

CÓDIGOS DE BARRA DE ADN PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Lonchaea* FALLEN, 1820 (DIPTERA: LONCHAEIDAE) DE ANTIOQUIA^a

DNA BARCODING FOR IDENTIFICATION OF SPECIES OF THE GENUS *Lonchaea* FALLEN, 1820 (DIPTERA: LONCHAEIDAE) OF ANTIOQUIA

FRANCISCO JAVIER BALSEIRO TEHERÁN^{b*}, SANDRA INÉS URIBE SOTO^c

Recibido 2-03-2021, aceptado 20-04-2021, versión final 30-06-2021.

Artículo Investigación

RESUMEN: *Lonchaea* es el género con mayor número de especies y distribución dentro de la familia Lonchaeidae. Los individuos de esta familia son confundidos con los de la familia Tephritidae y ambos se encuentran afectando frutos. Los pocos estudios taxonómicos sobre el género hacen que la identificación de las especies sea difícil, especialmente con base en las hembras, colectadas más frecuentemente, ya que todas las claves existentes están basadas en la morfología de los machos. Se asignaron las secuencias código de barras de ADN para especímenes del género previamente identificados por morfología y verificados por especialistas, logrando mediante la agrupación en M-OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas Moleculares) la asociación de genotipos machos-hembras, proporcionando información molecular valiosa como apoyo para identificar individuos de ambos sexos, e incluso inmaduros colectados en campo o especímenes presentes en colecciones entomológicas.

PALABRAS CLAVE: Códigos de barras de ADN; *Lonchaea*; taxonomía.

ABSTRACT: *Lonchaea* is the genus with the largest number of species and distribution within the Lonchaeidae family. Normally the individuals of this family are confused with those of the Tephritidae family when they are affecting fruits. The few taxonomic studies that exist on the genus make species identification really difficult, especially based on females since all the existing keys are based on males. The relationship between morphological and molecular variability was analyzed for specimens of the genus *Lonchaea*, considering an initial identification of the species based on the morphology of the males. DNA barcode sequences were assigned to specimens of the genus previously identified by morphology and verified by specialists, achieving by grouping in M-OTUs (Molecular Operating Taxonomic Units) the association of male-female genotypes, providing valuable molecular information as support to identify individuals of both sexes, and even immatures collected in the field or specimens present in entomological collections.

^aBalseiro-Teherán, J. & Uribe-Soto, S. I. (2021). Códigos de barra de ADN para identificación de especies del género *Lonchaea* Fallen, 1820 (Diptera: Lonchaeidae) de Antioquia. *Rev. Fac. Cienc.*, 10(2), 51–66. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v10n2.94053>

^bEstudiante programa Maestría en Ciencias: Entomología, Universidad Nacional de Colombia-sede Medellín.

* Autor para la correspondencia: fjbalsei@unal.edu.co.

^cProfesora Titular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Coordinadora GSM. suribe@unal.edu.co

KEYWORDS: Barcode; *Lonchaea*; taxonomy.

1. INTRODUCCIÓN

Lonchaea Fallen (Lonchaeinae: Lonchaeini), es el género más grande de los nueve que se reportan actualmente para la familia Lonchaeidae a nivel mundial. Este género se encuentra en todas las regiones zoogeográficas, excepto la Antártida, con 218 especies descritas (MacGowan & Rotheray, 2019). De acuerdo con sus hábitos alimenticios y por sus efectos sobre la producción de frutas, el Instituto Colombiano Agropecuario ICA mediante la resolución 001 del 2011, estableció que algunas especies de la familia Lonchaeidae se consideran en la categoría de moscas de la fruta (ICA, 2011). Así mismo, en los planes de trabajo de exportación de frutas se incluyen especies de esta familia como de importancia cuarentenaria. En particular, el género *Lonchaea* ha sido reportado como plaga en cultivos comerciales de pasifloras (Chacón, 1984) y Pitahaya (Medina & Takumasa, 2012); sin embargo, no existen estudios epidemiológicos amplios para este grupo.

Se conoce muy poco sobre la taxonomía del género *Lonchaea*, el cual parece estar bien representado en América tropical. Aunque solamente 29 especies se han registrado para la región Neotropical, existen seguramente muchas especies por describir, cuya gran similitud morfológica, hace sumamente difícil su determinación (Korytkowski & Ojeda, 1971).

La identificación taxonómica de los especímenes causantes de daño y pertenecientes al género *Lonchaea*, se basa principalmente en los caracteres morfológicos de los machos, condición de uso general para muchos insectos especialmente en el orden Diptera. Dado el alto porcentaje de hembras recuperado con las metodologías tradicionales de muestreo y su difícil identificación, se hace necesario considerar metodologías complementarias a la morfología tradicional para asegurar una adecuada identificación. Para este caso se ha considerado de importancia la metodología del código de barras; que no es más que un sistema de identificación y descubrimiento de especies usando una sección corta de ADN de una región estandarizada del genoma (Hébert *et al*, 2003).

De acuerdo con Lanteri (2007) uno de los aspectos positivos de la iniciativa “códigos de barras de ADN” es que posibilita la asociación de los distintos estados de desarrollo ontogénico o de sexo de la misma especie. En concordancia con lo anterior, la presente investigación asignó las secuencias código de barras a individuos del género colectados en campo, incluyendo algunos determinados hasta especie o morfoespecie mediante estudio detallado de su morfología y trabajo con un especialista. De esta forma se asignó la identidad a las hembras de acuerdo con su ubicación en los M-OTUs definidos por las secuencias. Este se considera un avance importante hacia el uso de la taxonomía integrativa y en particular la incorporación de caracteres moleculares para el trabajo con el género *Lonchaea*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras estudiadas

Del material colectado por el sistema de monitoreo de moscas de la fruta del Instituto Colombiano Agropecuario ICA en el departamento de Antioquia entre marzo de 2018 y enero de 2019, se seleccionaron 100 muestras. De estas, 44 fueron obtenidas a través de muestreo de frutos de pasifloras y 56 de trampas McPhail cebadas con proteína hidrolizada de maíz, enriquecida con bórax. Del material colectado en las trampas se seleccionaron los especímenes del género *Lonchaea* los cuales fueron previamente identificados con base en caracteres morfológicos utilizando las diagnósis y claves taxonómicas propuestas por Korytkowski & Ojeda (1971); Luna (1987) y que fueron corroborados por el experto en el grupo Iain MacGowan y posteriormente depositados en la colección del Museo Entomológico Francisco Luis Gallego de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín MEFLG (NC MEFLG 50849 a MEFLF 50950); finalmente, se tomó una submuestra de especímenes de cada sitio con el fin de realizar la extracción de ADN, la amplificación de la región de interés y los demás procesos hasta la obtención de las secuencias a partir de cada uno de los especímenes del género; las cuales fueron subidas al Genbank con códigos de acceso MZ189743 a MZ189778.

2.2. Extracción de ADN

Para la extracción se utilizó el kit DNeasy 250 Blood & Tissue (Qiagen, Alemania) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. De cada individuo se tomó el tórax y dos patas, las demás estructuras se guardaron para los montajes de genitales y como referencia para la identificación con base en caracteres morfológicos. El éxito de las extracciones se verificó mediante cuantificación de ADN, inicialmente en un espectrofotómetro UV-VIS de barrido espectral y posteriormente en una electroforesis en un gel de agarosa al 0.1 % con GelRed a 80 voltios durante 45 minutos.

2.3. Amplificación y secuenciación de *coxI*

La amplificación, usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR se realizó en un volumen de reacción final de 30 μ l y los primers universales; LCO-1490 (5' - GGTCACAAATCATAA-AGATATTGG-3') y HCO-2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al*, 1994), incluyendo 3 μ L de buffer 5x, 1.92 μ L de 10 mM dNTPs, 2.6 μ L de 25 mM MgCl₂, 0,5 μ L Taq DNA Polimerasa de (5 U/ml) (Promega, USA), 0.96 μ L de 10 μ M de cada oligonucleótido; 15.26 μ L H₂O ultrapura y 4.8 μ L de ADN. El programa de ciclo térmico de PCR consistió en desnaturalización inicial de 5 min (94 °C), seguida por 35 ciclos de 94 °C durante 1 min (desnaturalización), 45 °C durante 1.50 min (alineamiento), 72 °C durante 1.50 min (extensión), y una extensión final a 72 °C durante 5 min y finalmente manteniendo a -25 °C hasta su análisis.

Luego de verificar la amplificación del fragmento de ADN objetivo se procedió a una purificación simple de los productos de PCR a través de un proveedor externo (Macrogen, Corea) y finalmente a la secuenciación por el método de Sanger a través de un proveedor externo con un secuenciador automático ABI 3730xl (Applied Biosystems™).

2.4. Análisis de secuencias

La calidad de las secuencias obtenidas fue verificada a través de programas bioinformáticos. Inicialmente a través del programa Geneious Prime 2020.2 se verificó la calidad del electroferograma y seguidamente se halló la secuencia consenso.

Durante el análisis para detectar la presencia de ADN mitocondrial nuclear NUMTS en las secuencias, según lo sugerido por Song *et al* (2008), se examinó la presencia de ambigüedades, lectura espectral ambigua y el ruido, entendido como difícil lectura de los picos. Posteriormente, se examinó la composición nucleotídica para detectar sesgos y se verificó la ausencia de acumulación de mutaciones, codones de parada e inserción o delección. Posteriormente con el fin de verificar que las secuencias pertenecían al grupo estudiado se realizó un BLAST (Altschul, 2005) tomando como referencia el genoma de *Ceratitis capitata* Wiedemann, 1824 (NCBI: NC_000857.1), se alineó cada una de las secuencias para confirmar la identidad del gen.

Las secuencias consenso obtenidas para cada individuo se alinearon usando el algoritmo MUSCLE (Edgare, 2004). El alineamiento final fue caracterizado en términos de variabilidad nucleotídica y frecuencia de transiciones y transversiones. El número de haplotipos se estimó en el programa DnaSP versión 6.0 (Rozas *et al*, 2017). El análisis de divergencia entre las secuencias que correspondían a los individuos de 9 localidades, medido por distancias genéticas, se realizó a través del programa MEGA X (Kumar *et al*, 2018) las cuales fueron calculadas utilizando el modelo de distancia de Kimura 2 parámetros - K2P (Kimura, 1980), con base en el cual se calcularon las distancias inter e intraespecíficas con bootstrap de 10000 réplicas. De acuerdo con los valores obtenidos se realizó el análisis Neighbour-Joining (NJ), el cual provee una representación gráfica de los patrones de divergencia entre especies.

2.5. Evaluación de la correspondencia morfología-molecular y asignación de identidad a las hembras con base en las secuencias

Para asignar la identidad de las hembras con base en su inclusión en M-OTUs de machos previamente identificados por morfología y corroborados por expertos se utilizaron dos criterios de amplio uso en estudios de esta índole:

1. Los rangos de divergencia expresados como distancias genéticas: “la divergencia de la secuencia de código de barras de ADN entre la mayoría de las especies congéneres es generalmente superior al 2%”

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1: Códigos de las secuencias coxI de especies de *Lonchaea* colectados en Antioquia, Colombia relacionando especie, localidad, sexo e identificación de la secuencia.

Especie	Sexo	Localidad	Secuencia	ID por morfología	Código de accesoión
<i>L. cristula</i>	M	Antioquia, Jericó, Vallecitos, La Aurora	Lcr88-1	SI	MZ189751
<i>L. cristula</i>	H	Antioquia, La Ceja, Llanadas, Manantial	Lcr82-2	NO	MZ189759
<i>L. cristula</i>	M	Antioquia, La Ceja, Llanadas, Manantial	Lcr82-1	SI	MZ189760
<i>L. cristula</i>	M	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lcr81-1	SI	MZ189761
<i>L. cristula</i>	H	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lcr81-2	NO	MZ189763
<i>L. cristula</i>	M	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lcr66-1	SI	MZ189764
<i>L. cristula</i>	H	Antioquia, Abejorral, La Esperanza, Agroaves s.a. s	Lcr44-2	NO	MZ189762
<i>L. cristula</i>	M	Antioquia, La Ceja, Llanadas, Manantial	Lcr29-1	SI	MZ189771
<i>L. cristula</i>	H	Antioquia, Guarne, NI, El Tesoro	Lcr28-2	NO	MZ189770
<i>L. cristula</i>	M	Antioquia, Guarne, NI, El Tesoro	Lcr28-1	SI	MZ189769
<i>L. cristula</i>	H	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Lcr25-2	NO	MZ189767
<i>L. cristula</i>	M	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Lcr25-1	SI	MZ189768
<i>L. cristula</i>	M	Antioquia, Guarne, Las Hojas, NR	Lcr19-1	SI	MZ189766
<i>L. cristula</i>	H	Antioquia, Guarne, Las Hojas, NR	Lcr19-2	NO	MZ189765
<i>L. cristula</i>	H	Antioquia, Abejorral, NI, San Felipe	Lcr11-2	NO	MZ189772
<i>L. cristula</i>	M	Antioquia, El Peñol, Horizonte, San Bartolo	Lcr5-1	SI	MZ189773
<i>L. longicornis</i>	H	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Llo26-2B	NO	MZ189748
<i>L. longicornis</i>	M	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Llo26-1C	SI	MZ189750
<i>L. longicornis</i>	M	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Llo26-1A	SI	MZ189755
<i>L. longicornis</i>	M	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Llo26-1B	SI	MZ189757
<i>L. longicornis</i>	H	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Llo26-2A	NO	MZ189749
<i>L. longicornis</i>	H	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Llo26-2C	NO	MZ189747
<i>L. aculeata</i>	H	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lac20-2B	NO	MZ189777
<i>L. aculeata</i>	M	Antioquia, San Vicente, NI, La Tomatera	Lac23-1	SI	-
<i>L. aculeata</i>	H	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Lac26-2	NO	MZ189776
<i>L. aculeata</i>	M	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lac70-1	SI	-
<i>L. aculeata</i>	M	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Lac26-1	SI	MZ189775
<i>L. aculeata</i>	H	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lac20-2A	NO	MZ189778
<i>L. curiosa</i>	H	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lcu70-2	NO	MZ189754
<i>L. curiosa</i>	M	Antioquia, El Peñol, Horizonte, San Bartolo	Lcu5-1	SI	MZ189758
<i>L. curiosa</i>	M	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lcu20-1	SI	MZ189752
<i>L. curiosa</i>	M	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lcu70-1	SI	MZ189753
<i>L. striatifrons</i>	M	Antioquia, Jericó, Vallecitos, La Aurora	Lst90-1A	SI	MZ189744
<i>L. striatifrons</i>	M	Antioquia, Jericó, Vallecitos, La Aurora	Lst90-1B	SI	MZ189743
<i>L. chalybea</i>	M	Antioquia, Guarne, NI, El Tesoro	Lch28-1	SI	MZ189774
<i>L. echinappina</i>	M	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lec17-1	SI	MZ189756
<i>Lonchaea sp. 3</i>	M	Antioquia, Jericó, La Mama, Benedictinos	Lsp17-1	NO	MZ189756
<i>Lonchaea sp. 5</i>	M	Antioquia, El Carmen de Viboral, Betania, Los Papayos	Lsp25-1	NO	-
<i>Lonchaea sp. 4</i>	M	Antioquia, Abejorral, NI, San Felipe	LspCL12-1	NO	-
<i>Lonchaea sp. 3</i>	M	Antioquia, Abejorral, NI, San Felipe	LspGB12-1	NO	MZ189745

Se purificaron y secuenciaron en ambos sentidos de la cadena de ADN, un total de 40 secuencias del mismo número de muestras para un total de 80 reacciones. Se obtuvieron 40 secuencias consenso del fragmento 5' del gen coxI, con un tamaño aproximado de 674 pb, cuyos números de accesoión se encuentran en la Tabla 1. Del total, 22 secuencias corresponden a especímenes morfológicamente identificados de 7 especies del género *Lonchaea* y 14 secuencias de hembras sin identificación a nivel de especie además de 4 secuencias provenientes de morfotipos de machos sin asignación por morfología. En cuanto a los sitios de ubicación de las trampas utilizados en este estudio, los detalles en la Tabla 1. Además, se indica los datos de cada una de las secuencias obtenidas. Todos los especímenes analizados provenían de colectas trampas McPhail ubicadas en cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims 1818).

Tabla 2: Haplotipos de las secuencias coxI

Haplotipo	# de secuencias	Composición individuos
HAP_1	3	<i>L. cristula</i> _81-1 <i>L. cristula</i> _81-2 <i>L. cristula</i> _66-1
HAP_2	2	<i>L. striatifrons</i> _90-1B <i>L. striatifrons</i> _90-1A
HAP_3	1	<i>Lonchaea</i> _sp._GB12-1
HAP_4	1	<i>Lonchaea</i> _sp._CL12-1
HAP_5	1	<i>Lonchaea</i> _sp._17-1
HAP_6	1	<i>Lonchaea</i> _sp._25-1
HAP_7	1	<i>L. longicornis</i> _26-2C
HAP_8	2	<i>L. longicornis</i> _26-2B <i>L. longicornis</i> _26-2A
HAP_9	2	<i>L. longicornis</i> _26-1C <i>L. longicornis</i> _26-1B
HAP_10	1	<i>L. longicornis</i> _26-1 ^a
HAP_11	1	<i>L. echinappina</i> _17-1
HAP_12	1	<i>L. curiosa</i> _70-2
HAP_13	1	<i>L. curiosa</i> _70-1
HAP_14	4	<i>L. aculeata</i> 20-2B <i>L. aculeata</i> 20-2A <i>L. aculeata</i> 26-2 <i>L. aculeata</i> 26-1
HAP_15	1	<i>L. curiosa</i> _20-1
HAP_16	1	<i>L. curiosa</i> _5-1
HAP_17	1	<i>L. cristula</i> _88-1
HAP_18	6	<i>L. cristula</i> _82-2 <i>L. cristula</i> _44-2 <i>L. cristula</i> _25-1 <i>L. cristula</i> _19-2 <i>L. cristula</i> _19-1 <i>L. cristula</i> _5-1
HAP_19	1	<i>L. cristula</i> _82-1
HAP_20	1	<i>L. cristula</i> _29-1
HAP_21	1	<i>L. cristula</i> _28-2
HAP_22	1	<i>L. cristula</i> _28-1
HAP_23	1	<i>L. cristula</i> _25-2
HAP_24	1	<i>L. cristula</i> _11-2
HAP_25	1	<i>L. L. chalybea</i> _28-1
HAP_26	1	<i>L. aculeata</i> _23-1
HAP_27	1	<i>L. aculeata</i> _70-1

La verificación de la identidad de las secuencias realizada por comparación con el alineamiento de referencia de *Ceratitis capitata* Wiedemann, 1824 (NCBI: NC.000857.1) indicó que las secuencias corresponden a las posiciones 1558 a 2234 del genoma mitocondrial de referencia, confirmando la amplificación de la región de interés que presentó un tamaño de 674 nucleótidos en promedio.

Las secuencias consenso fueron comparadas con secuencias del Genbank de la especie *Lonchaea ragnari* (HQ582074.1) y *Lonchaea corea* (KR660353.1) a través de la herramienta BLAST (Altschul, 2005) del Genbank, usando el algoritmo MegaBLAST en principio, para evaluar la brecha e identidad entre las secuencias. Se obtuvieron identidades por encima del 87 % y brechas menores a 2/651.

Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple utilizando el método de unión de vecinos simple a través del programa MEGA X. Para las 40 secuencias se obtuvieron 27 haplotipos (ver Tabla 2), donde todas las hembras sin identificar se agruparon en M-OTUs que incluían con machos previamente identificados por morfología y molecular.

Los haplotipos asignados a especímenes previamente identificados por métodos morfológicos y corroborados por el experto fueron comparados con los haplotipos de hembras y machos sin determinar, para hallar la correspondencia entre los mismos. Para los 22 especímenes identificados correspondientes a 7 especies, se encontraron 17 haplotipos. En las 14 secuencias obtenidas a partir de las 14 hembras se encontraron 9

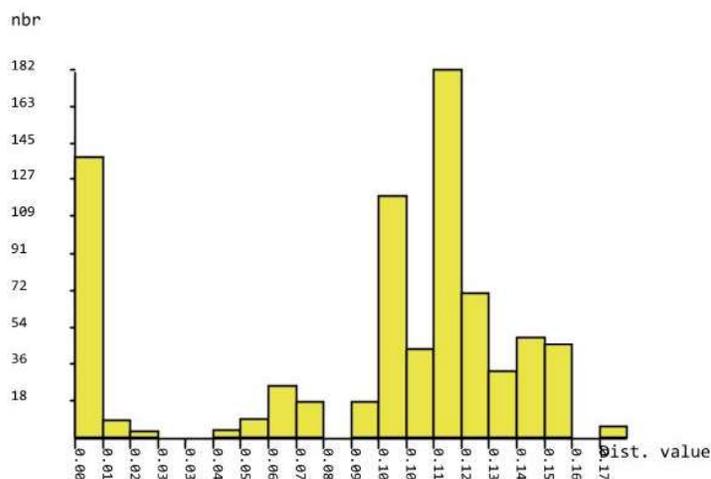


Figura 2: Distribución de frecuencias de divergencia genética intraespecífica e interespecífica de especímenes del género *Lonchaea* de Antioquia. Fuente: Elaboración propia.

haplotipos que correspondían a cuatro de las especies identificadas por morfología.

La divergencia medida como distancia genética para los individuos previamente identificados por morfología como de una misma especie estuvo entre 0 y 2% con dos excepciones, *L. aculeata* 70-1 que varió entre 0 y 5.4% y *L. aculeata* 23-1 con una variación entre 0 y 6.5%. Para las secuencias de *L. cristula* la divergencia osciló entre 0 – 0.5% siendo la especie con menor tasa de divergencia entre sus individuos con 9 individuos analizados con identificación previa por morfología. *L. curiosa* presentó una divergencia entre 0.3% y 0.5% para tres individuos analizados, *L. longicornis* presentó distancias que fluctuaron entre 0% y 0.8%, *L. striatifrons* presentó una divergencia de 0% entre sus dos individuos. Para *L. aculeata* la variación estuvo entre 2.2% y 6.5% siendo esta especie la de mayor divergencia y la que presenta valores que se solapan con la menor distancia entre especies.

Las divergencias medidas como distancias genéticas entre especies para las secuencias obtenidas de 22 individuos con igual número de secuencias y separados por morfología en 7 especies, estuvieron entre 6.1% (*L. cristula* - *L. striatifrons*) y 16.9% (*L. cristula* - *L. longicornis*). Así, usando las 22 secuencias que representan 7 especies, se comprobó la presencia de un “gap de código de barras” (ver Figura 2), con una separación intraespecífica entre 0.0 - 5.1%, y una variabilidad interespecífica entre 6.1%-16.9%. Las distancias obtenidas son congruentes comparándolas con las de grupos cercanos como Tephritidae; donde variaron entre de 0 a 10.3% intraespecie y entre 0% y 16.3% entre especies (Kunprom & Pramual, 2019).

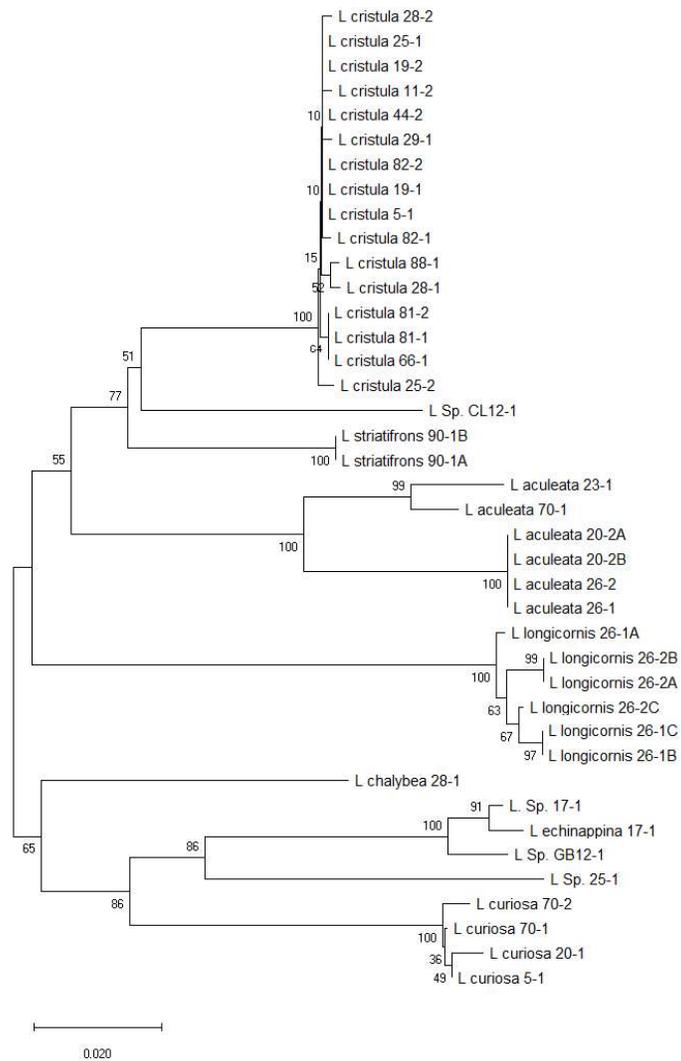


Figura 3: Dendrograma de NJ con el modelo K2P y bootstrapp de 10000 réplicas para las 40 secuencias obtenidas. Machos: 1, Hembras: 2. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3: Distribución de los M-OTUs obtenidos a través de ABGD (Results of the Automatic Barcode Gap Discovery)

M-OTUS	# de individuos	Composición
1	16	MZ189751, MZ189759, MZ189760, MZ189761, MZ189763, MZ189764, MZ189762, MZ189771, MZ189770, MZ189769, MZ189767, MZ189768, MZ189766, MZ189765, MZ189772, MZ189773
2	2	MZ189744 y MZ189743
3	3	MZ189756, MZ189756 y MZ189745
4	1	<i>Lonchaea</i> _sp._CL12-1
5	1	<i>Lonchaea</i> _sp._25-1
6	6	MZ189748, MZ189750, MZ189755, MZ189757, MZ189749, MZ189747
7	4	MZ189754, MZ189758, MZ189752 y MZ189753
8	4	MZ189777, MZ189776, MZ189775 y MZ189778
9	1	MZ189774
10	2	<i>L.</i> _aculeata_23-1 <i>L.</i> _aculeata_70-1

3.1. Asignación de identidad de las hembras y morfotipos sin asignación por morfología

3.1.1. Análisis NJ de las secuencias para el género *Lonchaea* con material propio

El análisis de NJ (Figura 3) confirmó la identidad de las 14 secuencias obtenidas de especímenes hembra al ubicarlas en los M-OTUs correspondientes con base en sus haplotipos. También aparecen separadas cada una de las especies asignadas por morfología con M-OTUs con soporte bootstrap del 100%. Las unidades donde se incluyen especímenes para cada especie, recogen los especímenes provenientes de las diferentes localidades de las cuales estos provenían, cuyas distancias geográficas máximas fueron 200 km. Dado que el análisis separa las secuencias de *L. aculeata* en dos M-OTUs, después de verificar las variaciones encontradas en morfología y los caracteres con que fue descrita inicialmente la especie, se infiere que, en efecto, las secuencias 70-1 y 23-1 pueden pertenecer a otra especie o que puede existir un complejo de especies, lo cual merece ser estudiado con mayor detalle.

3.1.2. Especies hipotéticas basadas en el Barcoding-gap

El análisis a través del programa ABGD separó las 40 secuencias propias en 10 grupos o M-OTUs (Ver Tabla 3, Figura 2), entendiendo éstas como agregaciones de secuencias unidas por algún índice de similitud (normalmente un corte de distancia predefinido) denotando que corresponden a una entidad biológica.

El número de grupos o M-OTUs, que equivale a las especies hipotéticas para este caso, no varió en la partición inicial realizada bajo los tres modelos (simple, JC y K2P), sugiriendo la existencia de 10 agrupaciones. Variando el porcentaje de divergencia hasta 5, el número M-OTUs no varía, solamente una de las secuencias se mueve a otro grupo. Los resultados sugieren la existencia de 10 M-OTUs para todas las particiones con el modelo simple y de 10 con los modelos de JC Y K2P excepto cuando el porcentaje de divergencia es igual a 1 lo cual es poco probable entre especies de Diptera, donde p aumenta a 18. (Tabla 4). Bajo el modelo de sustitución K2P se identificaron 8 potenciales “gaps” del código de barras. El total de secuencias se agrupó separando las especies que morfológicamente corresponden a una misma. Las 14 secuencias de hembras sin una determinación a nivel de especie por morfología quedaron separadas en 4 de

Tabla 4: Resultados del análisis ABGD (Results of the Automatic Barcode Gap Discovery)

Modelo de Sustitución	X	Partición	Divergencia intraespecífica							
			0.001000	0.001668	0.002783	0.004642	0.007743	0.012915	0.021544	0.035938
simple	1.0	Inicial	10	10	10	10	10	10	10	10
		Recursiva	10	10	10	10	10	10	10	10
JC	1.0	Inicial	18	10	10	10	10	10	10	10
		Recursiva	18	10	10	10	10	10	10	10
K2P	1.0	Inicial	10	10	10	10	10	10	10	10
		Recursiva	18	10	10	10	10	10	10	10

Especie	Genitalia del macho	Haplotipos
<i>Lonchaea aculeata</i> (Bezi, 1910)		MZ189777 MZ189775
<i>Lonchaea chalybea</i> Wiedemann (1830)		MZ189774
<i>Lonchaea cristula</i> (McAlpine, 1964)		MZ189751 MZ189760 MZ189763 MZ189762 MZ189770 MZ189767 MZ189766 MZ189772
<i>Lonchaea curiose</i> (McAlpine, 1964)		MZ189754 MZ189752
<i>Lonchaea echinappina</i> (McAlpine, 1964)		MZ189756 MZ189745
<i>Lonchaea longicornis</i> Williston, 1896		MZ189746 MZ189755 MZ189749
<i>Lonchaea striatifrons</i> Malloch (1920)		MZ189744

Figura 4: Especies para las cuales se asignaron los haplotipos e información como herramienta para la identificación Fuente: Elaboración propia.

los 10 M-OTUs correspondientes a las especies *L. cristula* (6), *L. curiosa* (2), *L. longicornis*(3) y *L. aculeata* (3). Las siete especies encontradas por morfología incluyeron todos los machos analizados excepto *L. aculeata*, que como se analizó en las distancias intraespecíficas contenía dos individuos con una divergencia por encima del 5 % y que posiblemente pertenecen a una especie críptica o morfológicamente similar. Para las siete especies se provee una herramienta integrativa que permite asociar la identidad de organismos del género *Lonchaea* sin importar el sexo (ver Figura 4). Usando 40 secuencias de las especies encontradas y 26 secuencias de 11 especies de la región paleártica y neártica extraídas del Bold System, las secuencias utilizadas con origen en las bases de datos fueron sometidas a un proceso de depuración con el fin de identificar si cumplían con todos los criterios que garantizaran que su determinación taxonómica fue correcta por lo cual se trabajó con secuencias de 11 de las 24 reportadas en BOLD. Se obtuvo el dendograma correspondiente (Ver Figura 5); el cual exhibe una bifurcación inicial donde una rama contiene a la mayoría de especies tropicales y la otra rama incluye especies de la región paleártica y neártica como también algunas especies tropicales. En el M-OTU de las especies árticas se alinearon *L. curiosa*, *L. echinappinay* *L. chalybea*, estando esta última más cercana a las especies del grupo de especies tropicales. Lo anterior también corrobora lo encontrado por morfología donde se observa una gran similitud entre las especies *L. cristula*, *L. striatifrons*, *L. longicornisy* *L. aculeata*, que además son las especies de mayor ocurrencia en Colombia. Las especies encontradas no cuentan con secuencias en las bases de datos, por lo que el presente estudio se muestra como un aporte importante a la taxonomía del grupo Cuando se incluyeron las secuencias de BOLD al análisis por NJ se observaron datos interesantes, por ejemplo, existe una clara separación entre las especies tropicales y las de origen neártico y paleártico (distancias intraespecíficas vs distancias entre especies de 0.0 - 2.0 % y 6.1 - 16.9% para las secuencias propias, 0 - 0.8 % y 6.4 - 15 % respectivamente, para las secuencias de BOLD cuando se analizan de forma independiente), evidenciando que el origen geográfico ha modificado las características de las especies del género, lo anterior también se soporta en los datos de distancias para todos los individuos analizados en conjunto.

En las bases de datos por ejemplo BOLD se cuenta con un gran número de registros, sin embargo, el número de especies del género *Lonchaea* solo asciende a 24 de las 218 reportadas a nivel mundial; los valores de distancias encontrados en el presente estudio coinciden con los estimados para las demás secuencias disponibles en las bases de datos. El 88 % de las secuencias encontradas en las bases de datos tienen como origen Centro de Genómica de la Biodiversidad de Canadá (ver Figura 6) por lo que el presente estudio aportaría un mayor número de secuencias que los demás depositarios de muestras reportados, además de ser las primeras secuencias reportadas para toda la región tropical incluyendo Latinoamérica y el trópico africano. En cuanto a secuencias reportadas por países el estudio coloca a Colombia dentro del mapa como el segundo país con mayor número de secuencias de este grupo después de Canadá y por encima de Estados Unidos, donde por tecnología y capacidad económica se debería tener un mayor número de registros.



Figura 6: Depositorios de secuencias de muestras del género *Lonchaea* en el mundo. Fuente: Elaboración propia.

4. CONCLUSIONES

A través del uso de la metodología del código de barras se logró conferir la secuencia correspondiente a 36 individuos distribuidos en 7 especies del género *Lonchaea*. Todas las secuencias obtenidas pertenecen a especies que no contaban con datos en las bases de datos. Esto contribuye a ampliar la librería genética de esta secuencia para este grupo de insectos y evaluar la consistencia de esta región como marcador como herramienta para la identificación de especies. Además, se asignaron las secuencias de 14 hembras sin identidad a nivel específico a M-OTUs con especies identificadas por morfología y corroboradas por expertos, además se logró determinar la presencia de tres morfotipos pertenecientes al género *Lonchaea* a los cuales no se logró asignar a ninguna especie por morfología ni por molecular. Un mayor estudio de este grupo en las diferentes regiones mejorará la capacidad de crear un sistema de identificación basado en códigos de barras en *Lonchaea* y, en consecuencia, facilitará futuros estudios relacionados con la biología de estos insectos que en la actualidad es desconocida en muchos aspectos.

Referencias

- Altschul, S. F. (2005). BLAST Algorithm. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-4. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005253>.
- Avise, J. C. (2000). Cladists in Wonderland. *Evolution*, 54(5), 1828-1832. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00728.x>.
- Chacón, P. (1984). Entomofauna asociada a *Passiflora mollissima*, *P. edulis*, *P. flavicarpa* y *P. quadrangularis* en el departamento del Valle del Cauca. *Turrialba*, 34, 297-311.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792 - 1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap Author (s): Joseph Felsenstein Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2408678>. *Evolution*, 39(4), 783-791.

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Marine Biol Biotechnol.* 3(5), 294-299.
- Hébert, P. D. N., Ratnasingham, S. & DeWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>.
- ICA (2011). Resoluciones fitosanitarias. Recuperado el 30 de noviembre de 2011. En <http://www.ica.gov.co/Normatividad/Normas-Ica/Resoluciones.aspx>.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolución de moléculas de proteínas. En Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, 21-132, Academic Press, Nueva York.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Korytkowski, C. A. & Ojeda, D. (1971). Revisión de las especies de la familia Lonchaeidae En El Perú (Diptera: Acalypratae). *Revista Peruana de Entomología*, 14(1), 87-116. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Kunprom, C. & Pramual, P. (2019). DNA barcoding of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand: Ambiguity, misidentification and cryptic diversity. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 30(8), 861-873. <https://doi.org/10.1080/24701394.2019.1693550>.
- Lanteri, A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 66, 15-25.
- Luna, G. I. (1987). Clave taxonómica para la identificación del género *Lonchaea* Fallen en la región neotropical (Lonchaeidae: Diptera). Universidad de Panamá.
- MacGowan, I. & Rotheray, G. E. (2019). Lonchaeidae. En *Manual of Afrotropical Diptera*. 3, 1383-1392.
- Medina, J. & Takumasa, K. (2012). Listado taxonómico de organismos que afectan la pitaya amarilla, *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Moran (Cactaceae) en Colombia. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G. & Ng, P. K. L. (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55(5), 715-728. <https://doi.org/10.1080/10635150600969864>.

- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol*, 21, 1864-1877 Pennington J, Wells M. The adult Midgut Structure and Function. En: *Biology of disease vectors*. 2005. 2da. Ed. Marquardt Pp. 785.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: Análisis de polimorfismo de secuencia de ADN de grandes conjuntos de datos. *Mol. Biol. Evol.* 34, 3299-3302. DOI: 10.1093 / molbev / msx248
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F. & Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13486-13491. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803076105>