango et al. 2008), con algunas modificaciones. Se maceró la cabeza o el dorso abdominal de la larva, luego se homogenizó con buffer CTAB (100 mM Tris-HCL pH 8.0, 1.4M NaCl, 0.02M EDTA, 2x CTAB) precalentado a 65°C, y se añadió 4 µL de β-mercaptoetanol por 30 minutos; cada 5 minutos se mezcla por inversión. Luego, se agrega 400 µL de Cloroformo- Alcohol Isoamílico (24:1) se llevó a centrifugar a 13000 rpm por 6 minutos a 4°C; el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se agregó un volumen equivalente de Cloroformo; se homogenizó y se centrifugó a 13000 rpm por 6 minutos a 4°C; este paso fue repetido. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se agregó un volumen equivalente de Isopropanol y la muestra se incubó a -20°C por 2 horas. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 13000 rpm por 6 minutos a 4°C. El pellet se lavó con 200 µL de etanol al 100% y se centrifugó 13000 rpm por 5 minutos a 4°C; este proceso se repitió, pero con etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 50 µL de agua ultrapura estéril. Finalmente, se agregó 1.5 µL de RNasa a cada tubo y se incubó por 1 hora a 37°C.

1.4.3 PCR RFLP de la región COI del ADN mitocondrial

El gen de interés que hace parte del ADN mitocondrial se amplificó mediante una PCR en 20 µL de mezcla de reacción que contiene 2 µL de buffer de Taq polimerasa (10X) (Thermo Scientific), con (NH₄)₂ SO₄, 1.2 µL de MgCl₂ (25 mM) (Thermo Scientific), 0.4 µL de dNTPs (10 µM) (Thermo Scientific), 0.8 µL del cebador forward JM76 (5' GAGCTGAATTAGG(G/A)ACTCCAGG 3') (10 µM), 0.8 µL del cebador reverse JM77 (5' ATCACCTCC(A/T)CCTGCAGGATC 3') (10 µM) (Biodiagnóstica Ltda), 0.4 µL de Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific), 13.4 µL de agua ultrapura estéril y 1.0 µL de ADN (~50 ng).

Para la PCR se realizó con un ciclo inicial de 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 62°C por 1 min y 72°C por un min, y un ciclo de extensión final de 72°C por 10 min. Posteriormente, se realizaron dos digestiones, la primera con la enzima de restricción *MspI* (Thermo Scientific) y, la segunda, con la enzima de restricción *SacI* (Thermo Scientific) por separado. La segunda enzima fue utilizada en los casos en los que el marcador nuclear FR no amplificó en la muestra o su banda era difícil de interpretar. Para ambas enzimas se usaron las siguientes condiciones, se tomó 2.0 µL de

buffer Tango (10X), 0.5 μ L de la enzima *MspI*/*SacI*, 3 μ L del producto de la PCR, se completó con 9.5 μ L de agua y se incubó por 2 horas. Posteriormente, las muestras analizadas en un gel de agarosa al 2.0% y visualizadas con GelRed™ (Biotium) en un transiluminador UV.

1.4.4 PCR de la región FR del ADN nuclear

Para la amplificación de la región FR en *S. frugiperda*, se realizaron reacciones de 20 μ L de PCR que contienen 2 μ L de buffer de Taq polimerasa (10X) (Thermo Scientific), con (NH₄)₂ SO₄, 1.2 μ L de MgCl₂ (25 mM) (Thermo Scientific), 0.4 μ L de dNTPs (10 μ M) (Thermo Scientific), 0.8 μ L del cebador forward FR-a (5' TTTTACACCGGTCACAACGA 3') (10 μ M), 0.8 μ L del cebador reverse FR-2 (5' GACATAGAAGAGCACGTTT 3') (10 μ M) (Biodiagnóstica Ltda), 0.4 μ L de Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific), 13.4 μ L de agua tipo I estéril y 1.0 μ L de ADN (100 ng).

En el termociclador, se utilizó un ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguido por un ciclo extra de 72°C por 10 minutos. Las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 2.2% y visualizadas con GelRed™ (Biotium) en un transiluminador UV.

1.4.5 Análisis estadístico

Además, dado que los datos de los biotipos de *S. frugiperda* son categóricos, dos tablas de contingencia (Sokal y Rohlf 1995) fueron ejecutadas en Past 1,34 (Hammer et al. 2001) para evaluar asociación con la planta hospedera en los biotipos de *S. frugiperda* a sus respectivas plantas hospedantes.

1.4.6 Análisis de diferenciación molecular

Se realizó una matriz de datos binarios para cada marcador, que representa la presencia (1) o ausencia (0) de una banda. Marcadores *MspI*, *SacI* y FR se consideraron como marcadores dominantes, ya que los dos primeros (marcadores) son de herencia materna y son parte de los genes que se encuentran en la mitocondria la cual es la subunidad mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) (Levy et al. 2002), mientras que el tercer marcador produce, ya sea un patrón de smear superior a 500 pb o 0-3 bandas tenues con peso molecular inferior a 500 pb. Este último marcador se cree que está relacionado con los cromosomas Y y X en *S. frugiperda* (Nagoshi y Meagher 2003a) y, por lo tanto, considerado diploide. Dado que ambos marcadores son dominantes, el equilibrio Hardy Weinberg no se asumió en este estudio (Excoffier et al. 1992), y un AMOVA (Análisis de varianza molecular) se utilizó con el fin de determinar si existe diferenciación genética de los biotipos de *S. frugiperda* en los diversos cultivos tenidos en cuenta en este trabajo y en los departamentos en los que las muestras fueron colectadas.

Para realizar el análisis de estructura poblacional se realizó el análisis de la AMOVA por separado para cada marcador molecular con el software GenAlEx 6 (Peakall y Smouse 2006) y siguiendo los métodos de Excoffier et al. (1992). El mismo software fue empleado para calcular las distancias genéticas de Nei para obtener posteriormente un dendrograma UPGMA (Método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada) en el software Mega 4.0 (Tamura et al. 2007). Las distancias genéticas de

Nei fueron escogidas en este estudio, ya que no asumen equilibrio de Hardy Weinberg (Hedrick 2004).

1.4.7 AMOVA (Analysis of Molecular Variance)

El AMOVA es un método estadístico relativamente reciente que tiene como base un análisis de varianza (Tabla xx) y permite la partición de la variación genética entre poblaciones y regiones, además de la estimación del estadístico F y/o sus análogos, éste análisis permite el uso de datos de muchos tipos de marcadores y ofrece un prueba estadística con permutaciones al azar (Peakall y Smouse 2006). El AMOVA, fue inicialmente desarrollado para estimar la estructura genética de poblaciones usando un análisis de varianza en poblaciones con frecuencias moleculares haplotípicas de organismos haploides, sin embargo, este mismo modelo también puede ser usado para organismos diploides (Michalakis y Excoffier 1996). Los estadísticos F estiman la diversidad genética entre, dentro y total de una población muestreada, en este trabajo se usó el estadístico Φ_{ST} análogo al F_{ST} , debido a que puede ser usado para datos haploides y binarios de organismos diploides, mientras que por el contrario, el F_{ST} fue desarrollado por Wright para el análisis de datos codominantes (Peakall y Smouse 2012).

Tabla xx. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), P es el número de poblaciones muestreadas, N_i es el tamaño de cada muestra y $N = \sum N_i$ es el número total de individuos. gl : grados de libertad, SSD : desviación de la suma de cuadrados, MSD : media de la desviación de los cuadrados, $E(MSD)$: media esperada de la desviación de los cuadrados.

Fuente de Variación	gl	SSD	MSD	$E(MSD)$
Entre poblaciones	$P - 1$	$SSD(AP)$	$SSD(AP)/(P - 1)$	$\sigma_w^2 + n' \sigma_a^2$
Entre genes dentro de poblaciones	$2N - P$	$SSD(WP)$	$SSD(WP)/(2N - P)$	σ_w^2
Total	$2N - 1$	$SSD(T)$		

En el caso del Φ_{ST} , cada haplotipo i es tratado como un vector de un estado alélico a_i , de dimensión igual al número de loci considerados (m), entonces $a_i = [a_{i1}, a_{i2}, a_{i3} \dots a_{im}]'$. Φ_{ST} es obtenido como el cociente de la varianza estimada debido a diferencias entre las poblaciones (σ_a^2) sobre la varianza total estimada ($\sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_w^2$) (Michalakis y Excoffier 1996, Peakall y Smouse 2006):

$$\phi_{ST} = \frac{\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}^2}$$

El Φ_{ST} , en términos de las desviaciones de la suma de cuadrados (SSD_S) se define de la siguiente forma (Michalakis y Excoffier 1996):

$$\hat{\phi}_{ST} = \frac{(2N - P)SSD(T) - (2N - 1)SSD(WP)}{(2N - P)SSD(T) - (2N - 1 - b)SSD(WP)}$$

Donde b es igual a $n'(P - 1)$, y n' es igual a:

$$n' = \frac{1}{P-1} \left(2N - \sum_{i=1}^P \frac{(2N_i)^2}{2N} \right)$$

La desviación de la suma de cuadrados (SSD) es la función de los vectores haplotípicos:

$$SSD(T) = \frac{1}{2N} \sum_{i=1}^{i=1} \sum_{j=1}^{j=1} \delta_{ij}^2$$

$$SSD(WP) = \sum_{r=1}^r=1 \frac{1}{2N_r} \sum_{i=1}^{i=1} \sum_{j=1}^{j=1} \delta_{ij}^2$$

Donde N es el tamaño de la muestra que se está analizando y δ_{ij}^2 es una distancia Euclidiana ajustada entre los haplotipos i y j definidos como:

$$\delta_{ij}^2 = (a_i - a_j)'W(a_i - a_j)$$

Siendo W una matriz de $m \times m$ que permite que se observen las interacciones entre loci. Si los loci se asumen como independientes y se les da igual peso, W es la matriz de identidad I , donde:

$$\delta_{ij}^2 = \sum_{k=1}^m (a_{ik} - a_{jk})^2$$

Bajo este supuesto de independencia entre locus, la desviación de la suma de cuadrados puede dividirse en componentes de locus simples (m):

$$\hat{\phi}_{ST} = \frac{(2N-P) \sum_{i=1}^m SSD(T)_i - (2N-1) \sum_{i=1}^m SSD(WP)_i}{(2N-P) \sum_{i=1}^m SSD(T)_i - (2N-1-b) \sum_{i=1}^m SSD(WP)_i}$$

Que es igual a:

$$\begin{aligned} & \sum_{k=1}^m \hat{\sigma}_{ai}^2 \\ &= \frac{\sum_{k=1}^m \hat{\sigma}_{ai}^2}{m} \\ & \sum_{k=1}^m \sigma_i^2 \end{aligned}$$

El AMOVA considera entonces a cada locus como independiente dado que $W = I$ (Michalakis y Excoffier 1996).

Para realizar el AMOVA cuando se tienen datos haploides de organismos diploides se deben generar haplotipos simulados con los que se calculan las frecuencias para construir una matriz de distancias euclidianas (Michalakis y Excoffier 1996), por esta razón se usó la distancia genética binaria propuesta por Huff *et al.* (1993) y usada por el programa GenAEx 6.5 (Peakall y Smouse 2012), es una modificación de la distancia métrica de Nei en una distancia euclidiana que corrige los estimadores de diferenciación poblacional (Huff *et al.* 1993). El AMOVA prueba la significancia de la diferenciación de

subpoblaciones que no son consideradas parte de una población total donde ocurre apareamiento aleatorio, basándose en estimaciones a partir de 99 a 99999 permutaciones al azar. Si los loci que componen los haplotipos son estadísticamente independientes, las permutaciones de los haplotipos simulados a lo largo de las poblaciones generan procedimiento conservador en el sentido que los niveles de significancia pueden ser sobrestimados porque la distribución empírica nula puede ser más platicúrtica que la verdadera distribución nula (Michalakis y Excoffier 1996).

Adicionalmente, el AMOVA determina el número de migrantes (Nm) con la siguiente fórmula, siguiendo el enfoque de los estadísticos F de Wright:

$$Nm = \frac{(\frac{1}{F_{ST}}) - 1}{4}$$

Finalmente, la distancia genética de Nei (D_{Nei}) fue utilizada en este trabajo, para cada uno de los marcadores, con el propósito de observar si los biotipos presentaban agrupaciones relacionadas con los cultivos donde fueron colectadas las larvas (maíz, algodón, sorgo, caña de azúcar, pasto, sorgo dulce y arroz). La distancia de Nei asume un modelo infinito de mutación en isoalelos, en los cuales la tasa de mutación neutral se genera por la evolución de alelos completamente nuevos en las poblaciones de estudio (Nei 1973, 1975). Esta tasa de mutación es constante y existe un equilibrio entre la mutación y la deriva genética de las poblaciones, donde el tamaño efectivo (N_e) permanece constante. Esta distancia genética no asume equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei 1973, 1975), por esta razón fue usada para el análisis de los datos de este estudio. La distancia de Nei se define como (Nei 1979):

$$D_{Nei} = -\ln(I)$$

Donde I es la identidad genética que se define como:

$$I = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}}$$

Donde:

$$\begin{aligned} J_{XY} &= \sum p_{ix} p_{iy} \\ J_X &= \sum p_{ix} \\ J_Y &= \sum p_{ij} \end{aligned}$$

p_{ix} y p_{iy} son las frecuencias del alelo i en las poblaciones x y y . Para múltiples loci J_{XY} , J_X y J_Y son calculados sumando todos los loci y alelos y dividiendo por el número de loci (Peakall y Smouse 2006).

2. Capítulo 2

2.1. Resultados

2.1.1. Identificación de los biotipos de *S. frugiperda*

Figura 2- 1: Amplificaciones de los productos de PCR-RFLP del gen COI (569 pb) y sus respectivas digestiones con la enzima *MspI* (497 pb y 72 pb). Muestras de maíz del Meta que presentan digestión (biotipo de maíz). M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb, CP-: Control Negativo de la PCR, CD-: Control Negativo de la digestión, C+: Control Positivo.

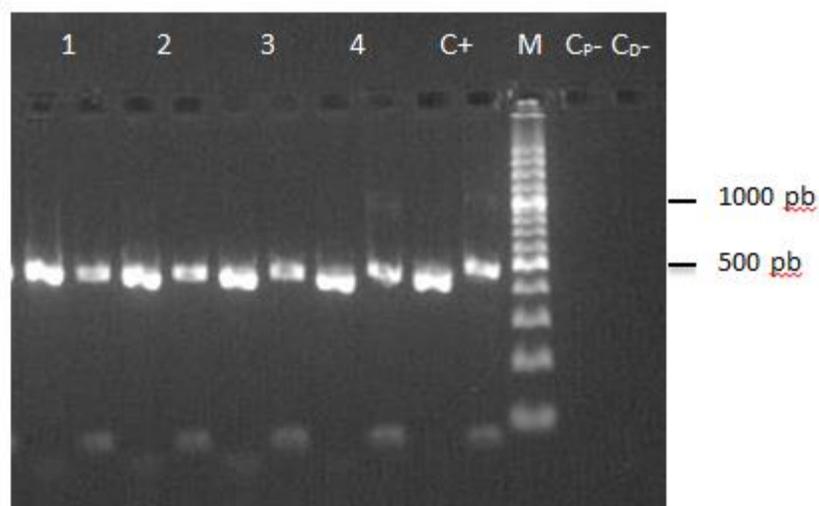


Figura 2- 2. Amplificaciones de los productos de PCR-RFLP del gen COI (569 pb) y sus respectivas digestiones con la enzima *SacI* (419 pb y 150 pb). Muestras de arroz del Valle del Cauca que presentan digestión (biotipo de arroz). M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb, CP-: Control Negativo de la PCR, CD-: Control Negativo de la digestión C+: Control Positivo

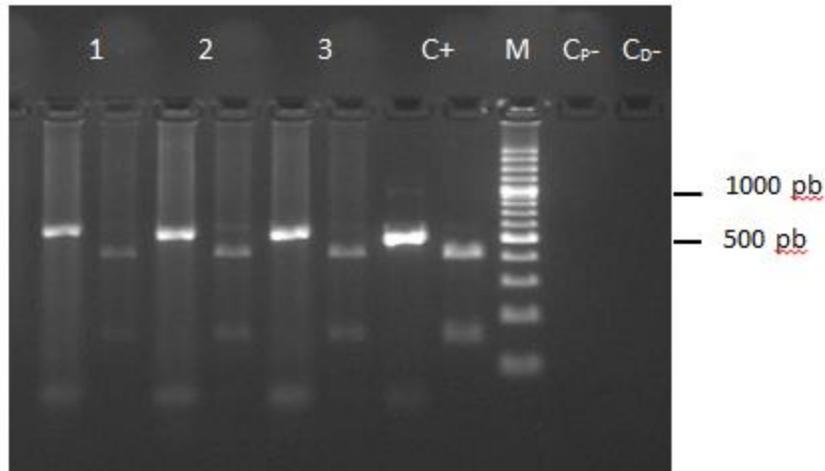
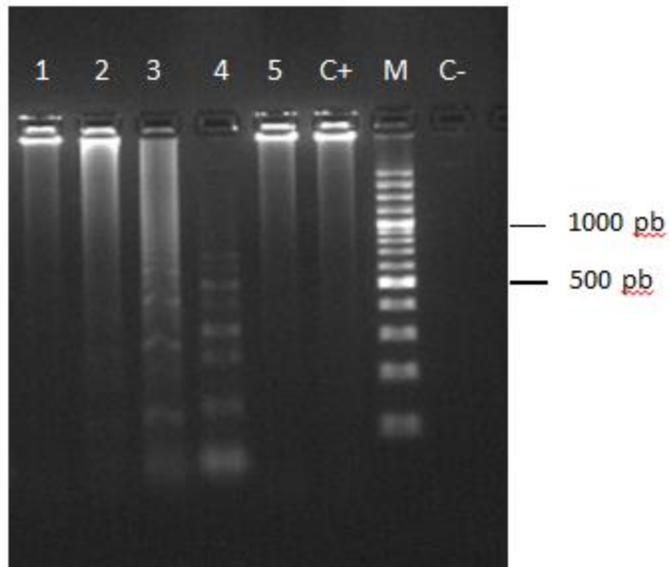


Figura 2- 3. Amplificaciones de los productos de PCR de la región FR del ADN nuclear. Muestras de pasto mulato de Córdoba (biotipo de arroz) fragmentos por encima de 500 pb. M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb, C-: Control Negativo, C+: Control Positivo.



Con el fin de verificar la presencia de los biotipos de *S. frugiperda* y conocer su distribución en Colombia se realizó el muestreo en los departamentos de Tolima, Valle del Cauca, Meta y Córdoba donde se cultivan maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), sorgo dulce (*Sorghum saccharum*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), algodón (*Gossypium hirsutum*) y pasto mulato (*Brizantha Mulatto*). En total se genotipificaron 348 larvas del gusano cogollero, donde 258 individuos fueron identificados como biotipo de maíz, y 66 individuos fueron genotipificados como biotipo de arroz (Tabla 1). Para esto, se utilizó una PCR-RFLP cortando con la enzima de restricción *MspI* (Figura 1) y otra PCR-RFLP cortando con la enzima *SacI* (Figura 2), y finalmente, una PCR de la región en tándem FR (Figura 3). Los resultados arrojados en la investigación se muestran a continuación:

Tabla 2- 1. Número de larvas de *S. frugiperda* genotipificadas provenientes de siete plantas hospederas diferentes recolectadas en cuatro departamentos de Colombia.

Departamento	Cultivo	Individuos	Categoría
Tolima	Maíz	36	26 Biotipo de Maíz
			5 Biotipo de Arroz
			5 Híbridos
Córdoba	Arroz	16	11 Biotipo de Maíz
			5 Híbridos
	Sorgo Dulce	24	24 Biotipo de Maíz
	Maíz	20	19 Biotipo de Maíz
			1 Híbrido
	Pasto Mulato	34	7 Biotipo de Maíz
			27 Biotipo de Arroz
	Algodón	27	17 Biotipo de Maíz
			9 Biotipo de Arroz
			1 Híbrido
Sorgo	12	6 Biotipo de Maíz	
		3 Biotipo de Arroz	
		3 Híbrido	
Meta	Sorgo	24	24 Biotipo de Maíz
			50 Biotipo de Maíz
	Maíz	52	1 Biotipo de Arroz
			1 Híbrido
	Arroz	18	9 Biotipo de Maíz
5 Biotipo de Arroz			
4 Híbrido			
Valle del Cauca	Sorgo	24	24 Biotipo de Maíz
			16 Biotipo Arroz
	Arroz	17	1 Híbrido
			22 Biotipo de Maíz
	Maíz	23	1 Híbrido
19 Biotipo de Maíz			
Caña de Azúcar	21	2 Híbrido	

Adicionalmente, se realizaron tablas de contingencia para determinar la distribución de los biotipos de *S. frugiperda* en los departamentos del Tolima, Córdoba, Meta y Valle del Cauca, además, de establecer con qué frecuencia se encuentran los biotipos de este insecto en cada uno de los cultivos (Tabla 2 y 3). Se encontró que el biotipo de maíz es más frecuente que el biotipo de arroz (Figura 4). También, se evidenció que el biotipo de maíz presenta una alta asociación con su planta hospedera, seguido de sorgo, sorgo dulce, arroz, caña de azúcar, algodón y pasto mulato (Figura 5a). Así mismo se observó que el biotipo de arroz se encuentra asociado a su planta hospedera seguido de pasto mulato, algodón, maíz y sorgo (Figura 5b). La asociación de los biotipos a su planta hospedera puede estar dado por una posible preferencia de las hembras a ovipositar en estos cultivos. Dichos resultados coinciden con lo registrado por Vélez-Arango et al. (2008) cuando se analizaron las poblaciones de *S. frugiperda* provenientes del departamento del Tolima. Asimismo, la presencia de los biotipos e híbridos con los dos marcadores se puede observar en la figura 5c.

Tabla 2- 2. Tabla de contingencia para los marcadores moleculares COI, FR y los dos marcadores en conjunto para determinar la distribución diferencial de los biotipos de *S. frugiperda* y sus híbridos en los cuatro departamentos. TM: Tolima-maíz, CA: Córdoba-arroz, CSD: Córdoba-sorgo dulce, CM: Córdoba maíz, CPM: Córdoba- pasto mulato, CAL: Córdoba- algodón, CS: Córdoba- sorgo, MS: Meta-sorgo, MM: Meta- Maíz, MA: Meta arroz, VS: Valle del Cauca- sorgo, VA: Valle del Cauca- arroz, VM: Valle del Cauca- maíz, VC: Valle del Cauca- caña de azúcar.

Marcador COI	TM	CA	CSD	CM	CPM	CAL	CS	MS	MM	MA	VS	VA	VM	VC	P
Maíz	0	13	24	19	7	16	8	24	51	9	24	0	21	19	P <0,0001
Arroz	10	3	0	1	28	11	4	0	1	9	0	17	2	2	
Marcador Fr- a/SacI	TM	CA	CSD	CM	CPM	CAL	CS	MS	MM	MA	VS	VA	VM	VC	P
Maíz	29	12	24	20	7	17	6	24	51	9	24	0	23	21	P <0,0001
Arroz	5	4	0	0	27	10	6	0	1	9	0	17	0	0	
Marcadores en conjunto	TM	CA	CSD	CM	CPM	CAL	CS	MS	MM	MA	VS	VA	VM	VC	P
Maíz	26	11	24	19	7	17	6	24	50	9	24	0	22	19	1,21*10 ⁻³⁸
Arroz	5	0	0	0	27	9	3	0	1	5	0	16	0	0	
Híbrido (++)	0	2	0	0	0	0	3	0	1	4	0	0	0	0	
Híbrido (--)	5	3	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	2	

P<0,0001

Tabla 2- 3. Tabla de contingencia para los marcadores moleculares COI, FR y los dos marcadores en conjunto para determinar la distribución diferencial de los biotipos e híbridos de *S. frugiperda* en los diferentes cultivos. $P < 0,0001$. TM: Tolima-maíz, CA: Córdoba-arroz, CSD: Córdoba-sorgo dulce, CM: Córdoba maíz, CPM: Córdoba- pasto mulato, CAL: Córdoba- algodón, CS: Córdoba- sorgo, MS: Meta-sorgo, MM: Meta- Maíz, MA: Meta arroz, VS: Valle del Cauca- sorgo, VA: Valle del Cauca- arroz, VM: Valle del Cauca-maíz, VC: Valle del Cauca- caña de azúcar.

Marcador COI	MAÍZ	ARROZ	SORGO DULCE	PASTO	ALGODÓN	SORGO	CAÑA	P
Maíz	91	22	24	7	16	56	19	$P < 0,0001$
Arroz	14	29	0	28	11	4	2	
Marcador Fr- a/SacI	MAÍZ	ARROZ	SORGO DULCE	PASTO	ALGODÓN	SORGO	CAÑA	P
Maíz	123	21	24	7	17	54	21	$P < 0,0001$
Arroz	6	30	0	27	10	6	0	
Marcadores en conjunto	MAÍZ	ARROZ	SORGO DULCE	PASTO	ALGODÓN	SORGO	CAÑA	P
Maíz	117	20	24	7	17	54	19	$P < 0,0001$
Arroz	6	21	0	27	9	3	0	
Híbrido (++)	1	6	0	0	0	3	0	
Híbrido (--)	7	4	0	0	1	0	2	

$P < 0,0001$

Figura 2- 4. Distribución de los biotipos e híbridos de *S. frugiperda* en los departamentos por cultivo. TM: Tolima-maíz, CA: Córdoba-arroz, CSD: Córdoba-sorgo dulce, CM: Córdoba maíz, CPM: Córdoba- pasto mulato, CAL: Córdoba- algodón, CS: Córdoba-sorgo, MS: Meta-sorgo, MM: Meta- Maíz, MA: Meta arroz, VS: Valle del Cauca- sorgo, VA: Valle del Cauca- arroz, VM: Valle del Cauca-maíz, VC: Valle del Cauca- caña de azúcar.

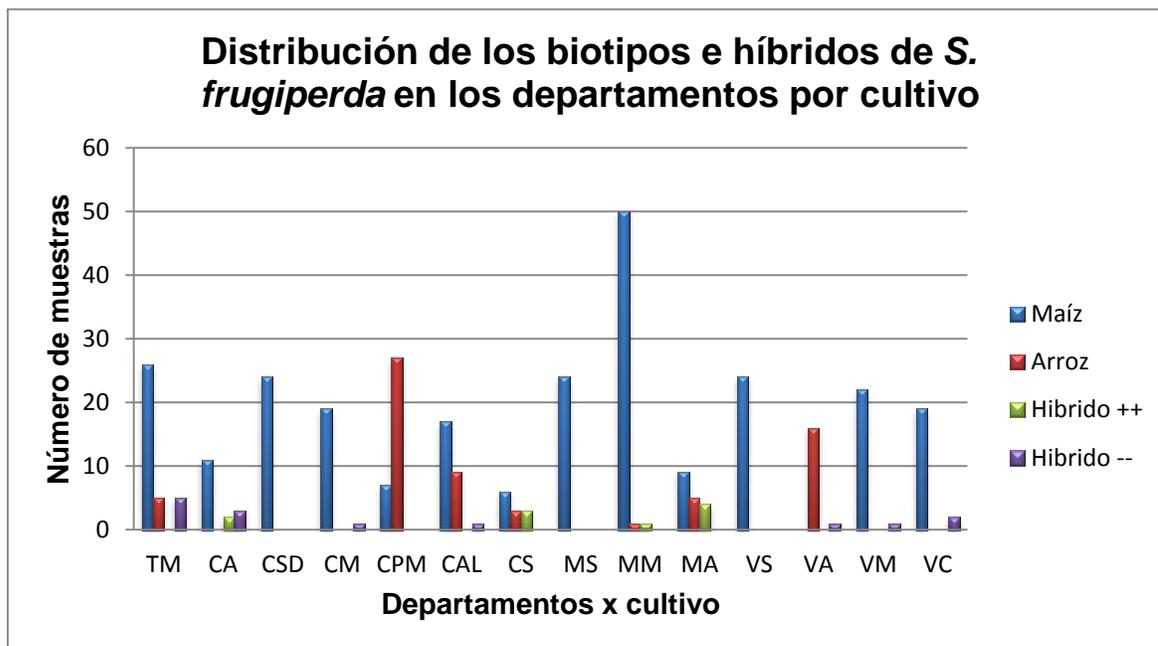


Figura 2- 5. Individuos de *S. frugiperda* clasificados como biotipo de maíz y arroz. a) Distribución de biotipos por cultivo usando la región COI. b) Distribución de biotipos por cultivo usando la región FR. c) Distribución de biotipos e híbridos por cultivo usando las dos regiones

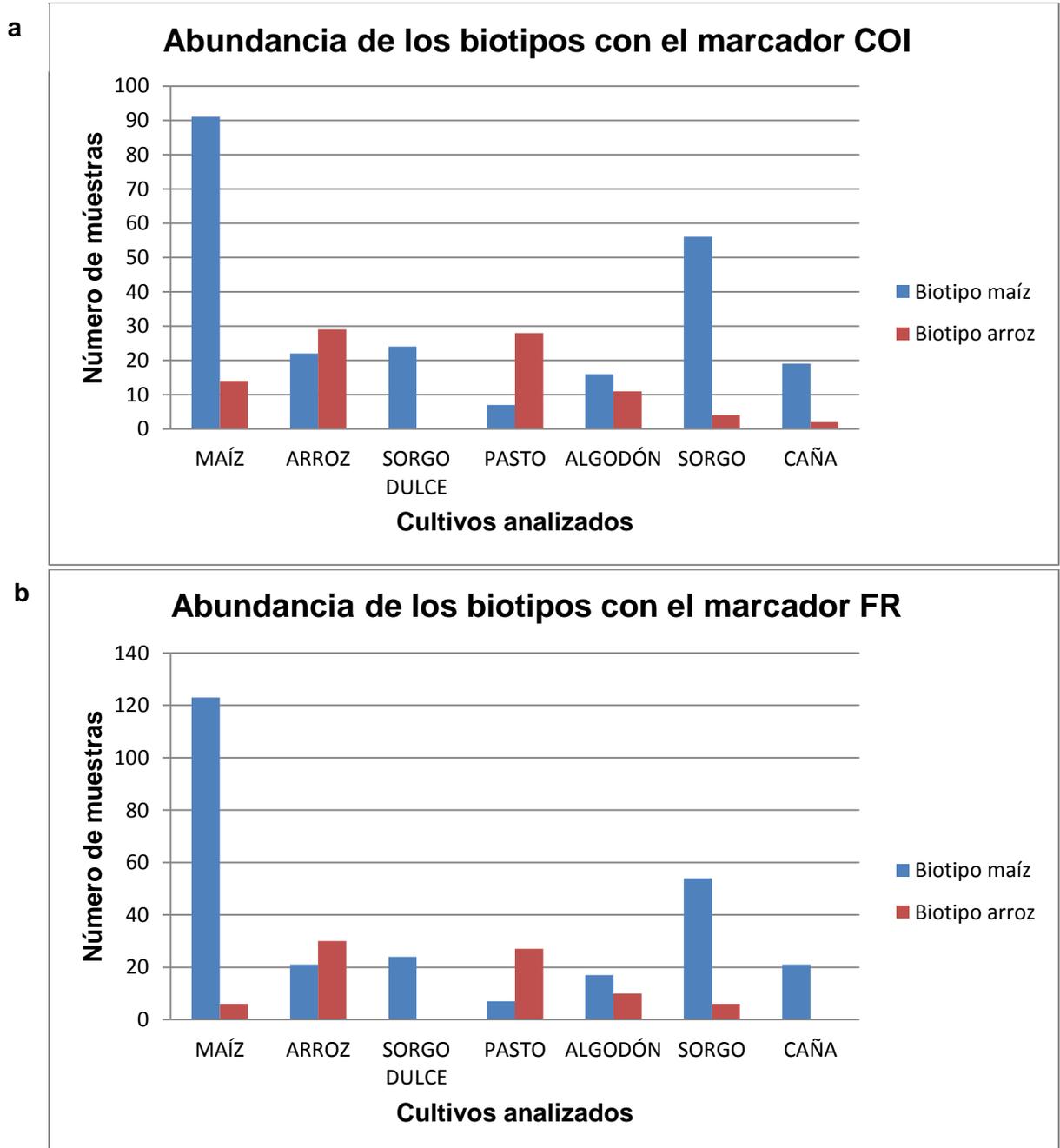
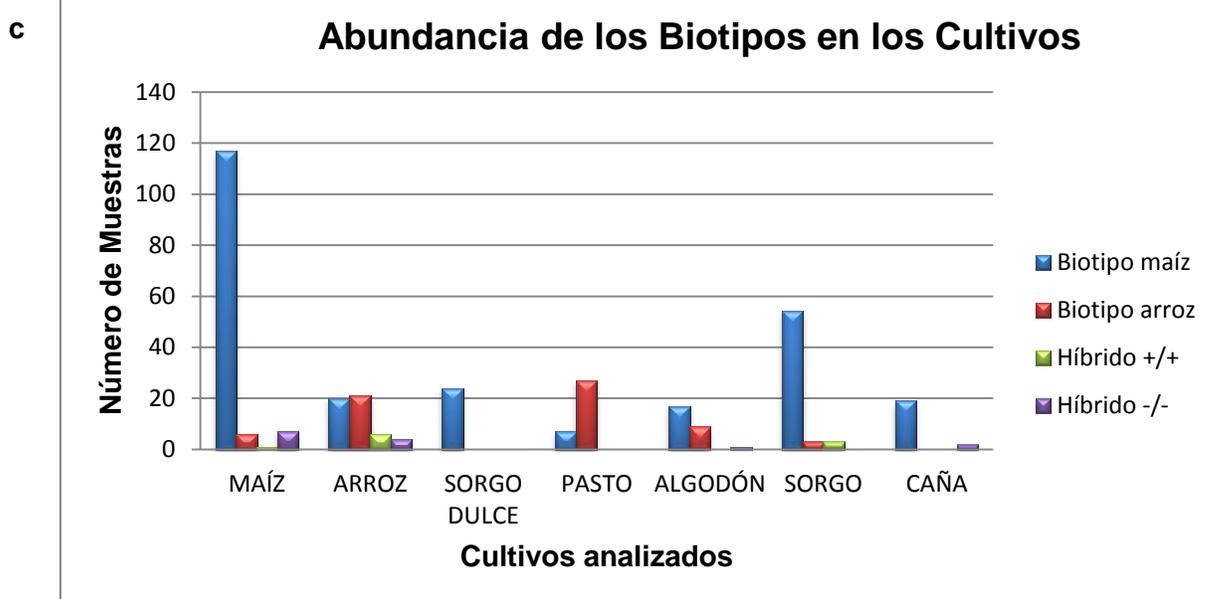


Figura 2-5: (Continuación)



Finalmente, se realizó un análisis de varianza molecular AMOVA y se determinaron los valores F_{st} pareados para la región COI y región en tándem FR (Tabla 4 y 5), utilizando el programa GenALEx 6.5 (Peakall, and Smouse, 2012) siendo los valores de Φ_{iPT} significativos. Se generaron dos dendrogramas basado en distancias pareadas de F_{st} y el algoritmo UPGMA para ambas regiones (Figura 6 y 7). Las topologías de los dos árboles son similares, ya que con ambos marcadores moleculares la presencia de los biotipos se puede observar por sitios geográficos. De igual forma, se puede vislumbrar que en aquellos cultivos en donde solo hubo presencia del biotipo de arroz como lo son Córdoba (pasto) y Valle del Cauca (arroz) presentan mayores distancias genéticas UPGMA con respecto a las demás.

Tabla 2- 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para la región COI entre y dentro de las poblaciones de *S. frugiperda*. gl: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, Var: varianza estadística P: probabilidad

Fuente	gl	SC	CM	Var.	%	PhiPT	P
Entre (hospederas)	13	30,37	2,34	0,08	38%		
Dentro (departamentos y hospederas)	357	49,73	0,14	0,14	62%	0,376	0,001
Total	370	80,1	2,48	0,22	100%		

Tabla 2- 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para la región FR entre y dentro de las poblaciones de *S. frugiperda*. gl: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, Var: varianza estadística, P:probabilidad.

Fuente	gl	SC	CM	Var.	%	PhiPT	P
Entre (hospederas)	13	31,36	2,41	0,09	51%		
Dentro (departamentos y hospederas)	341	30,61	0,09	0,09	49%	0,508	0,001
Total	354	61,97	2,5	0,18	100%		

Figura 2- 6. Dendrograma basado en distancias de Nei y el algoritmo UPGMA para el marcador COI.

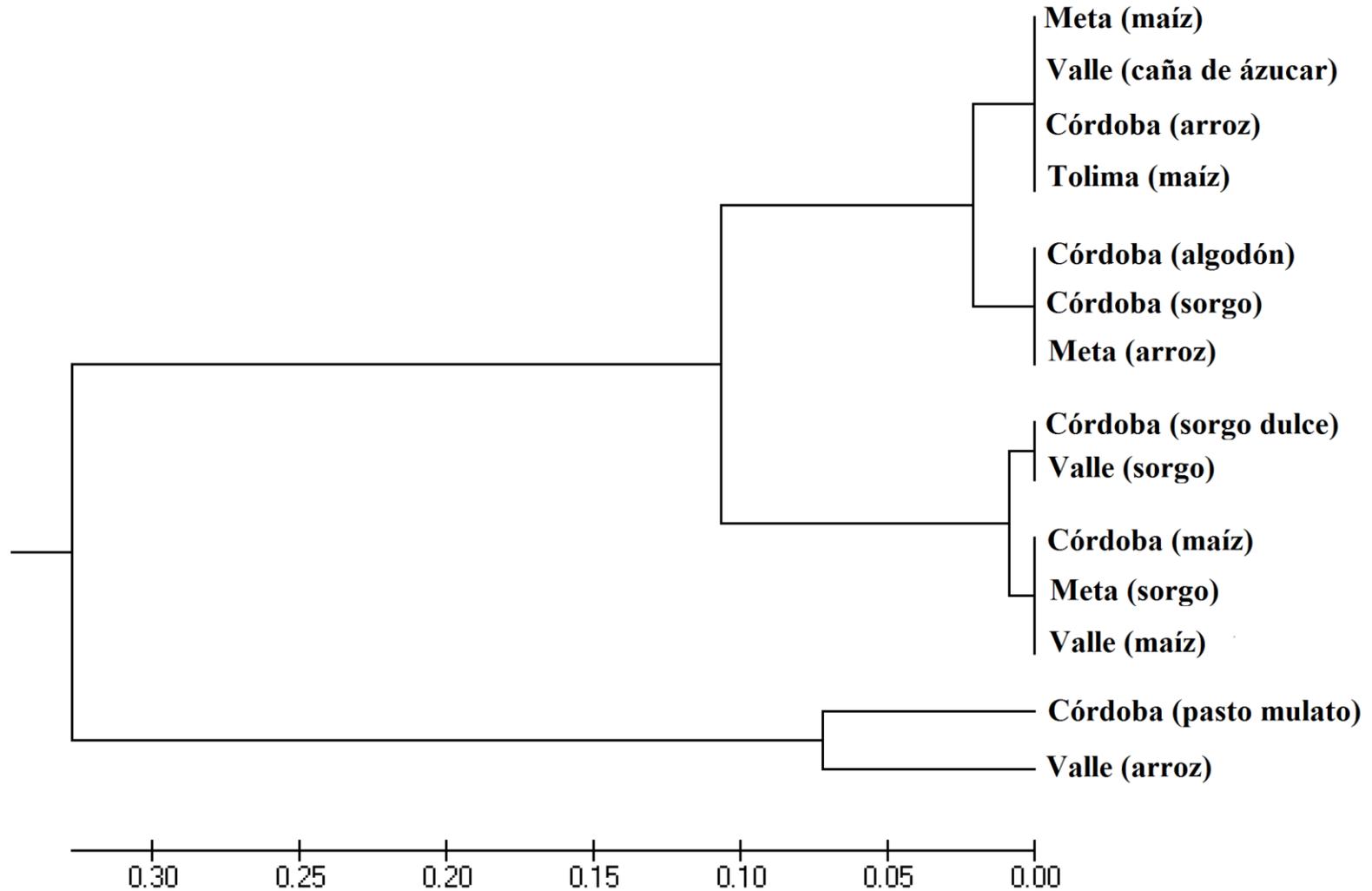
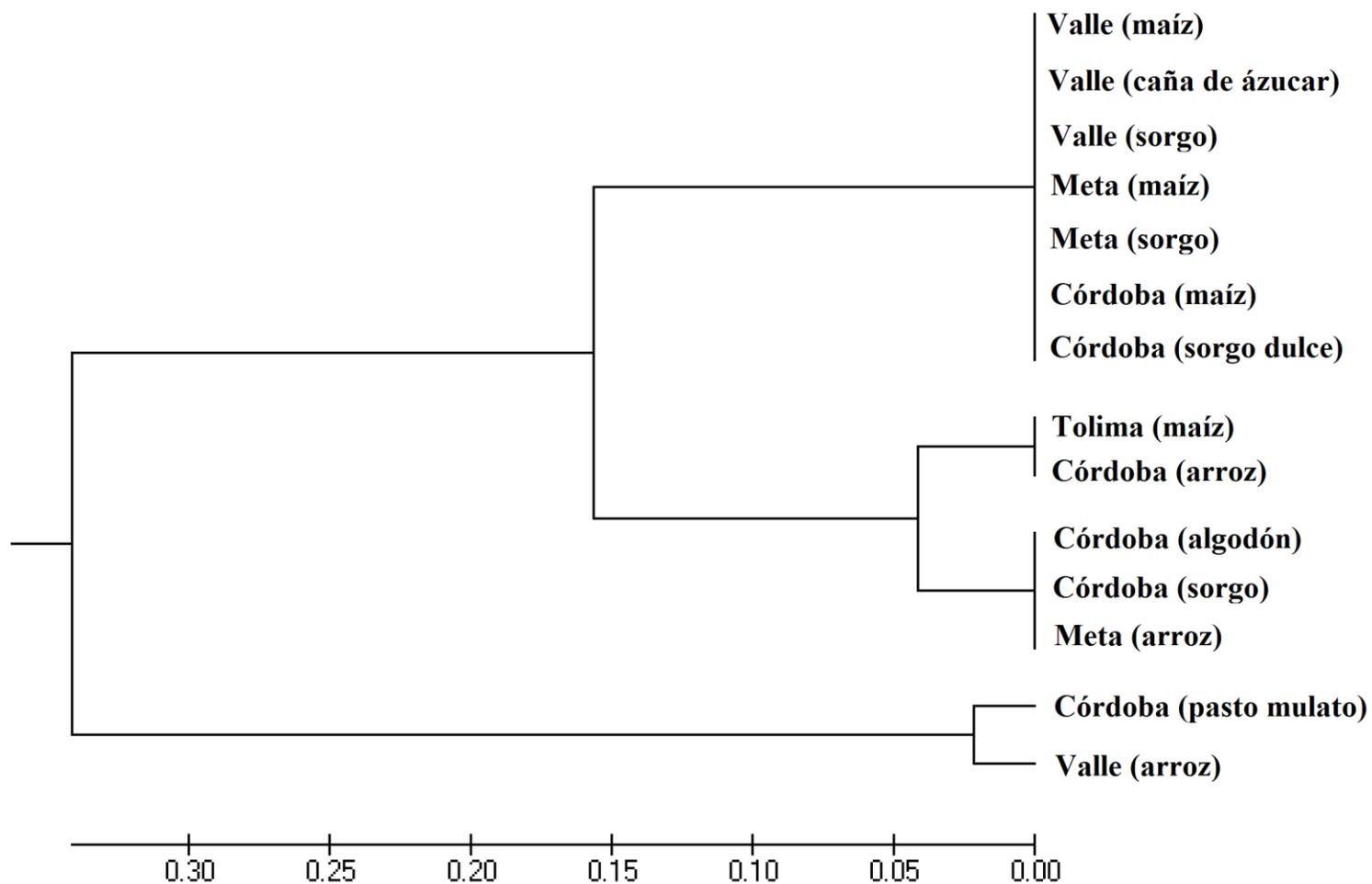


Figura 2- 7. Dendrograma basado en distancias de Nei y el algoritmo UPGMA para el marcador FR.



2.2 Discusión

En total se colectaron 348 larvas del gusano cogollero, donde 258 individuos fueron genotipificados como biotipo de maíz, y 66 individuos fueron genotipificados como biotipo de arroz (Tabla 1). Los patrones electroforéticos para cada marcador del biotipo de maíz y arroz fueron similares a los definidos por Nagoshi y Meagher (2003 a) y Vélez-Arango et al. (2008). Como comprobó Saldamando y Vélez-Arango (2010), dos tipos de híbridos fueron identificados a) 10 individuos presentaron digestión de 497 pb y 72 pb con la enzima *MspI* y amplificaciones en forma de barrido mayores de 500 pb con los cebadores que corresponden a la región FR (for rice) (híbridos denominados +/ +) y b) 14 individuos que no presentaron digestión de 497 pb y 72 pb con la enzima *MspI* o productos amplificados en forma de barrido mayores de 500 pb con los cebadores de la región FR (híbridos llamados -/ -). Los híbridos también fueron reconocidos con la enzima de restricción *SacI* cuando presentaron digestiones de 500 pb y 69 pb en el gen citocromo oxidasa I (COI). Estos individuos fueron analizados con estas enzimas, ya que los fragmentos de repetición en tándem de la región FR eran difíciles para amplificar en las muestras. En todos los departamentos se encontró principalmente el biotipo de maíz (45%), sorgo (20.9%), sorgo dulce (9.3%), caña de azúcar (7.3%), algodón (6.5%), y pasto (2.7%); y el biotipo de arroz en los cultivos de pasto (40%), sorgo dulce (31.8%), algodón (13.6%), arroz (9%), maíz y sorgo (4.5%) (Tabla 1). Los híbridos +/ + fueron encontrados en arroz (40%), sorgo (30%), maíz (20%) y algodón (10%); e híbridos -/ - en los cultivos de maíz (50%), arroz (28.5%), sorgo dulce (14.35%) y algodón (7.15%). Un similar patrón en la distribución de plantas hospederas fue el encontrado por Vélez-Arango et al. (2008) en el departamento del Tolima.

Es importante tener en cuenta que la asociación a la planta huésped en el biotipo de maíz y en el biotipo de arroz no es exclusiva, debido a que el biotipo de maíz también se puede encontrar en el cultivo de arroz y el biotipo de arroz en el cultivo de maíz (Prowell et al. 2004, Cañas-Hoyos et al. 2014). En el 2008, Vélez-Arango et al., encontraron que el biotipo de arroz también se puede encontrar en el maíz y el biotipo de maíz en el cultivo de arroz. En este trabajo, se encontró que esta asociación es más exclusiva, ya que el biotipo de maíz se encontró con mayor abundancia en el cultivo maíz y el biotipo de arroz en el cultivo de arroz y en pastizales. Este resultado podría explicarse con la realización de un análisis que tuviera un mayor número de muestras, puesto que, en este trabajo se evaluaron 348 larvas y en el de Vélez-Arango et al. (2008) se analizaron 250, y a su vez, el hecho de que este estudio se tuvieron en cuenta cuatro departamentos del país, mientras que en la investigación de Vélez-Arango et al. (2008) solo se tuvo en cuenta el departamento del Tolima. Es importante resaltar que cada departamento de Colombia presenta diferentes condiciones de hábitat y también una diferente oferta alimenticia para estos dos biotipos, por ello, se ha hecho necesario hacer rotación de cultivos con el fin de evitar una sincronización entre el ciclo de vida del insecto y de su planta hospedera. En Colombia la rotación de cultivos de maíz, algodón, arroz y sorgo se llevan a cabo cada semestre para evitar la sincronía entre el ciclo de vida de las plagas (en particular *S. frugiperda* y *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera, Gellechidae) y sus hospederos. En el primer semestre del año, se producen los cultivos de maíz, sorgo y arroz en los departamentos del Tolima y Valle del Cauca y algodón en Córdoba y Meta. En el segundo semestre, se producen estos cultivos de manera inversa, es decir el algodón se siembra en el Tolima y Valle del Cauca y los otros cultivos se producen en Córdoba y Meta, a excepción del algodón (Vélez-Arango et al. 2008, Ríos-Díez y Saldamando-Benjumea 2011). En el Valle del Cauca, el cultivo de caña de azúcar es producido en ambos

semestres del año, ya que es el principal cultivo producido en esta parte de Colombia y por ello el biotipo de maíz se encontró asociado a esta planta hospedera principalmente, dada la ausencia de los otros cultivos en esta zona del país. Salinas- Hernández y Saldamando-Benjumea (2011) secuenciaron un fragmento del gen COI en 102 individuos colectados en casi los mismos departamentos incluidos también los muestreados aquí, encontrando 43 haplotipos donde el haplotipo más común representado fue el biotipo de maíz. Por esta razón estos autores argumentaron que el biotipo de maíz tiene mejor capacidad de dispersión en comparación con el de arroz en Colombia, puesto que, se puede encontrar en muchos más hospederos que el biotipo de arroz. Ellos concluyeron que la secuenciación de este gen puede ser una herramienta útil para monitorear el movimiento de las poblaciones de *S. frugiperda* en Colombia como Nagoshi et al. (2007 a, b, 2008 a, b) han llevado a cabo en los Estados Unidos y Brasil.

Por otro lado, en esta tesis, se decidió trabajar con una PCR-RFLP del gen COI y la región de repetición en tándem FR, puesto que estas dos técnicas se han estandarizado con anterioridad para la fácil y rápida identificación de los biotipos de *S. frugiperda* en el laboratorio de Biotecnología vegetal UNALMED-CIB por Vélez-Arango et al. (2008). Otros marcadores moleculares han sido utilizados para diferenciar los dos biotipos en este mismo laboratorio, pero no son tan precisos como los marcadores de PCR-RFLP del gen COI y la región de repetición en tándem FR, ya que producen muchos polimorfismos los cuales son difíciles de asignar a cada biotipo. Un ejemplo de este tipo de marcadores son los AFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados) (Lobo-Hernández y Saldamando-Benjumea 2012). Sin embargo, McMichael y Prowell (1999) estandarizaron el marcador molecular AFLP los biotipos de maíz y arroz procedentes de los Estados Unidos mantenidos en el laboratorio y llegaron a la conclusión de que estos marcadores diferencian ambos biotipos en función de su patrón de bandas. Lobo-Hernández y Saldamando-Benjumea (2012) utilizaron los mismos cebadores estandarizados por McMichael y Prowell (1999) en larvas de *S. frugiperda* colectados en Córdoba, Meta y Valle del Cauca y no encontraron un patrón de bandas específico para cada biotipo. En su trabajo, Lobo-Hernández y Saldamando-Benjumea (2012) concluyeron que AFLP son buenos marcadores para realizar estudios de genética de poblaciones, pero desafortunadamente no lograron diferenciar los dos biotipos.

Los resultados de la AMOVA encontrados en este trabajo, demostraron que las poblaciones FAW se diferencian genéticamente entre todos los cultivos y todos los departamentos analizados de Colombia con valores PhiPT significativos para ambos marcadores: PhiPT = 0,376 (df = 13, 370, p <0,001) para la región del COI y PhiPT = 0,50 (df = 13, 354, P <0,001) para el marcador de FR (Tabla 2). Resultados similares fueron obtenidos por Saldamando y Vélez -Arango (2010) en el departamento de Tolima, lo cual corrobora que la asociación a plantas hospederas del biotipo de maíz y arroz es la principal causa de la diferenciación genética observada en *S. frugiperda* en este país. También se obtuvo un agrupamiento por el dendrograma UPGMA obtenidos de cada marcador basado en las distancias genéticas de Nei para los siete cultivos estudiados, con un primer grupo formado por larvas de *S. frugiperda* a partir de maíz, sorgo, sorgo dulce, caña de azúcar y de algodón y un segundo grupo formado principalmente de los cultivos arroz y pasto (Figura 2 a, b). Ambos dendrogramas muestran una topología diferente por cultivo y departamento, pero en general separan las poblaciones de *S. frugiperda* que fueron muestreados en los cultivos de maíz, algodón, sorgo, sorgo dulce y caña de azúcar vs las poblaciones muestreadas en arroz y pastos.

Como se ha mencionado por Saldamando y Vélez-Arango (2010), los marcadores moleculares utilizados aquí son más útiles para la identificación de los biotipos que para el análisis genético de la población, ya que no proporcionan mucha información sobre la variación dentro de cada biotipo. Sin embargo, fueron suficientes para proporcionar la información necesaria para la identificación de los biotipos y la asociación a la planta hospedera. Otros marcadores como AFLP (Lobo-Hernández y Saldamando-Benjumea 2012), y la secuencia del gen COI (Salinas-Hernández y Saldamando -Benjumea 2011) se han utilizado en poblaciones colombianas de *S. frugiperda* y fueron útiles para los estudios de la población genética del insecto, pero no diferenciaron ambos biotipos. Juárez et al. (2012) también utilizaron secuenciación del gen COI y encontraron haplotipos de biotipos de maíz y arroz, pero no encontraron la asociación a planta hospedera que se observaron en este trabajo. Estos investigadores estudiaron 15 localidades de Argentina, Brasil y Paraguay y colectaron larvas y adultos de *S. frugiperda* de varios cultivos (maíz, arroz, alfalfa y sorgo) y pastos, pero no pudieron analizar un elevado número de muestras por cultivo (la genotipificación por cultivo fue de 9 a 15 individuos) y para realizar una prueba estadística para determinar si existía una asociación a plantas hospederas presentes por biotipo de maíz y arroz. En este trabajo de investigación, se obtuvieron tablas de contingencia que sugieren una distribución diferencial de los dos biotipos de *S. frugiperda* en las siete plantas hospederas (Tabla 5). El biotipo de maíz se presentó principalmente en cultivos de maíz, sorgo, sorgo dulce, la caña de azúcar, de algodón, y de arroz y el biotipo de arroz predominó en los cultivo de arroz y pastos (Figura 3). Resultados similares fueron reportados por Prowell et al. (2004) en países como Estados Unidos, Honduras, Puerto Rico, Guyana Francesa, y algunas islas del Caribe, Busato et al. (2004) en Brasil, Vélez-Arango et al. (2008) en Colombia y Nagoshi et al. (2012) en Argentina. Prowell et al. (2004), Vélez-Arango et al. (2008) y Nagoshi et al. (2012) utilizaron un amplio tamaño de la muestra para analizar la asociación a la planta hospedera en *S. frugiperda* en los biotipos de maíz y arroz a pesar de que todos ellos utilizaron diferentes marcadores moleculares. Un aspecto importante a tener en cuenta es el marcador molecular, el tamaño de la muestra y el estadio del individuo de *S. frugiperda* para ser analizado, dado a que todos estos aspectos podrían afectar el resultado obtenido para determinar la asociación a planta hospedera. En los estudios hechos en Colombia por Vélez-Arango et al. (2008), Saldamando y Vélez-Arango (2010), Salinas-Hernández y Saldamando-Benjumea (2011) y Lobo Hernández y Saldamando -Benjumea (2012), todas las muestras de *S. frugiperda* consistieron en individuos en estado larval ya que los adultos presentan una mayor habilidad de dispersión y existe una posibilidad considerable de que exista cambios de huésped debido a que en el país, los cultivos estudiados se sembraron cerca uno del otro, y por lo tanto, todos ellos representan poblaciones simpátricas para el insecto.

Por otro lado, los estudios basados en el manejo integrado del cultivo de maíz en la naturaleza son necesarios en un futuro próximo donde los investigadores podrían tratar los insecticidas y los controles biológicos, en campos infestados por *S. frugiperda*, por ejemplo, la aplicación de insecticidas en campos de maíz y endotoxinas de *B. thuringiensis* en campos de arroz con el propósito de controlar a este insecto. Otro posible método de control podría ser la liberación de hembras F1 estériles de *Spodoptera frugiperda* en campo para el control de poblaciones de esta plaga en los diversos cultivos hospederos. Velásquez- Vélez et al. (2011) encontraron que los híbridos obtenidos de la F1 entre estos dos biotipos tienden a tener una reducción de la fertilidad y el *fitness* en comparación con sus parentales y, por lo tanto, estas hembras pueden ser obtenidas en el laboratorio con propósitos de manejo integrado

3. Capítulo 3

3.1. Conclusiones y Recomendaciones

3.1.1. Conclusiones

En conclusión, los hallazgos obtenidos en este estudio demostraron la presencia de los biotipos maíz y arroz de *S. frugiperda* en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca en los cultivos de maíz, sorgo, pasto mulato, algodón, sorgo dulce, arroz y caña de azúcar, con el uso de dos marcadores moleculares, uno del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (COI) y la región nuclear en tándem FR. El biotipo de maíz se encontró principalmente en el maíz, seguido por el sorgo, el algodón y la caña de azúcar y el biotipo de arroz en el cultivo de arroz y pastos principalmente.

Los biotipos de *S. frugiperda* producen poblaciones genéticamente diferenciadas en Colombia, puesto que, los valores de PhiPT fueron significativos para las comparaciones entre cultivos, demostrando que los cultivos de maíz, algodón, caña de azúcar, sorgo dulce y sorgo presentan diferenciación genética respecto al cultivo de arroz y pasto. Este resultado sugiere que el flujo genético entre los primeros cultivos y los segundos son más reducidos que los primeros.

De igual forma, debido a que se encontraron híbridos entre estos dos biotipos, se puede decir que *S. frugiperda* se encuentra desarrollando sus barreras de aislamiento reproductivo, particularmente aislamiento precigótico comportamental y químico.

La asociación a planta hospedera demostrado en este trabajo, sugieren que el manejo de *S. frugiperda* debe variar en función al biotipo asociado a un hospedero en particular, ya que en otros estudios realizados en el 2011 y 2012 se evidenciaron las diferencias en la tolerancia de ambos biotipos a los insecticidas y endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Cry1Ac y Cry1Ab), donde el biotipo de maíz es más susceptible a la primera y el biotipo de arroz a la segunda.

3.1.2 Recomendaciones

Nuevos trabajos de investigación son necesarios en este insecto entre los que se encuentran realizar estudios de susceptibilidad de los biotipos en la naturaleza en los que se aplique insecticidas en cultivos de maíz y endotoxinas del *B. thuringiensis* en cultivos de arroz para determinar si se bajan las densidades del insecto.

Otra investigación que se recomienda realizar está relacionada con el análisis de componentes de feromonas de los biotipos del insecto, puesto que, se ha encontrado que las hembras del biotipo de maíz no les gusta aparearse con los machos del biotipo de arroz. Dado que estos se comunican con feromonas es probable que este factor influya en su reconocimiento intra poblacional.

El otro trabajo a desarrollar consistiría en el uso de la morfometría geométrica alar en poblaciones naturales de los biotipos de este insecto ya que esta herramienta se ha aplicado en poblaciones del laboratorio por lo que permitió diferenciar a estos biotipos por la “forma” del ala y no por su “tamaño”, lo cual sería una forma alternativa de reconocimiento de estas poblaciones sin necesidad de recurrir a herramientas moleculares.

Igualmente, otra posible investigación sería el estudio de las alteraciones cromosómicas de los biotipos como de los híbridos en diferentes plantas hospederas de diferentes regiones.

Finalmente, sería interesante analizar la microbiota asociada a los biotipos de este insecto dado que, podría ser una herramienta futura para el control de sus poblaciones en el campo.

Bibliografía

ADAMCZYK, J. R.; HOLLOWAY, J. J.; LEONARD, J. W. Y J. B. GRAVES. 1997. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt Algodón. *Journal of Algodón Science*. 1(1): 21-28.

Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario- AGRONET. 2012. Sistema de Estadísticas Agropecuarias. Anuario Estadístico del Sector Agropecuario 2012. Consultado el día 11 de mayo de 2014. <http://www.agronet.gov.co/>

ANDREWS K., L. 1980. The whorlworm, *Spodoptera frugiperda*, in Central America and neighboring areas. *Florida entomologist*. Vol. 63(4): 456-467.

ASHLEY, T.R. 1986. Geographical distribution y parasitization levels for parasitoids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Florida Entomologist*. 69: 516-524.

BARLOW M. V., Y KUHAR P. T. 2009. Fall Armyworm in Vegetable Crops. Virginia Cooperative Extension.

BOHNENBLUST E. AND TOOKER J., 2012. Fall armyworm as a pest of field corn *spodoptera frugiperda* (Smith). College of Agricultural Sciences. Entomological Notes.

BUSATO, G. R., GRÜTZMACHER A. D., GARCIA M. S., GIOLO F. P. E MARTINS A. F. 2002. Consumo e Utilização de Alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Originária de Diferentes Regiões do Rio Grande. *Neotropical Entomology* 31(4):525-529.

BUSATO, G. R., A. D. GRÜTZMACHER, A. C. DE OLIVEIRA, E. A. VIEIRA, P. D. ZIMMER, M. M. KOPP, J.D.M. BYEIRA Y T. R. MAGALHANES. 2004. Analysis of the molecular structure and diversity of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to the corn and rice crops in Rio Grye do Sul state, Brazil. *Neotropical Entomology*. 33: 709-716.

CAÑAS-HOYOS N., MARQUEZ E. J. AND SALDAMANDO- BENJUMEA C. I. 2014. Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains from Central Colombia: a Wing Morphometric Approach. *Annals of the Entomological Society of America* 107(3):575-581.

CAPINERA, J. 2000. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). The University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. (UF/IFAS).

CLARK, P. L., J. MOLINA-OCHOA, S. MARTINELLI, S. R. SKODA, D. J. ISENHOUR, D. J. LEE, J. T. KRUMM Y J. E. FOSTER. 2007. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. *Journal of Insect Science*. 7 (5): 1536 – 2442.

DRES, M. Y J. MALLET. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Science*. 357: 471-492.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E. Y J. M. QUATRO.1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*. 131: 479-471.

FISHBEIN, D. 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas. En: Villacide, J. & J. Corley (Eds.), Serie técnica: "Manejo Integrado de Plagas Forestales", Cuadernillo N° 15: 1-21

GARCÍA, F., M.T. MOSQUERA, C. VARGAS, Y L. A. ROJAS. 2002. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) plaga del maíz y otros cultivos en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 28: 53-60.

GÓMEZ, J.; GUEVARA, J.; BARRERA, G.; COTES, A.; VILLAMIZAR, L. (2010). Aislamiento, identificación y caracterización de nucleopoliedrovirus nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 63(2): 5511-5520.

GROOT, A. T., MARR, M., SCHÖLF, G., LORENZ, S., SVATOS, A. Y D. G. HECKEL. 2008. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. *Frontiers in zoology*. 5:20.

GROOT A. T., MARR M., HECKEL D. Y G. SCHÖLF. 2010. The roles and interactions of reproductive isolation mechanism in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Ecological Entomology*. 35. 105-118.

HAMMER O, D HARPER & P RYAN (2001) PAST: paleontological statistics software for education and data analysis. *Paleontology Electronica* 4: 1-9.

HEDRICK, P. W. 2004. Genetics of Populations. Jones and Barlett Publishers. Sudbury Massachusets.

HUFF, D. R.; PEAKALL, R. Y P. E. SMOUSE. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). Theoretical and Applied Genetics. 86: 927-934.

JUÁREZ, M. L., M. G. MURÚA M. G. GARCÍA, M. ONTIVERO, M.T. VERA , J. C. VILARDI, A.T. GROOT, A.P. CASTAGNARO, G. GASTAMINZA AND E.WILLINK. 2012. Host association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. J. Econ. Entomol. 105:573-82.

LEVY, C. H; GARCIA-MARUNIAK, A. Y J. MARUNIAK. 2002. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase c subunit I gene. Florida Entomologist. 85(1): 186-190.

LOBO-HERNÁNDEZ M. I. Y SALDAMANDO-BENJUMEA C. I. 2012. Molecular Characterization and Genetic Differentiation of *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize, Rice, and Cotton Fields of Colombia with AFLP. Southwestern Entomologist 37(2):193-207.

LÓPEZ-EDWARDS, M., J. HERNÁNDEZ-MENDOZA, L. PESCADOR-RUBIO, A. MOLINA-OCHOA, J. R. LEZMA-GUTIERREZ, HAMM, J. J Y B. R. WISEMAN. 1999. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. Florida Entomologist. 82: 254-262.

LUGINBILL, P. 1928. The fall armyworm. U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin. 34: 1-91.

LU, Y. J., ADANG, M. J.; EISENHOUR, D. J. Y G. D. KOCHERI. 1992. Restriction fragment length polymorphism analysis of genetic variation in North American populations of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Molecular Ecology. 1: 199-208.

LU, Y. J.; KOCHERT, G. D.; ISENHOUR, D. J. Y M. J. ADANG. 1994. Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Insect Molecular Biology. 3: 123–130.

LU, Y. J. Y M. J. ADANG. 1996. Distinguishing Fall Armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. Florida Entomologist. 79(1): 48-55.

MCMICHAEL, M. Y D. P. PROWELL. 1999. Differences in amplified fragment-length polymorphism in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Annals of Entomological Society of America*. 92(2): 175-181.

MEAGHER, R. L. Y M. GALLO-MEAGHER. 2003. Identifying host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Florida using mitochondrial markers. *Florida Entomologist*. 86(4): 450-455.

MICHALAKIS, Y. Y L. EXCOFFIER. 1996. A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances Between Alleles with Special Reference for Microsatellite Loci. *Genetics*. 142: 1061-1064.

MURÚA, M. G., M. T. VERA, S. ABRAHAM, M. L. JUÁREZ, S. PRIETO, G. P. HEAD, AND E. WILLINK. 2008. Fitness and Mating Compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations from Different Host Plant Species and Regions in Argentina. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101: 639-649.

NAGOSHI, R. D. Y R. L. MEAGHER. 2003a. fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the world indicate limitations in inter strain mating. *Insect Molecular Biology* 12(5): 453- 456

NAGOSHI, R. D. Y R. L. MEAGHER. 2003b. FR Tandem-Repeat Sequence in Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains. *Annals of the Entomological Society of America*. 96(3): 329-335.

NAGOSHI, R. N. Y R. L. MEAGHER. 2004. Seasonal distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in agricultural and turf grass habitats. *Environmental Entomology*. 33: 881-889.

NAGOSHI R. N., SILVIE P., MEAGHER R. L., LOPEZ J. AND MACHADO V. 2007a. Identification and Comparison of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains in Brazil, Texas, and Florida. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 100(3): 394-402 (2007).

NAGOSHI R. N., SILVIE P. AND MEAGHER R. L. 2007b. Comparison of Haplotype Frequencies Differentiate Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Corn-Strain Populations from Florida and Brazil. *J. Econ. Entomol.* 100(3): 954-961.

NAGOSHI, R. N., MEAGHER, R. L., FLANDERS, K., GORE, J., JACKSON, R., LOPEZ, J. ARMSTRONG, J. S., BUNTIN, G. D., SANSONE, C. Y R. LEONARD. 2008a. Using haplotypes to monitor the migration of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) maize-strain populations from Texas and Florida. *Journal of Economic Entomology*. 101(3): 742-749.

NAGOSHI, R. N., ARMSTRONG, J. S., SILVIE P. Y R. L. MEAGHER. 2008b. Structure and distribution of a strain-biased tandem repeat element in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Florida, Texas, and Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*. 101(6): 1112-1120.

NAGOSHI R. N., MEAGHER R. L. & HAY-ROE M. 2012. Inferring the annual migration patterns of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the United States from mitochondrial haplotypes. *Ecology and Evolution*; 2(7):1458–1467.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science*. 70: 3321-3323.

NEI, M. 1975. *Molecular Population Genetics and Evolution*. Editorial North-Holland Press. Amsterdam.

NEI, M. 1979. Genetic Distance Between Populations. *The American Naturalist*. 106(949): 283-292

PEAKALL, R. Y P. E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.

PEAKALL R. AND SMOUSE P.E. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

Prowell, D. P. 1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) a sibling species complex? *Annals of Entomological Society of America*. 79: 898-904.

PROWELL, D. P. Y J. A. MARTIN. 1987. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*. 80: 731–733.

PROWELL, D. P. 1988. Current Status of Fall Armyworm Host Strains. *Florida Entomologist*. 71(3): 227-234.

PROWELL, D. P.; HAMMOND, A. M. Y T. N. HARDY. 1992. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*. 85: 400– 405.

PROWELL, D. P. 1998. Sex linkage and speciation in Lepidoptera. In D. Howard and S. Berlocher (eds). *Endless forms: species and speciation*. Oxford. NY. 309 - 319 p.

PROWELL, D. P., M. MCMICHAEL Y J. F. SILVAIN. 2004. Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*. 97: 1034-1044.

RÍOS-DÍEZ, J. D., Y C. I. SALDAMANDO-BENJUMEA. 2011. (en prensa). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains From Central Colombia to Two Insecticides: Methomyl and Lambdacyhalothrin. A Study of The Genetic Basis of Resistance. *Journal of Economic Entomology*.

RÍOS-DÍEZ J. D., SIEGFRIED, B Y SALDAMANDO-BENJUMEA C. I. 2012. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from Central Colombia to two *Bacillus thuringiensis* endotoxins: Cry1Ab and Cry1Ac. *Southwestern Entomologist*. 37:281-293.

SALDAMANDO C. I, VÉLEZ-ARANGO A. M. 2010. Host Plant Association and Genetic Differentiation of Corn and Rice Strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. *Neotropical Entomology* 39(6):921-929.

SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I, ESTRADA-PIEDRAHITA, K. VELASQUEZ-VELEZ, M. I. AND BAILEY, R. I. 2014. Assortative Mating and Lack of Temporality Between Corn and Rice Strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) from Central Colombia. *Journal of Insect Behavior*. Vol. 27, (5): 555-566.

SALINAS-HERNÁNDEZ, H. Y C. I. SALDAMANDO. 2011 (en prensa). Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains from Colombia (Neotropical Entomology)

SPARKS, A.N. 1979. A review of the biology of the fall armyworm. *Fla. Entomol.* 62: 82–86.

SCHOFL, G., HECKEL, D.G. Y A.T. GROOT. 2009. Time-shifted reproductive behaviours among fall armyworm (Noctuidae: *Spodoptera frugiperda*) host strains: evidence for differing modes of inheritance. *Journal of Evolutionary Biology*. 22: 1447.

SOKAL, R. R. Y F. J. ROHLF. 1995. *Biometry*. W. H. Freeman and Company, NY. p. 725-729.

Tamura K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. Mega 4. Molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.

TORRES, L. Y A. M. COTES. 2005. Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad y actividad biocontroladora de *Nomuraea rileyi* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 31(2): 133-138.

VÉLEZ-ARANGO A M, ARANGO R E, VILLANUEVA D, AGUILERA E, SALDAMANDO C. I. (2008) Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. Rev Colomb Entomol 34: 145-150.

VELÁSQUEZ –VÉLEZ M. I., SALDAMANDO-BENJUMEA C. I. Y RÍOS- DIEZ J. D. 2011 (en prensa). Reproductive isolation between two populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) collected in corn and rice fields from central Colombia. Annals of the Entomological Society of America.

VILASECA J. C., BAPTISTE G. L., LOPEZ-ÁVILA A. 2008. Incidencia de los márgenes sobre el control natural de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivos de arroz. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria 9(2):45-54.

VILLAMIZAR, L.; GUEVARA, J.; ESPINEL, C.; GÓMEZ, M.; GÓMEZ, J.; CUARTAS, PAOLA.; BARRERA, G.; CRUZ, M.; SANTOS, A.; URIBE, L.; RUIZ, C.; CASTRO, O.; LÓPEZ-FERBER, M.; VALICENTE, F.; CABALLERO, P.; SIMÓN, O.; LÓPEZ ÁVILA, A.; MARÍNEZ, F.; COTES, A. M. 2012. Desarrollo de un bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*. Bogotá: Corpoica, 100 p.

ZENNER DE POLANÍA, I.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, J.A.; ARÉVALO-MALDONADO, H.A.; MEJÍA-CRUZ, R.; BAYONA-ROJAS, M. 2008. Susceptibilidad de cuatro noctuidos plaga (Lepidoptera) al gene Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* incorporado al algodón. Rev. Colom. Entomol. 34(1):41-50.