

# Identificación molecular de la mosquilla del brote *Prodidiplosis* sp. Gagné en los cultivos de *Asparagus officinalis* L. por amplificación parcial del gen citocromo oxidasa I

*Molecular identification of gall midge Prodidiplosis sp. Gagné in Asparagus officinalis L. crops by partial amplification of the gene cytochrome oxidase I*

Eddy Ortega Ramirez<sup>1,2,4</sup>, Cledy Ureta Sierra<sup>4</sup>, Ana Mayanga Herrera<sup>1,2</sup>, Gabriel Morey León<sup>1,2,5\*</sup>,  
Lissette Graterol Caldera<sup>2</sup>, Piero Dyer Coriat<sup>1,2</sup>, Eric Mialhe<sup>3,5</sup>

## RESUMEN

La identificación precisa de insectos tiene un rol primordial en la asignación específica de plagas que afectan los cultivos, siendo las similitudes morfológicas en muchas especies el gran reto que enfrentan los entomólogos, es por esto que las metodologías basadas en ADN son utilizadas como complemento a los métodos morfológicos. El espárrago (*Asparagus officinalis*) es el cultivo de mayor importancia económica en el Perú, en donde el insecto polífago *Prodidiplosis* sp. (Diptera: Cecidomyiidae) es su principal plaga, mermando la producción hasta 50%. En el presente estudio se utilizó el ADNmt de *Prodidiplosis* sp. para la identificación molecular y análisis de diversidad en 34 larvas colectadas de los cultivos de *Asparagus officinalis*, *Capsicum annuum* y *Citrus* spp. Fragmentos de 490 pb y 712 pb del gen de citocromo oxidasa I fueron amplificados por PCR seguidos de secuenciamiento directo. La divergencia de las secuencias nucleotídicas utilizando el modelo de distancia Kimura dos parámetros, muestra la conformación de dos clados agrupados indistintamente del hospedero. El análisis de diversidad genética en la población, dentro de las poblaciones y entre poblaciones fue de 0,019; 0,005 y 0,014, respectivamente, mostrando escasa divergencia, la variabilidad dentro de los grupos y entre grupos fue 26,7% y 73,3%. Los resultados del análisis AMOVA entre poblaciones (-1,13%) y los valores estadísticos  $F_{ST}$  (0,01129) fueron bajos, lo que se explica por el alto flujo de genes Nm (43,79), sugiriendo que los cultivos en estudio están afectados por una misma plaga con dos haplotipos (h1: TC y h2: GT). En conclusión, basados en la sensibilidad y especificidad de la PCR sumados a la información en las secuencias del ADNmt se puede sugerir que la prueba desarrollada serviría complementariamente a la identificación morfológica y puede ser aplicada en estudios de diversidad genética de *Prodidiplosis* sp. en otros cultivos.

**Palabras clave:** Caracterización molecular, *Prodidiplosis* sp., mosquilla del brote, Cecidomyiidae, Espárrago, Citocromo oxidasa I, secuenciamiento DNA, Bioinformática.

## ABSTRACT

The accurate identification of insect has a primordial role for allocation to specific pests that affecting crops, being the morphological similarities of many species a great challenge faced by entomologist, is why DNA-based methodologies are used as a supplemental means of morphological method. *Asparagus* (*Asparagus officinalis*) is the most important crop in Peru, in which, *Prodidiplosis* sp. (Diptera: Cecidomyiidae) polyphagous insect is a major pest which reduces its production to 50%. In the present study the mtDNA of *Prodidiplosis* sp. used for the molecular identification and diversity analysis into 34 larvae collected from *Asparagus officinalis*, *Capsicum annuum* and *Citrus* spp. crops. 490 bp and 712 bp fragments of cytochrome oxidase I gene were amplified using polymerase chain reaction followed by direct sequencing. Nucleotide sequence divergences were calculated using the distance Kimura two parameters model showed the formations of two separates clades grouped either host. Genetic diversity in the total population, within populations and among populations was of 0.019, 0.005 and 0.014, respectively showed lowest divergence, variability within groups and among groups was 26.7% and 73.3%. The AMOVA analysis within populations (-1.13%) and

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Biotec C.M.C, Grupo D&C, Lima, Perú.

<sup>2</sup> Camposol S.A, Lima, Perú.

<sup>3</sup> Incabiotec S.A Tumbes, Perú

<sup>4</sup> Laboratorio de Micología Aplicada. Universidad Mayor San Marcos, Lima, Perú.

<sup>5</sup> Programa de Biotecnología. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.

\* Autor por correspondencia: gmorey@biotecmc.pe

statistic value  $F_{ST}$  (0.01129) was low, which is explained by high gene flow  $Nm$  (43.79), suggesting that crops are affected by two haplotypes ( $h1$ : TC y  $h2$ : GT) of the same pest. In conclusion, based to a PCR sensibility and specificity and mtDNA sequence information, it is suggest that the proof would be a molecular tool DNA-based complementary to the morphological identification that can be applied in studies of genetic diversity of *Prodiplosis* sp. in other crops.

**Key words:** Molecular characterization, *Prodiplosis* sp, gall midge, Cecidomyiidae, Asparagus, cytochrome oxidase I, DNA sequencing, Bioinformatic.

## Introducción

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una hortaliza nativa del Asia y actualmente se encuentra distribuido en todos los continentes del mundo. En el Perú existen más de 22.000 ha sembradas con espárragos, y su superficie cultivada sigue aumentando preferentemente en zonas arenosas, lo que posiciona al Perú como el segundo país en extensión de hectáreas cultivadas en el mundo después de China (120.000 ha). Sin embargo, el Perú posee el primer lugar en producción del mundo. La fenología del espárrago pasa por dos a tres brotamientos, esto beneficia su producción al tener más periodos de cosecha, no obstante, son significativamente afectados por el ataque de *Prodiplosis* sp. (Diptera: Cecidomyiidae), insecto polífago que causa deformación del producto comercial, los turiones del espárrago (Gagné, 2010).

Gagné y Wuenshe (1986), Neal y Gott (1988) sostienen que el género *Prodiplosis* se encuentra establecido en América y Europa, ocasionando severos perjuicios en melón, papaya y tomate, pudiendo tener varias generaciones anuales. La taxonomía de la familia Cecidomyiidae describe otras once especies dentro del género *Prodiplosis* reportadas en diferentes países: *P. citrulli*, *P. falcata*, *P. floricola*, *P. longifila*, *P. myricae*, *P. platani*, *P. vaccini* y *P. violicola* (EE. UU.), *P. morrissi* (generalizada, Neártico Oriental), *P. orientalis* y *P. saurica* (Kazakstán), *P. rhenana* (Alemania); sin embargo, hasta el momento no se encuentra información de carácter molecular sobre las mismas en las bases de datos. Otras especies de la familia como *Mayetiola destructor* “Hessian fly” (Zhu *et al.*, 2008), *Orseolia orzyae* “la mosquita de la agalla del arroz” (Umeh y Joshi, 1993) y *Sitodiplosis mosellana* “el mosquito rojo del trigo” (Lamb *et al.*, 1999) se encuentran entre las más estudiadas por la gran importancia de los cultivos hospederos a los que afectan.

En Perú, *Prodiplosis* se reporta desde 1979 afectando frutos de tomate, brotes de alfalfa y papa (Díaz, 1981). Posteriormente, en 1995, en la provincia

de Cañete (Perú), debido al uso indiscriminado de insecticidas tratando de controlar el ataque de *Liriomyza huidobrensis* (Diptera, Agromyzidae), uno de los problemas entomológicos más severos de la papa, se provocó la resistencia de este insecto a los insecticidas y el surgimiento de nuevas plagas, entre ellos *Prodiplosis longifila*. A partir de ese momento la mosquilla de los brotes tomó importancia y se convirtió en un insecto-plaga muy dañino en cultivos de alfalfa (*Mendicago sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), papa (*Solanum tuberosum*), marigold (*Calendula officinalis*) y espárrago (*Asparagus officinalis*), ubicándose mayormente en toda la costa desde sur a norte (Tacna a Tumbes) (Bayer, 1995).

La clasificación taxonómica mediante morfología fue durante muchos años la estrategia principal para la identificación de insectos, pero en ciertos casos no permite una identificación exacta y ha llevado a incluir especies dentro de familias que no pertenecen por su marcada similitud. Peña *et al.*, 1989, reportó la biología del comportamiento de *Prodiplosis longifila* en plantas de lima y su identificación mediante sus características morfológicas, más adelante, en 2011, también la reportó en cítricos.

Debido a la complejidad que demanda la identificación morfológica y la experiencia de los taxónomos es que varias estrategias de clasificación basadas en marcadores moleculares han sido desarrolladas para estudios filogenéticos y de genética poblacional. Los marcadores moleculares más utilizados para la identificación de organismos son el ADN genómico (ADN ribosomal, ADN<sub>r</sub>), también denominado marcador nuclear, así como los genes mitocondriales (ADN mitocondrial, ADN<sub>mt</sub>), ambos marcadores emplean la PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) acoplada a la secuenciación para la identificación de regiones que permitan la identificación lo más exacta posible del organismo en estudio. Votypka *et al.*, 2009, mediante análisis filogenéticos utilizó la subunidad pequeña del ADN<sub>r</sub> para la diferenciación de las gregarinas asociadas a mosquitos de las moscas de la arena. Ruiz *et al.*, 2010, mediante el empleo de

regiones de ADNmt y ADNr confirmó la presencia de *Anopheles dunhami* Causey en Colombia por comparación de *Anopheles dunhami* de Tefé, Brasil. Wenk *et al.*, 2012, identificó mosquillas del género *Culicoides* utilizando una región parcial del ADNmt (COI). Basado en esto el presente estudio plantea la implementación de herramientas moleculares que permitan una identificación complementaria a la morfológica y que sea informativa, basándose en la secuencia del gen citocromo oxidasa del ADN mitocondrial.

## Materiales y Métodos

### Muestras

Los especímenes de *Prodiplosis* sp. fueron colectados en turiones de segundo brote de espárrago altamente infestado y en cítricos de brotes de varios fundos del distrito de Chao, región La Libertad (8,52S 78,63W; 8,51S 78,72W), y en frutos de pimiento de fundos de la región Piura (5,01S 80,63W). En la Figura 1 se indica la ubicación geográfica de



Figura 1. Distribución geográfica de las muestras de *Prodiplosis* sp. colectados de campos de cultivos de espárrago, cítricos y pimiento colectados de las regiones de Trujillo y Piura del norte costero peruano.

los campos de espárragos, cítricos y pimientos de donde se colectaron las muestras de *Prodiplosis* sp. Todas las muestras subsecuentemente fueron conservadas a refrigeración hasta su transporte al laboratorio donde fueron separados los estadios larvales del material vegetal, colocados en etanol 70% y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Extracción de ADN

El ADNmt de 34 muestras de larvas de *Prodiplosis* sp. (19 de espárrago, 10 de pimiento y 5 de cítrico) fue extraído mediante el protocolo de extracción de Waeyenbergue *et al.*, 2000, con modificaciones menores. Se colocó una larva de *Prodiplosis* sp. en una lámina portaobjeto cóncava con 10  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura, se cortó en 3 o 4 pedazos y se transfirió el macerado a un tubo de 0,2 mL conteniendo 8  $\mu\text{L}$  de solución WLB (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4,5% Tween 20, 10 mM DTT). Se agregó 2  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, seguido de 1 hora a  $65^{\circ}\text{C}$  y 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a 12.000g por 2 minutos. El sobrenadante se recuperó en un nuevo microtubo *ependorf* de 1,5 ml y conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores reacciones de amplificación por PCR.

### Amplificación por PCR y secuenciamiento

Para la amplificación de una región parcial del gen citocromo oxidasa I (COI) se utilizaron los iniciadores COIS (5'-ggatcacctgatatagcattccc-3') y COIA (5'-cccggtaaataataataaacttc-3') diseñados por Funk *et al.*, 1995, que han sido utilizados para el análisis de variaciones interespecífica en Cecidomyiidos (Uechi *et al.*, 2003; Yukawa *et al.*, 2003; Tokuda *et al.*, 2004) y los iniciadores LCO1490 (5'-ggtcaacaaatcataaagattgg-3') y HC02198 (5'-taaacttcagggtgaccacaaaaatca-3') diseñados por Folmer *et al.*, 1994. La mezcla de reacción de PCR consistió de 25  $\mu\text{L}$  de Master mix 2X (Fermentas, Thermo Scientific, Waltham, MA USA), 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (COIS / COIA o LCO1490 / HC02198), 22  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura para completar un volumen de 49  $\mu\text{L}$ , luego se adicionó 1  $\mu\text{L}$  del ADN previamente extraído. La reacción de amplificación fue realizada en un equipo Veriti (Applied Biosystems, USA) continuando con el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo de  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 min, seguido por 40 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por

30 seg, 50 o  $52^{\circ}\text{C}$  (COIS / COIA y LCO1490 / HC02198, respectivamente) por 45 seg, y  $72^{\circ}\text{C}$  por 45 seg; con un ciclo final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 min y  $4^{\circ}\text{C}$  para su conservación. Para la secuenciación se enviaron los productos de PCR al proveedor de servicios de secuenciación Macrogen (USA) de acuerdo con sus indicaciones.

### Análisis de las secuencias y construcción del árbol filogenético

Los análisis de variación de la secuencia de ADN, composición nucleotídica, variación y distancia genética fueron realizados empleando el programa de análisis genético molecular evolutivo (MEGA) versión 5,2 (Tamura *et al.*, 2011). La traducción de la secuencia nucleotídica de COI se realizó empleando el programa Expasy, con el que se determinó el ORF correcto de lectura. Los árboles filogenéticos basados en las secuencias nucleotídicas de COI fue construido mediante el método neighbor-joining (NJ) usando el modelo Maximum Likelihood (ML) implementado en el MEGA5 y los árboles fueron evaluados mediante análisis de muestreo con reemplazo (test *bootstrap*) de 10.000 repeticiones. La tendencia general de sustituciones transicionales/transversionales  $R = [A * G * K_1 + T * C * K_2] / [(A + G) * (T + C)]$  se calculó basado en el test de máxima probabilidad compuesta. Para el análisis de diversidad genética se crearon grupos de *Prodiplosis* de acuerdo con el agrupamiento obtenido por los cladogramas e indistintamente de la procedencia de la muestra. El análisis de divergencia genética entre grupos filogenéticos fue estimado usando el número de sustitución de bases por sitio a partir de un promedio sobre todos los pares de secuencia dentro de cada grupo (Nei and Kumar, 2000). Se calculó la diversidad genética poblacional ( $H_T$ ), la diversidad genética dentro de cada población ( $H_S$ ), la diversidad entre poblaciones ( $D_{ST}$ ) y el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{ST}$ ). Estos análisis se realizaron usando el método Tamura-Nei en el programa MEGA5. El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) y test de divergencia genética entre poblaciones ( $F_{ST}$ ) fue realizado mediante el programa Arlequin 3,5 (Excoffier *et al.*, 2005) para validar la estructura y variabilidad genética presente dentro y entre poblaciones. El flujo de genes (Nm), fue estimado usando la relación  $Nm = ((1/F_{ST}) - 1) / 2$  (Hudson *et al.*, 1992).

## Resultados y Discusión

Fragmentos de 490 pb y 712 pb del gen mitocondrial COI fueron exitosamente amplificados con los iniciadores COIS/COIA y LCO1490/HCO2198, respectivamente, en las 34 muestras de *Prodiptosis* sp. analizadas de los tres cultivos diferentes (*Asparagus officinalis*, *Capsicum annuum* y *Citrus* spp.) (Figura 2). Las secuencias amplificadas con los iniciadores COIS/COIA corresponden a las posiciones comprendidas entre 1.729 y 2.216 de la secuencia completa del ADNmt de *Drosophila yakuba* de número de accesoión GenBank: XO3240, mientras que las secuencias obtenidas con LCO1490/HCO2198 corresponden a las posiciones 1.484 y 2.198 en la misma accesoión (Clary y Wolstenholme, 1985). El alineamiento de las secuencias obtenidas con ambos juegos de iniciadores revela una región sobrelapada de 469 bp (Figura 3).

El análisis de homología de secuencias de los productos de amplificación de *Prodiptosis* sp. evidencian mayor semejanza con dos dípteros Cecidomyiidos, siendo las muestras 1L, 3L, 4L,

6L, 7L, 23C, 24C, 2P, 4P, 5P, 6P, 7P y 9P más semejantes a *Contarinia* sp.; mientras las muestras 2L, 10L, 13L, 14E, 15E, 16E, 17E, 18E, 19L, 20E, 21E, 22E, 25C, 1P, 3P, 8P y 10P se asemejan más a *Sitodiplosis mosellana*, con valores de cobertura de 94 a 100% y máxima identidad de 91 a 93%. Además se observa que las muestras E1, E2 y 1C, 2C colectadas de espárrago y cítrico muestran notable semejanza a *himenópteros* de la especie *Ganaspis xanthopoda* y *Fidiobia* sp (Tabla 1).

Las secuencias de 30 muestras identificadas como insectos pertenecientes a Cecidomyiidos fueron subidas a la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), que hace parte de la colaboración de la base de datos de Japón (DDBJ) y del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (accesiones KJ023791 a KJ023820).

Los resultados sugieren que las larvas de *Prodiptosis* sp. podrían estar siendo parasitadas naturalmente por *himenópteros* parasitoides. Las microavispa de la especie *G. xanthopoda* se han reportado como parasitoides del díptero

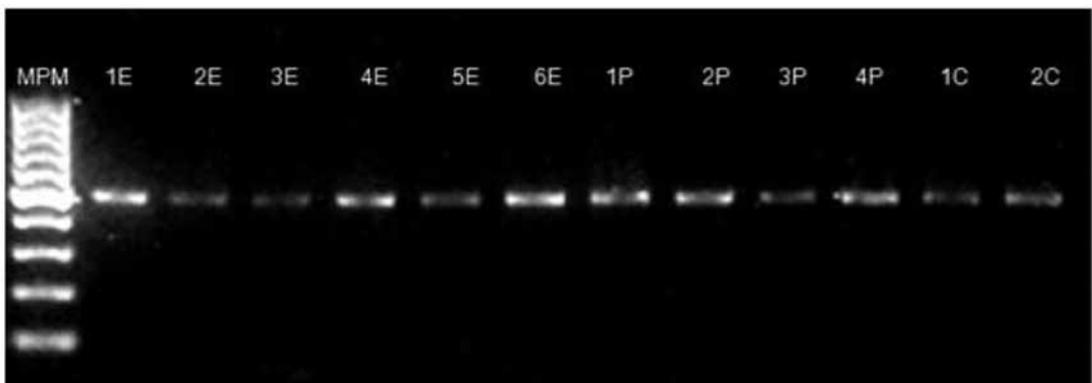


Figura 2. Amplificación por PCR del ADNmt con iniciadores COIS/COIA en muestras de *Prodiptosis* sp. de espárrago (1E-6E), pimiento (1P-4P) y cítrico (1C-2C). M: Marcador de Peso Molecular.

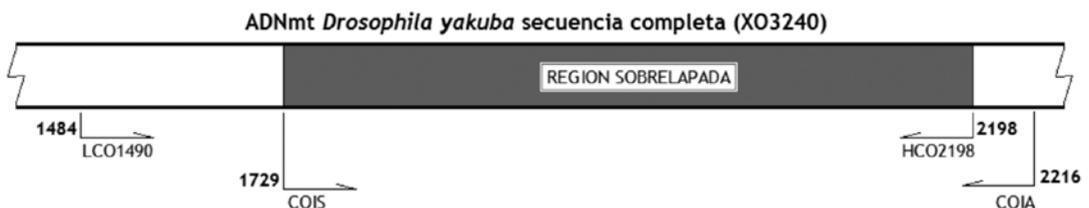


Figura 3. Región del ADNmt de *D. yakuba* XO3240 indicando los sitios de hibridación de los iniciadores LCO1490/HCO2198 y COI/COIA. La región sobrelapada de los productos de secuenciación de las muestras de *Prodiptosis* sp. se resalta en gris.

Tabla 1. Alineamiento en Blast de las secuencias de ADNmt de *Prodiplosis* sp.

| Muestra | Procedencia | Codificación | Caracterización (BLAST)       | Simple PCR  |                  |
|---------|-------------|--------------|-------------------------------|-------------|------------------|
|         |             |              |                               | % Cobertura | % Máx. identidad |
| 1       | Espárrago   | 1L           | <i>Contarinia</i> sp.         | 94          | 92               |
| 2       |             | 2L           | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 94          | 92               |
| 3       |             | 3L           | <i>Contarinia</i> sp.         | 94          | 92               |
| 4       |             | 4L           | <i>Contarinia</i> sp.         | 94          | 92               |
| 5       |             | 6L           | <i>Contarinia</i> sp.         | 94          | 92               |
| 6       |             | 7L           | <i>Contarinia</i> sp.         | 94          | 92               |
| 7       |             | 10L          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 94          | 92               |
| 8       |             | 13L          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 94          | 92               |
| 9       |             | 14E          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 92               |
| 10      |             | 15E          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 99          | 91               |
| 11      |             | 16E          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 92               |
| 12      |             | 17E          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 92               |
| 13      |             | 18E          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 92               |
| 14      |             | 19L          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 94          | 92               |
| 15      |             | 20E          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 92               |
| 16      |             | 21E          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 92               |
| 17      |             | 22E          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 92               |
| 18      |             | E1           | <i>Ganaspis xanthopoda</i>    | 98          | 98               |
| 19      |             | E2           | <i>Ganaspis xanthopoda</i>    | 99          | 99               |
| 20      | Cítrico     | 1C           | <i>Fidiobia</i> sp.           | 100         | 86               |
| 21      |             | 2C           | <i>Fidiobia</i> sp.           | 100         | 86               |
| 22      |             | 23C          | <i>Contarinia</i> sp.         | 100         | 92               |
| 23      |             | 24C          | <i>Contarinia</i> sp.         | 100         | 92               |
| 24      |             | 25C          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 92               |
| 25      | Pimiento    | 1P           | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 93               |
| 26      |             | 2P           | <i>Contarinia</i> sp.         | 100         | 92               |
| 27      |             | 3P           | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 92               |
| 28      |             | 4P           | <i>Contarinia</i> sp.         | 100         | 92               |
| 29      |             | 5P           | <i>Contarinia</i> sp.         | 100         | 92               |
| 30      |             | 6P           | <i>Contarinia</i> sp.         | 100         | 92               |
| 31      |             | 7P           | <i>Contarinia</i> sp.         | 100         | 92               |
| 32      |             | 8P           | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 93               |
| 33      |             | 9P           | <i>Contarinia</i> sp.         | 100         | 92               |
| 34      |             | 10P          | <i>Sitodiplosis mosellana</i> | 100         | 93               |

*Drosophila melanogaster*; mientras que dentro de la superfamilia Platygastridae se encuentran importantes himenopteros controladores biológicos como los del género *Synopeas*, reportados en bibliografía como parasitoides de *Prodiplosis vaccinii* y otros Cecidomyiidos como *Dasineura oxycoccana* que afectan los cultivos de arándano (Sampson, *et al.*, 2006).

Las correcciones de las secuencias, así como el alineamiento múltiple en Mega5 de las secuencias de *Prodiplosis* sp., con secuencias de especies relacionadas recuperadas del GenBank, delimitó una región de solapamiento de 435 bases, las que fueron consideradas como set de datos para los análisis filogenéticos y de diversidad genética. Se

seleccionó arbitrariamente la secuencia de la muestra 1L colectada de espárrago como secuencia consenso, sobre la que se comparó el resto de secuencias de *Prodiplosis* sp. (Tabla 2). El análisis de composición nucleotídica de las secuencias homólogas a Cecidomyiidos revela un bajo polimorfismo en la posición 1 (2,76%), siendo la posición 3 la que presenta mayor sustitución nucleotídica (12,41%), por lo que predominarían las mutaciones sinómicicas, que no causan variación de aminoácidos (Tabla 3). Se observa que dentro del fragmento de 435 pb existe una mayor frecuencia de timina y adenina, con 41,6% y 33,3% comparado con 14,5% de citosina y 10,6% de guanina. La probabilidad de sustitución (r) de una base por otra se muestra en el

Tabla 2. Resultado del alineamiento y corrección de secuencias del producto de amplificación del ADNmt de *Prodiplosis* sp. colectado de espárrago, muestra 1L (secuencia consenso).

|            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ATAGCATTCC | CACGAATAAA | TAATATAAGA | TTTTGATTAT | TACCTCCATC | <b>50</b>  |
| TTTATCTTTA | TAATTAATTA | GAAGAATAGT | TGAAACAGGA | ACTGGAACAG | <b>100</b> |
| GTTGAACAGT | ATATCCTCCT | CTATCTTCTA | TTATTGCTCA | TACAAGAACA | <b>150</b> |
| TCTGTAGATT | TTTCTATTTT | TTCTCTTCAT | ATTGCAGGTA | TTTCTTCTAT | <b>200</b> |
| TTTAGGAGCA | ATTAATTTTA | TTTCTACAAT | ATTAATATA  | AAAATTAAAT | <b>250</b> |
| TTTTAAATTT | TGATCAAATT | TCTTTATTTA | TTTGATCAAT | TTTAATCACA | <b>300</b> |
| ACAATTTTAC | TTTTACTTTC | ATTACCTGTA | TTAGCTGGAG | CAATTACAAT | <b>350</b> |
| ATTATTAACA | GATCGAAACT | TAAATACATC | ATTTTTTGAC | CCTATAGGAG | <b>400</b> |
| GAGGAGATCC | TATTTTATAT | CAACATTTAT | TTTGA      |            | <b>435</b> |

Tabla 3. Composición de nucleótidos en la región parcial de la región COI del ADNmt de los grupos 1 y 2 de *Prodiplosis* sp.

| Región                 |   | Posición en codón |               |      |               |      |               |      |               |
|------------------------|---|-------------------|---------------|------|---------------|------|---------------|------|---------------|
| COI                    |   | Total             |               | 1er  |               | 2do  |               | 3er  |               |
| Nº de sitios           |   | 435               |               | 145  |               | 145  |               | 145  |               |
| Nº de sitios variables |   | 25                | 5,75%         | 4    | 2,76%         | 15   | 10,35%        | 18   | 12,41%        |
| % de                   | T | 41,6              | (41,4 – 42,1) | 35   | (34 – 35)     | 44   | (43 – 44)     | 46   | (45 – 47)     |
| Frecuencia de          | C | 14,5              | (14,3 – 14,7) | 13,1 | (13,1 – 13,8) | 27,6 | (27,6)        | 2,9  | (2,1 – 3,5)   |
| bases (rango)          | A | 33,3              | (32,7 – 33,8) | 33,9 | (31,1 – 34,5) | 15,2 | (15,2 – 15,9) | 50,7 | (50,3 – 51,0) |
|                        | G | 10,6              | (10,3 – 11,1) | 17,9 | (17,2 – 18,6) | 13,1 | (14,4 – 13,1) | 0,7  | (0,0 – 1,4)   |

orden de filas por columnas de la Tabla 4, donde se muestran los ratios de sustituciones transicionales (negritas) y transversionales (cursiva), siendo los ratios de transición/transversión de purinas (k1): 1,867 y de pirimidinas (k2): 1,986. La tendencia del conjunto de transiciones/transversiones R es 1,526, lo que indicaría que hay mayores sustituciones transversionales que transicionales (Nei y Gojoberi, 1986). El análisis se basó en 30 secuencias de nucleótidos con 434 posiciones analizadas en el set de datos finales, realizado mediante el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

Los dendrogramas fueron elaborados utilizando el modelo de Kimura 2 parámetros y el método estadístico Neighbor-Joining con valores *bootstrap* de 10.000 réplicas (datos no mostrados). Las secuencias sometidas a análisis filogenético por el modelo Maximum Composite Likelihood del método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) con test *bootstrap* de 10.000 árboles replicados se muestran en las figuras 4 y 5. Los árboles están dibujados a escala con longitudes de rama en las mismas distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético.

La relación evolutiva de la región del ADNmt de las muestras de *Prodiplosis* sp., semejantes a

Tabla 4. Estimación del patrón de sustitución nucleotídica en la región parcial del COI del ADNmt de *Prodiplosis* sp.

|   | A            | T            | C           | G           |
|---|--------------|--------------|-------------|-------------|
| A | –            | 6,87         | 2,4         | <b>9,27</b> |
| T | 5,45         | –            | <b>7,45</b> | 1,74        |
| C | 5,45         | <b>21,32</b> | –           | 1,74        |
| G | <b>29,05</b> | 6,87         | 2,4         | –           |

Cecidomyiidos analizadas con los organismos recuperados de la base de datos del GeneBank, arroja un árbol filogenético óptimo con longitud ramal de 0,859 (datos no mostrados), separando las muestras de *Prodiplosis* sp. en dos clados definidos con valores *bootstrap* del 99% de confianza (Figura 3); este ordenamiento se consideró para determinar los grupos 1 y 2 que servirán para los análisis de diversidad genética. Las secuencias de las muestras semejantes a himenópteros se comportan como grupo externo más distantes que *D. yakuba* (NC\_001322) y *M. domestica* (ACF36912).

Con las secuencias aminoacídicas de la región del ADNmt amplificada se construyó el dendrograma óptimo de longitud ramal igual a 1,483, usando el método UPGMA (Figura 5). Las distancias fueron

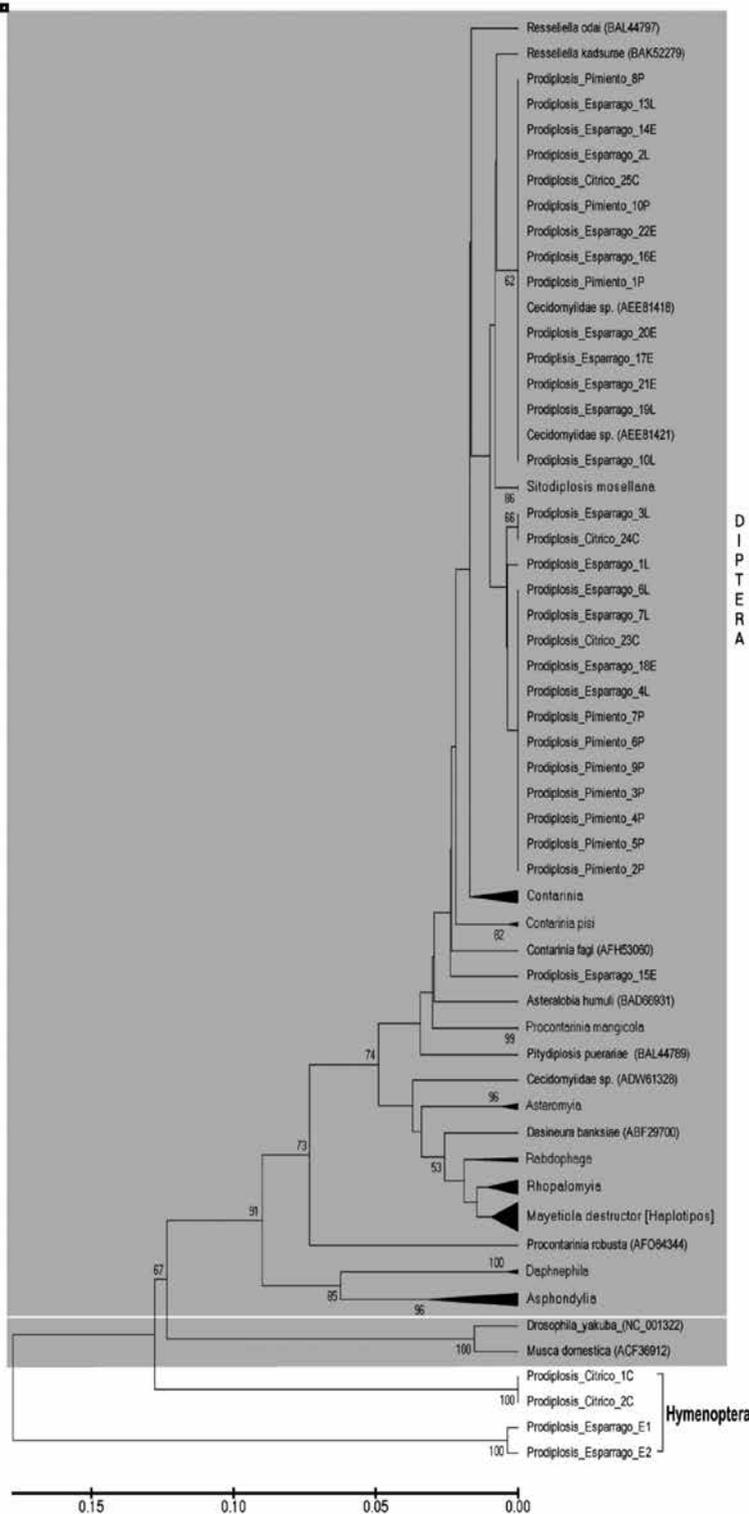
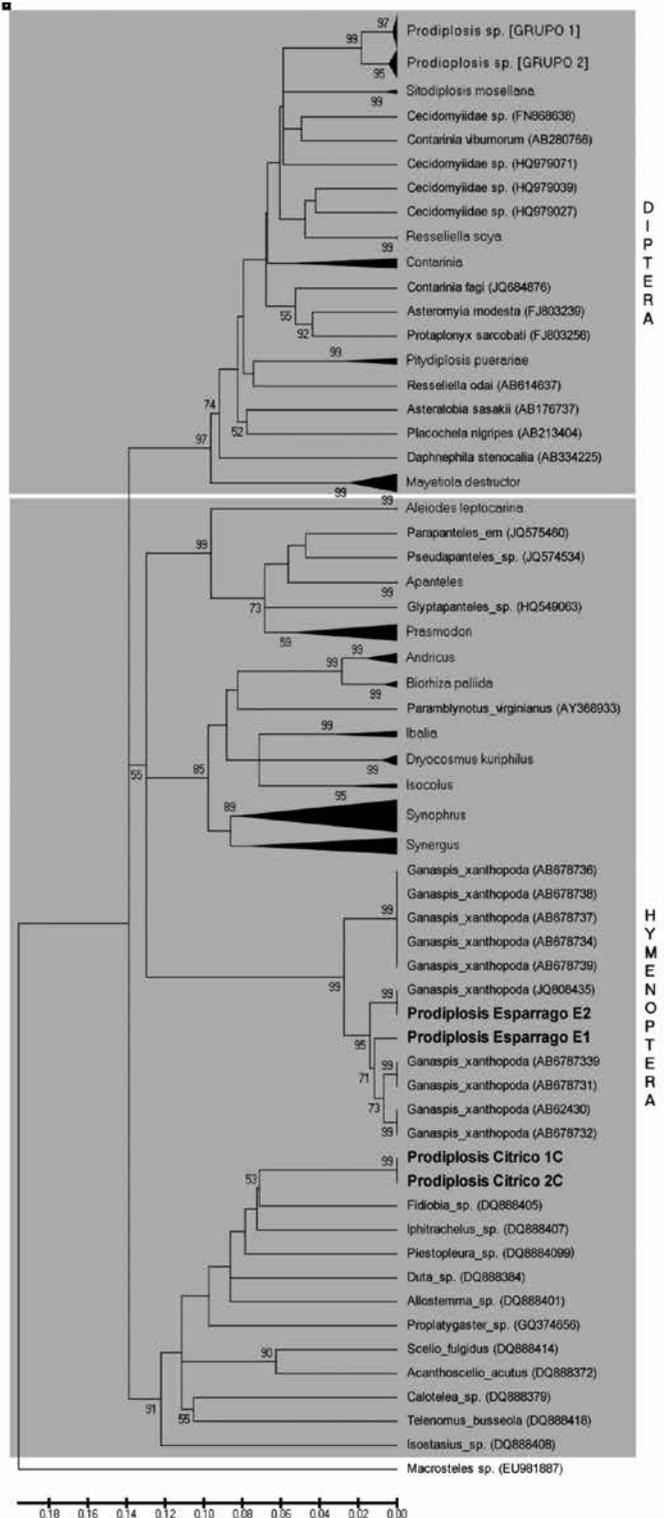


Figura 4. Árbol filogenético usando el método UPGMA a base de comparación de secuencias aminoacídicas del gen COI del ADNmt de organismos semejantes a las secuencias de *Prodiplosis* sp. de los grupos 1 y 2, mostrando relación cerrada con otros dípteros de la familia Cecidomyiidae recuperados del GenBank. Se observa que dos muestras de *Prodiplosis* sp. de espárrago y dos colectadas de brotes de cítricos conforman otros clados más distantes que el grupo externo. Se usaron como grupo externo otros dípteros como *Bradysia*, *Musca domestica* y *Drosophila*. El árbol Neighbor-joining fue construido usando el modelo de sustitución nucleotídica de Poisson. La confianza de las ramas se obtuvo a partir de 10.000 réplicas y son dados en los puntos de ramificación. Subramas del mismo género se muestran comprimidas. Valores *bootstrap* menores a 50% no se muestran. Los números de accesión de la base de datos son dados entre paréntesis, a la derecha del nombre científico.

Figura 5. Árbol filogenético a base de comparación de secuencias nucleotídicas del gen COI del ADNmt, mostrando relación cerrada entre las muestras de *Prodiplosis* sp., E1 y E2, colectadas de espárrago, con microavispa parasitoides de la especie *Ganaspis xanthopoda*, igualmente las muestras de *Prodiplosis* sp., colectadas de cítricos (1C y 2C) se asocian con himenópteros de la superfamilia Platygastroidea que incluye importantes especies de microavispa parasitoides controladoras de lepidópteros como *Telenomus* y parasitoides de Cecidomyiidos como *Synopeas*. Los clados que agrupan las muestras de *Prodiplosis* sp., de los grupos 1 y 2 se han comprimido. Se usó como grupo externo un hemíptero de la especie *Macrosteles* sp. El árbol UPGMA consenso fue construido usando el modelo de sustitución nucleotídica de Maximum Composite Likelihood. La confianza de las ramas se obtuvo a partir de 10.000 réplicas y son dados en los puntos de ramificación. Valores *bootstrap* menores a 50% no son mostrados. Los números de accesión de la base de datos son dados entre paréntesis a la derecha del nombre científico.



calculadas usando el método de corrección de Poisson y son dadas en unidades de número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis involucró 93 secuencias de aminoácidos y 132 posiciones en el set de datos finales.

La determinación de los grupos 1 y 2 en el set de datos del programa MEGA5 permitió realizar los análisis de diversidad genética poblacional ( $H_T = 0,019$ ), diversidad genética dentro de cada población ( $H_s = 0,005$ ) y diversidad interpoblacional ( $D_{ST} = H_T - H_s = 0,014$ ). Además se estimó el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{ST} = D_{ST} / H_T = 0,733$ ) que representa el número de sustituciones de bases por sitio (Nei y Kumar, 2000). Los análisis fueron conducidos mediante el modelo de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), usando el programa MEGA5.

El análisis de la población de los grupos 1 y 2 de *Prodiplosis* sp. revela que existe una baja diversidad genética entre poblaciones ( $D_{ST} = 0,014$ ). Los valores de  $G_{ST}$  cercanos a 1,0 indican que la mayor variabilidad genética reside entre poblaciones, mientras que bajos valores de  $G_{ST}$  ( $< 0,5$ ) indica que una mayor variabilidad genética se da dentro de una población dada. La variación genética dentro y entre ( $G_{ST}$ ) de las muestras de *Prodiplosis* sp. muestra que existe un bajo grado de variabilidad dentro de la población (26,7%) y una mayor variación entre poblaciones (73,3%).

Las comparaciones por pares se realizaron para probar divergencia genética interpoblacional ( $F_{ST}$ ), un parámetro que describe el grado de diferenciación entre poblaciones y se define como la correlación de genes en diferentes individuos de la misma población (Weir y Cockerham, 1984). Bajo el supuesto de que la tasa de mutación es baja, al menos mucho más baja que la tasa de migración,  $F_{ST}$  toma valores entre 0 y 1, de esta forma valores cercanos a cero indica que no existe diferenciación genética mientras que valores cercanos a 1 indican

que existe diferenciación genética total. Los grupos 1 y 2 de *Prodiplosis* sp. presentan un  $F_{ST}$  de 0,01129, por lo que se interpreta que no existe diferenciación genética entre poblaciones.

El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) fue realizado mediante el programa Arlequin 3,5 (Excoffier *et al.*, 2005) para asegurar la estructura genética y la variabilidad genética presente dentro y entre poblaciones (Tabla 5). AMOVA toma en cuenta el número de mutaciones entre los diferentes haplotipos dividiendo la varianza total en componentes aditivos organizados jerárquicamente dentro de las poblaciones, entre poblaciones, dentro de grupos y entre grupos. Mediante el programa Arlequin se identificó la existencia de dos haplotipos (h1: TC y h2: GT) en la región del ADNmt en análisis. Un haplotipo es definido básicamente como una única forma genética que difiere de cualquier otra forma por variaciones en las posiciones individuales (al menos en un nucleótido) en una secuencia de ADN (Templeton, 2006). Para el caso del ADNmt, debido a que este no sufre recombinación, la identificación de un haplotipo es única para cada uno de los polimorfismos genéticos posibles que se pueden generar para el fragmento analizado. Por ello, la presencia de un haplotipo en uno o varios cultivos y localidades determinadas indicaría que la población migró de un lugar a otro (Nagoshi *et al.*, 2007). En nuestro estudio, ambos haplotipos se presentan en ambos grupos de las *Prodiplosis* sp. muestreadas, lo que confirma la migración de poblaciones de *Prodiplosis* sp. de un cultivo a otro.

Los resultados del AMOVA para la región COI indican que las diferencias entre los dos grupos de *Prodiplosis* sp. aplican únicamente el -1,13% de la varianza entre poblaciones y el 101,13% se encuentra dentro de las poblaciones (Tabla 5). Los estimadores estadísticos en el AMOVA son variables aleatorias y pueden tomar valores positivos o negativos. Por lo general los componentes ligeramente negativos

Tabla 5. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para la población de *Prodiplosis* sp. usando el programa Arlequin 3,5.

| Fuente de variación    | d.f. | Suma de cuadrados | Componentes de la varianza | Porcentaje de variación |
|------------------------|------|-------------------|----------------------------|-------------------------|
| Entre poblaciones      | 1    | 0                 | -0,00251                   | -1,13                   |
| Dentro de la población | 178  | 40                | 0,22472                    | 101,13                  |
| Total                  | 179  | 40                | 0,22221                    |                         |

Nota.- d.f. = grados de libertad.

de la varianza pueden ocurrir en ausencia de estructura genética, cuyo significado biológico puede interpretarse como el que organismos lejanos (en cuanto a cruzamientos) pueden conservar sus genes más relacionados entre grupos que dentro de cada población. Los valores negativos deben ser interpretados como cero en el AMOVA (Schneider *et al.*, 2000).

El flujo de genes Nm entre los dos grupos de *Prodiplosis* sp. evaluados resultó alto, siendo de 43,79. En general se considera que valores de Nm cercanos o mayores de 5 son considerados suficientes para mantener una relativa homogeneidad del *poll* de genes (Slatkin, 1987). Estos resultados indican que aparentemente no hay diferenciación entre las poblaciones muestreadas. La falta de diferenciación genética entre poblaciones es generalmente considerada como el resultado de un suficiente flujo de genes, típicamente dado por migraciones, ocurriendo en todas las poblaciones para contrarrestar los efectos de la selección o la deriva genética.

Las migraciones de *Prodiplosis* sp. se sustentarían en el manejo agronómico de los cultivos (hospederos), ya que en el cultivo de espárrago dos veces al año se realizan chapodos (corte desde la base del tallo y eliminación de toda la parte aérea para inducir el brote de turiones), obligando a las *Prodiplosis* sp. a migrar hacia otros hospederos. El cultivo de pimiento se desarrolla de forma estacional una vez por año por un periodo de 24 semanas que luego de culminada la cosecha, la planta es eliminada y las poblaciones de *Prodiplosis* sp. migran hacia hospederos alternos. En el caso del cítrico el daño de *Prodiplosis* sp. se da solo durante el desarrollo de nuevos brotes, lo que ocurre igualmente una vez por año, por lo que la población de *Prodiplosis* sp. asociada a cítrico no permanece constante en el cultivo. Estas migraciones explicarían el constante flujo de genes y por tanto la escasa diferenciación genética.

Los datos de diversidad genética son congruentes y se encuentra dentro de la variabilidad esperada de la población, por lo que se infiere que la población de *Prodiplosis* sp., estudiada en el presente trabajo, conforma una única especie con dos haplotipos.

### Conclusiones

La modificación del protocolo de extracción propuesto por Waeyenberge *et al.*, 2000, permitió obtener ADN de *Prodiplosis* sp. de buena calidad, del

que se logró amplificar y secuenciar regiones del ADNmt con los iniciadores COIS/COIA (490 bp) y LCO1490/HCO2198 (712 bp).

El análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas del ADNmt proporciona valores de 94 a 100% de cobertura y 91 a 93% de máxima identidad a *S. mosellana* o *Contarinia* sp., independientemente del hospedero de donde provenga, conformando dos grupos bien definidos y evidenciados en los análisis filogenéticos (test *bootstrap*) y la obtención de producto de amplificación con secuencia semejante a himenópteros indicaría que las larvas de *Prodiplosis* sp. podrían estar siendo parasitados de forma natural por microavispa de la especie *Ganaspis xanthopoda* y otro miembro de la superfamilia Platygastroidea.

Existe polimorfismo en 5,98% en las regiones del ADNmt por posición, siendo la posición 3 de los codones la más polimórfica, con 12,41% de variabilidad. La tendencia de los ratios transicionales / transversionales es  $R = 1,526$ , lo que indica que hay mayores sustituciones transversionales, es decir, que las sustituciones nucleotídicas predominantes son de purina a pirimidina y viceversa, ello implica el cambio de un anillo a dos o viceversa.

Los árboles filogenéticos de las regiones del ADNmt revelan el ordenamiento de las muestras de *Prodiplosis* sp., confirmando las distancias evolutivas por las que estas se agrupan en dos clados bien definidos conformados dentro del orden Diptera, familia Cecidomyiidae, mientras que los ejemplares semejantes a himenópteros se asocian a especímenes de este orden.

Los índices de diversidad genética en la población total ( $H_T = 0,019$ ), dentro de las poblaciones ( $H_s = 0,005$ ) e interpoblacional ( $D_{ST} = 0,014$ ), demuestran que la divergencia entre las muestras analizadas es escasa, siendo la variabilidad dentro de los grupos de 26,7% y entre grupos de 73,3%, además, la varianza (AMOVA) entre poblaciones (-1,13%) y los estadísticos  $F_{ST}$  (0,01129) son relativamente bajos, lo que se explica por el alto flujo de genes Nm (43,79), por tanto se sugiere que no hay diferencia significativa aparente de las poblaciones, lo que se explica por la alta migración que desarrolla esta plaga según el manejo agronómico y la fenología del cultivar hospedero que obliga a los insectos adultos a migrar a hospederos alternos, elevando la tasa de flujo de genes.

El análisis AMOVA demuestra la existencia de dos haplotipos presentes en todos los especímenes

analizados (h1: TC y h2: GT), ello concuerda con la premisa de la migración de especímenes de *Prodiplosis* sp. a diferentes hospederos, por lo tanto, sobre la base de nuestros resultados se sugiere que los cultivos correspondientes a *Asparagus officinalis*, *Capsicum annuum* y *Citrus* spp. son vulnerables a esta plaga, por una única especie de *Prodiplosis* sp.

### Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Ciencia y Tecnología-Fincyt (Fondos

para la Innovación, Ciencia y Tecnología). Agradecemos al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú (Concytec) por su interés en el desarrollo de investigación, ciencia y tecnología en el país. Al Centro de Investigaciones Biotec-CMC del Grupo D&C por invertir en investigaciones de Biotecnología. Un agradecimiento especial al Dr. Luis Ponce Soto por su ayuda en las correcciones del manuscrito. A todo el equipo de investigación de Biotec-CMC por su apoyo incondicional en este trabajo y sus observaciones durante el desarrollo del mismo.

### Literatura Citada

- Bayer, S.A.  
1995. *Prodiplosis* o “mosquilla de los brotes”. Hoja informativa. División fitosanitaria. Lima, Perú, 1 p.
- Clary, D.O. y Wolstenholme, D.R.  
1985. The mitochondrial molecule of *Drosophila yakuba* nucleotide sequence, gene organization and genetic code *J Molec Evol*, 22: 252-271.
- Díaz, B.  
1981. *Prodiplosis* sp. (Diptera: Cecidomyiidae), plaga de la alfalfa y otros cultivos. *Rev. Peruana. Entomología*, 24 (1): 95-97.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S.  
2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Gagné, R. J.  
2010. Update for a catalogue of the Cecidomyiidae (Diptera) of the World. Systematic Entomology Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture. Available from: [http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12754100/Gagne\\_2010\\_World\\_Catalog\\_Cecidomyiidae.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12754100/Gagne_2010_World_Catalog_Cecidomyiidae.pdf)
- Gagné, R.J. & Wuensche, A.L.  
1986. Identity of the Asphondylia (Diptera: Cecidomyiidae) on Guar, *Cyamopsis tetragonoloba* (Fabaceae), in the southwestern United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 79: 246-250.
- Lamb, R.J.; Wise, I.L.; Olfert, O.O.; Gavloski, J. and Barker, P.S.  
1999. Distribution and seasonal abundance of *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) in spring wheat. *The Canadian Entomologist*, 131: 387-397.
- Nagoshi, R.; Silvie P., and Meagher R.  
2007. Comparison of Haplotype Frequencies Differentiate Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Corn-Strain Populations from Florida and Brazil. *J. Econ. Entomol.*, 100 (3): 954-961.
- Neal, J.W. y Gott, K.M.  
1988. Evidence for multivoltinism in *Prodiplosis plantain* Gagne (Diptera: Cecidomyiidae), a leaf curl medge of American sycamore. *Proc. Entomol*, 90 (2): 201-203.
- Nei, M. y Gojobori, T.  
1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.*, 3: 418-426.
- Nei, M. and Kumar, S.  
2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 333 pp.
- Peña, J.E.; Gagné, R.J. and Duncan, R.  
1989. Biology and Characterization of *Prodiplosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae) on Lime in Florida. *The Florida Entomologist*, 72 (3): 444-450.
- Peña, J.E. and Mead, F.W.  
2011. Citrus Gall Midge, *Prodiplosis longifila* Gagné (Insecta: Diptera: Cecidomyiidae) Entomology and Nematology Department. Extension Publication EENY-214. ([http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/citrus\\_gall\\_midge.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/citrus_gall_midge.htm)) Consulted: 24 Sep/2011.
- Sampson, B.J.; Rinehart, T.A.; Liburd, O.E.; Stringer, S.J.; and Spiers, J.M.  
2006. Biology of parasitoids (Hymenoptera) attacking *Dasineura oxycoccana* and *Prodiplosis vaccinii* (Diptera: Cecidomyiidae) in cultivated blueberries. *Ann. Entomol. Soc. America*, 99: 113-120.
- Slatkin, M.  
1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236: 787e792.
- Tamura, K. y Nei, M.  
1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.*, 10: 512-526.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; and Kumar, S.  
2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Templeton, A.R.  
2006. Populations genetics and microevolutionary theory. Chapter 1: Scope and Basic Premises of Population Genetics. Eds. John Wiley & Sons, Inc., p. 700.
- Tokuda, M.; Tabuchi, K.; Yukawa, J. and Amano, H.  
2004. Inter- and intraspecific comparisons between *Asteralobia* gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) causing axillary bud galls on *Ilex* species (Aquifoliaceae): species identification,

- host range, and mode of speciation. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 97: 957-970.
- Uechi, N., Tokuda, M., Yukawa, J., Kawamura, F.; Teramoto K. y Harris, K.
2003. Confirmation by DNA analysis that *Contarinia maculipennis* (Diptera: Cecidomyiidae) is a polyphagous pest of orchids and other unrelated cultivated plants. *Bulletin of Entomological Research*, 93: 545-551.
- Umeh, N. and Joshi, R.C.
1993. Aspects of the biology, ecology and natural biological control of the African rice gall midge, *Orseolia oryzivora* Harris and Gagné (Dipt., Cecidomyiidae) in south east Nigeria. *Journal of Applied Entomology*, 116: 391-398.
- Votycka, J.; Lantova, L.; Ghosh, K.; Braig, H. and Volf, P.
2009. Molecular Characterization of gregarines from sand flies (Diptera: Psychodidae) and description of *Psychodiella* n.g. (Apicomplexa: Gregarinida). *J. Euk. Microbiol.*, 56: 583-588.
- Waeyenberge, L.; Ryss, A.; Moens, M.; Pinochet, J. and Vrain, T. C.
2000. Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism. *Nematology*, 2: 135-142.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C.
1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wenk, C.E.; Kaufmann, C.; Schaffner, F. & Mathis, A.
- 2012 Molecular characterization of Swiss Ceratopogonidae (Diptera) and evaluation of real-time PCR assays for the identification of *Culicoides* biting midges *Veterinary Parasitology*, 184: 258-266.
- Yukawa, J.; Uechi, N.; Horikiri, M. and Tuda, M.
2003. Description of the soybean pod gall midge, *Asphondylia yushimai* sp. n. (Diptera: Cecidomyiidae), a major pest of soybean and findings of host alternation. *Bulletin of Entomological Research*, 93: 73-86.
- Zhu, L.; Liu, X.; Liu, X.; Jeannotte, R.; Reese, J.C.; Harris, M.O.; Stuart, J.J.; Chen, M.-S.
2008. Hessian fly (*Mayetiola destructor*) attack causes a dramatic shift in carbon and nitrogen metabolism in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21 (1): 70-78.

