

Protocolo para detectar la variabilidad genética de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en Algodonero, Arroz y Maíz en Colombia

Diana Victoria Marín Lenis¹; Diana Katherine Castillo Avila²; Jairo Rodríguez Ch²; Luis Augusto Becerra Lopez-Lavalle²; Cristo Rafael Perez³.

¹Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira; ²Centro Internacional de Agricultura tropical-CIAT; ³Fedearroz-Montería. Correo para correspondencia: j.chalarca@cgiar.org

INTRODUCCIÓN

En Colombia la producción de maíz, arroz y algodón se ve limitada por *S. frugiperda* (gusano cogollero). Actualmente, existen referencias de dos biotipos: (1) maíz – algodón y (2) arroz. Morfológicamente indistinguibles, pero que exhiben respuesta diferencial a insecticidas y *Bt*. El propósito de esta investigación, es documentar la composición genética de *S. frugiperda* en Colombia.

OBJETIVOS

Caracterizar y diferenciar a nivel genético poblaciones de *S. frugiperda* procedentes de cuatro subregiones agrícolas de Colombia: Valle del Río Magdalena (VGRM), Caribe Húmedo (CH), Valle del Río Cauca (VGR) y la Orinoquía, implementando la técnica de Código de Barras Genético, mediante el uso del gen de la Citocromo Oxidasa I (COI) en individuos colectados en maíz, algodón y arroz.

METODOLOGÍA

La aproximación metodológica, se dividió en tres fases principales: Colecta del material biológico, Laboratorio y Análisis Bioinformático (Fig. 1).

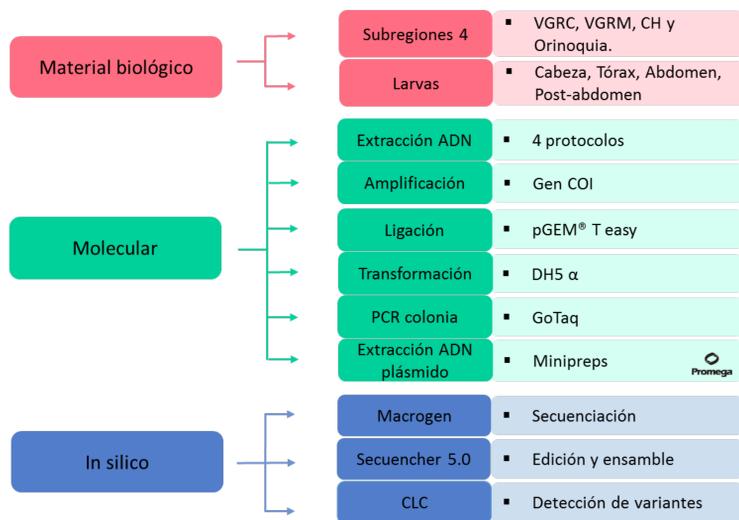


Figura 1. Representación esquemática de la aproximación metodológica empleada en la identificación de protocolos para la detección de biotipos de *S. frugiperda*.

Evaluación de protocolos para aislamiento de ADN

Se seleccionaron como base cuatro protocolos publicados, para su posterior evaluación, selección y modificación si fuese necesario (Fig. 2).



Figura 2. Representación esquemática de los pasos claves en cada uno de los protocolos de aislamiento de ADN de *S. frugiperda*. En el esquema se muestra la sección del cuerpo empleada y la duración aproximada de cada protocolo.

RESULTADOS

Evaluación de protocolos para aislamiento de ADN

A partir de la evaluación cualitativa y cuantitativa de la calidad del ADN obtenido en los cuatro protocolos, se puede apreciar, que el protocolo número 1 presentó la mejor calidad en términos de integridad y rendimiento del ADN extraído (Fig. 3).

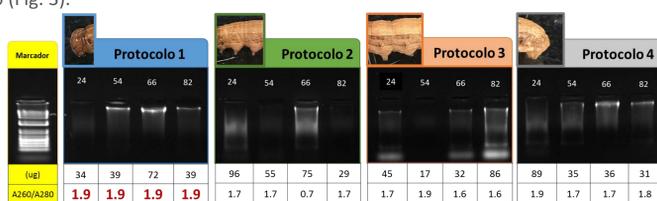


Figura 3. Gel de calidad del ADN de *S. frugiperda* extraído a partir de los cuatro protocolos. Las muestras fueron evaluadas en un gel de calidad al 0.8% teñido con SYBR® Safe. Las muestras de ADN fueron diluidas 1:10. Se empleó el marcador de peso 1kb plus Ladder de Invitrogen™ (Cat. No. 10787018).

Estandarización del protocolo 1 para aislamiento de ADN

A partir del protocolo número 1, se llevaron a cabo modificaciones en los tiempos de lavado, que consistían en períodos de agitación, inmediatamente después de la aplicación de compuestos orgánicos, los cuales contribuían a la remoción eficiente de residuos celulares que pudieran participar en la degradación posterior de la muestra. Adicionalmente se extendió el periodo en isopropanol para favorecer la mayor precipitación de ácidos nucleicos, y se adicionó una concentración final de RNasa 1 mg/ml, Para eliminar trazas de RNA que pudieran estar presentes en la muestra (Fig. 4).



Figura 4. A) Estandarización del protocolo 1 para la obtención de ADN de alta calidad de *S. frugiperda*. A) Los pasos incorporados para mejorar el rendimiento del ADN están señalados en rojo. B) Gel de calidad del ADN aislado a partir del protocolo 1 modificado en este estudio. C) Valoración cuantitativa del ADN aislado a partir del protocolo 1 mediante el equipo Thermo Scientific™ NanoDrop™

Evaluación del ADN aislado del protocolo 1

A partir del ADN obtenido en el protocolo 1 modificado, se puede evidenciar que su calidad es idónea para llevar a cabo la amplificación mediante PCR convencional del gen COI y su posterior clonación. La calidad de las bandas no presentan evidencia de degradación, ni presencia de productos inespecíficos (Fig. 5).

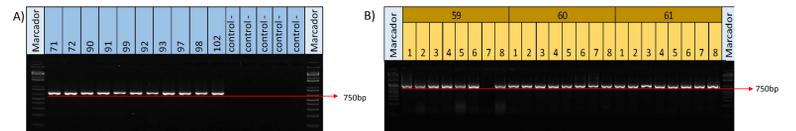


Figura 5. A) Calidad de la amplificación del ADN de *S. frugiperda* para el gen COI mediante PCR convencional. B) Calidad de la amplificación mediante PCR convencional utilizando GoTaq® Green Master Mix de las colonias con coloración positiva, para presencia del inserto del gen COI.

Tabla de polimorfismos

A partir de la edición y ensamblaje de las secuencias obtenidas se comparó el número de polimorfismos presentes, utilizando las secuencias consenso por inclusión de cada una de las muestras. La secuencia utilizada como referencia fue aquella que presentó el menor número de variaciones a lo largo de la secuencia. Los polimorfismos encontrados corresponden principalmente a sustitución de nucleótidos (Fig. 6).

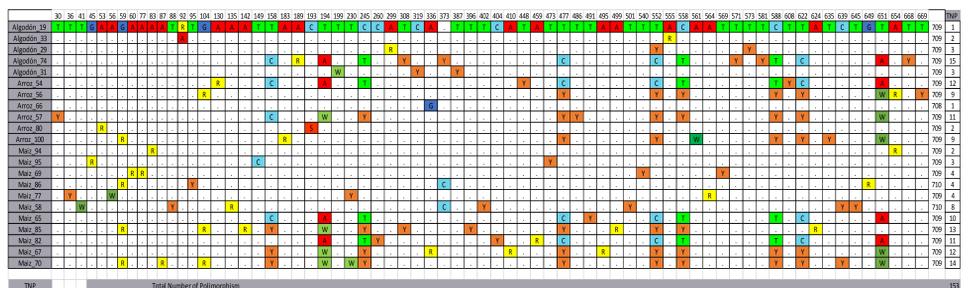


Figura 6. Posiciones relativas en las secuencias, donde se presentaron polimorfismos. Cada letra representa la sustitución de dos nucleótidos: R=A,G; Y=C,T; K=G,T; M=A,C; S=G,C; W=A,T; B=G,C,T; H=A,C,T; D=A,G,T; V=A,G,C; N=alguna; :=hueco. TNP es el número total de polimorfismos encontrados en cada secuencia.

CONCLUSIONES

- Este estudio aporta un protocolo estandarizado, sencillo, de bajo costo, efectivo en términos de tiempo, y de alto rendimiento para la obtención de ADN de alta calidad a partir de tejido de la cabeza de *S. frugiperda*.
- La aproximación metodológica de la clonación del gen COI, garantizó la obtención de secuencias de alta resolución, lo que permitió la identificación eficiente y confiable de polimorfismos asociados al gen COI en *S. frugiperda*.

BIBLIOGRAFÍA

- CANO CALLE, D. 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. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
- MARTINELLI, S.; CLARK, P.; ZUCCHI, M.; SILVA-FILHO, M.; FOSTER, J. E. y OMOTO, C. 2007. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. Bulletin of entomological research, 97 (3): 225-231.
- SALINAS-HERNANDEZ, H. y SALDAMANDO-BENJUMEA, C. 2011. Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains from Colombia. Neotropical Entomology, 40 (4): 421-430.