

REVISTA COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA

Volumen 37 • Número 2 • Julio - Diciembre 2011

Tarifa Postal Reducida No. 476 - Vence Dic. 31 / 2011



CONTENIDO

Sección Agrícola / Agriculture

- ARN interferente: Potenciales usos en genómica funcional y control genético de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae)
Carolina Aguilera G., Beatriz E. Padilla H., Claudia P. Flórez R., José D. Rubio G. y José R. Acuña Z. 167
- Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus obscurus* e *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)
Luis M. Constantino, Lucio Navarro, Alejandro Berrio, Flor E. Acevedo, David Rubio y Pablo Benavides 173
- Inhibidores de proteasas de plantas efectivos contra las aspártico proteasas de *Hypothenemus hampei*
Diana Molina V., Alejandro Blanco-Labra y Humberto Zamora E. 183
- Actividad insecticida y fijadora de nitrógeno de la bacteria transformada *Paenibacillus polymyxa* que expresa Cry1C
Amal Ibrahim Hussien, Nahed Ibrahim Abd El-Ghaffar, Adel El-Sayed Hatem, Hani K. Aldebis y Enrique Vargas-Osuna 192

Continúa en la contraportada

Publicación oficial de la Sociedad Colombiana de Entomología

REVISTA COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA

Volumen 37 No. 2 Julio - Diciembre 2011

Publicación oficial de la Sociedad Colombiana de Entomología

JUNTA DIRECTIVA SOCOLEN 2010 - 2012

PRESIDENTE
Eduardo Flórez

VICEPRESIDENTE
Nancy Barreto

SECRETARIO
Alcibiades Suárez A.

TESORERO
Alexander Sabogal

VOCALES PRINCIPALES
Patricia Pinzón, Emilio Realpe
Ginna Camacho

VOCALES SUPLENTEs
Alejandro Lopera, Diana Rueda
Cecilia Cantor V.

COORDINADORA DE BIBLIOTECA
Cecilia Cantor V.

COORDINADORA PÁGINA WEB
Diana Rueda

REVISOR FISCAL DE SOCOLEN
Martha Herrera

Editor general

Carlos E. Sarmiento M., Ph. D.
Instituto de Ciencias Naturales
Universidad Nacional de Colombia

Editor asistente
María Teresa Jiménez, M. Sc.

Comité editorial
Alex E. Bustillo P., Ph. D.
Centro Nacional de Investigaciones de
Café “Pedro Uribe Mejía” (Cenicafé)

Daniel C. Peck, Ph. D.
Cornell University,
New York State Agrigultural Research Station,
Department of Entomology

César Cardona M., Ph. D.
Centro Internacional de Agricultura Tropical
(CIAT)

Ingeborg Zenner de Polanía, Ph. D.
Universidad de Ciencias Aplicadas
y Ambientales (UDCA)

Luko Hilje, Ph. D.
CATIE, Costa Rica

Sergio Orduz, Ph. D.
Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB),
Unidad de Biotecnología
y Control Biológico

Comité científico
Alejandra Bravo, Ph. D.
Universidad Nacional Autónoma de México,
Instituto de Biotecnología

Marta Wolff, Ph. D.
Universidad de Antioquia,
Instituto de Biología

Fernando E. Vega, Ph. D.
U. S. Department of Agriculture,
Agricultural Research Service,
Insect Biocontrol Laboratory, Maryland

Fernando Fernández, Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia,
Instituto de Ciencias Naturales

Daniel Rafael Miranda E., Ph. D.
Universidad Industrial de Santander

Amanda Varela, Ph. D.
Pontificia Universidad Javeriana,
Departamento de Biología

Fernando Montealegre Z., Ph. D.
University of Toronto, Canadá

Stephen L. Lapointe, Ph. D.
U. S. Department of Agriculture,
Agricultural Research Service,
Horticultural Research Laboratory, Florida

Martha Lucía Quiñones, Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia,
Facultad de Medicina

Jorge E. Peña, Ph. D.
University of Florida, IFAS,
Trop. Res. & Educ. Ctr., Homestead

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Ver más información en la página electrónica www.socolen.org.co

La Revista Colombiana de Entomología es el órgano oficial de divulgación científica de la Sociedad Colombiana de Entomología –SOCOLEN– y publica semestralmente artículos científicos, inéditos, basados en resultados de investigaciones en el campo de la entomología o afines. Según disponibilidad de espacio, la revista publica descripción de métodos, descripción de una especie, notas taxonómicas, notas cortas y reseñas de libros. La revista publica un trabajo de revisión por número. La aceptación de los trabajos para su publicación dependerá de la evaluación de pares académicos nacionales e internacionales. Los trabajos son recibidos y luego de verificación de normas, son enviados a al menos dos pares académicos quienes emitirán concepto del trabajo, este concepto será unificado y remitido al autor quien debe atender las recomendaciones en caso de aceptación y reenviar la versión corregida en el plazo establecido. No hay costo a los autores por publicación en la Revista. Por cada artículo publicado se entregará al autor en forma gratuita una copia en pdf.

Los artículos se reciben en versión electrónica a la dirección publicaciones@socolen.org.co bajo el título “artículo para Revista”. El envío electrónico del trabajo agiliza sensiblemente su evaluación por lo que se sugiere fuertemente. Envíe su trabajo en documento Word. Indique el tipo de documento para tablas y figuras. El autor puede sugerir hasta tres potenciales evaluadores. Todo trabajo recibirá un código que el autor deberá usar para correspondencia con la Revista.

Los manuscritos se deben acoger a las normas indicadas en las instrucciones. Una versión detallada de éstas se encuentra en la página electrónica de la Sociedad www.socolen.org.co. Se invita a revisar este documento. Se recomienda además revisar un número reciente de la revista para identificar su estilo. Trabajos que no sigan estas normas, serán devueltos independientemente de su calidad académica.

El manuscrito se debe escribir en tamaño carta, con márgenes de 2.5 cm en todos los lados, páginas numeradas en la parte superior derecha y escrito a espacio y medio en letra tipo “Times New Roman” 11 puntos. Justificación a la derecha. El trabajo puede tener una extensión máxima de 25 páginas, incluidas figuras, tablas y bibliografía. El lenguaje debe ser corto y preciso, use voz pasiva. Las tablas y figuras deben ir en páginas separadas al final del documento, deben ser de alta calidad y aportar información valiosa para el artículo; omite tablas o figuras si esta información puede aparecer fluidamente en el texto.

En caso de que un trabajo remitido en papel haya sido aceptado para su publicación, se solicitará el correspondiente disquete con la versión final. El trabajo debe ir en formato Word, para las tablas y figuras emplee programas de amplio uso pues esto agiliza la edición. En el disquete se deben indicar los programas de computador empleados.

Estructura del artículo

Ni los trabajos de revisión ni las notas científicas llevan la estructura de la sección capítulos de los artículos de investigación. Antes de enviar trabajos de revisión consulte al editor.

Título: No debe exceder 15 palabras. Deben incluirse una traducción fiel al inglés y un título breve para los encabezados de página. Debe señalar el orden y la familia de las especies entomológicas y de los grupos supragenéricos mayores estudiados.

Autores: Deben escribir los nombres completos. En pie de página indicar: título académico mayor, institución a la cual pertenece, dirección postal y dirección electrónica.

Resumen: Debe ser conciso con información sobre: justificación, objetivos, metodología y resultados completos de la investigación. Además, debe indicar los límites, validez e implicaciones de los resultados. No debe exceder las 250 palabras. Debe ir en un solo párrafo y no incluir citas bibliográficas, figuras, ni tablas.

Abstract: Debe ser una traducción fiel al inglés del resumen respetando la gramática del lenguaje. Antes de enviar el trabajo a la Revista solicitar la revisión de esta sección a una persona cuya lengua nativa sea el inglés o con pleno dominio del idioma.

Palabras clave: Se deben listar hasta cinco palabras separadas por punto, diferentes de las incluidas en el título, que indiquen temas críticos tratados en el trabajo. Al final del abstract se deben incluir las “key words” que son traducción al inglés de las palabras clave.

Capítulos: Cada artículo debe constar de los siguientes capítulos: Introducción; Materiales y Métodos; Resultados y Discusión (la Discusión puede ir como capítulo aparte); Conclusiones; Agradecimientos y Literatura citada. Si es necesario se pueden incluir subtítulos dentro de los capítulos principales. Use el sistema métrico decimal.

Tablas: Deben estar citadas en el texto. Disponer en páginas separadas. El título debe ir en la parte superior de la tabla y como nota de pie de página deben ir las claves explicativas.

Figuras: Deben estar citadas en el texto. Fotografías, dibujos, gráficos y mapas deben presentarse en páginas separadas con su correspondiente leyenda en la parte inferior. Deben ser de alta definición. Figuras impresas deben venir muy bien elaboradas en tinta china y en papel pergamino. Las fotografías se aceptarán en blanco y negro y en papel brillante. Envíe los documentos impresos sólo cuando se acepte su trabajo. Si las figuras van en formato digital, envíelas como documentos TIFF de 300 dpi (presentes en la mayoría de programas editores gráficos). Prefiera enviar sus figuras con los siguientes anchos (90 mm ó 160 mm). Cuando tenga varias fotos o dibujos prefiera disponerlos en mosaico y numérelas con ordinales (1a, 1b, etc.) Ilustraciones no originales deben venir acompañadas de su crédito respectivo y deben enviar certificación de permiso para su uso. Se publicarán figuras a color si los autores cubren el costo adicional.

Cita de especies: Nombres científicos de genero y especie van en cursiva y siguiendo las normas de los códigos internacionales de nomenclatura. La primera vez que cite una especie en el cuerpo principal del trabajo, adicione el descriptor y el año (p. ej.: *Apis mellifera* L., 1752). No adicione esta información en título, resumen o abstract.

Citas bibliográficas: Revise un número reciente o las instrucciones en la pagina web de la Sociedad para ver estilo (www.socolen.org), aquí se presentan ejemplos para distintas situaciones:

Bustillo (1998), (Gutiérrez 1999), (Bustillo y Rodríguez 1999), (Ramírez et al. 1999), (Bueno 1998, 1999), (Portilla 1998a, 1998b), (Ramírez 1999; Rodríguez 1998; Gutiérrez 1987) para citación múltiple en orden descendiente, (Parra, en prensa), (P. Reyes, com. pers.).

Literatura citada: Revise un número reciente o las instrucciones en la pagina web de la Sociedad para ver estilo (www.socolen.org), aquí se presentan ejemplos para distintas situaciones:

POSADA F., F. J. 1992. Ciclo de vida, consumo foliar y daño en fruto de melón por *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). Revista Colombiana de Entomología 18 (1): 26-31.

VALLEJO, L. F.; ORDUZ, S. 1996. Producción de un plaguicida a base de *Bacillus thuringiensis*, en laboratorio. Revista Colombiana de Entomología 22 (1): 61-67.

PENNAK, R. W. 1978. Fresh-water invertebrates of the United States. John Wiley, New York. 767p.

SAMUELSON, A.; EVENHUIS, N.; NISHIDA, G. 2001. Insect and spider collections of the world web site. <http://www.bishopmuseum.org/bishop/ento/codens-r-us.html>. Fecha última revisión: 27 marzo 2001. Fecha último acceso: [14 abril 2001]

La Revista Colombiana de Entomología agradece a los doctores listados abajo por su contribución como evaluadores de los trabajos sometidos a publicación durante nuestro volumen 37 de 2011. Su desinteresado apoyo ha sido fundamental para mantener y mejorar nuestros estándares de calidad.

Adalton Raga, Adenir Vieira Teodoro, Adriana Najar, Alcira Tania Bijovsky de Katzin, Alejandro Tovar Soto, Alexandre de Sene Pinto, Alexandre P. Aguiar, Allen F. Sanborn, Alvarenga Soares, Ana Lucía Henriques de Oliveira, Angelina María Marcomini, Aristeo Cuauhtémoc Deloya L., Armando Equihua Martínez, Astrid de Matos Peixoto Kleinert, Atilano Contreras Ramos, Aurelio Carnero Hernández, Bernardo Chaves C., Blanche Christine Pires de Bitner-Mathé Leal, Boris A. Castro, Brailovsky, Harry, Bruno Michel, Candelario Vázquez Cruz, Carlos Brisola Marcondes, Carlos Molineri, Carlos Roberto Ferreira Brandão, Cesar Augusto Marchioro, Claudio Gilberto Froehlich, Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca, Cristiano Lopes Andrade, Daniel Ricardo Sosa-Gómez, Danielle Thomazoni, Danon Cledes Cardoso, David E. Baumgardner, Dellapé, Pablo Matias, Deodoro Camargo Silva Gonçalves de Oliveira, Edilson Caron, Edward Pfeiler, Elinor M. Lichtenberg, Elizabeth Ferreira Rangel, Elizabeth Franklin Chilson, Elsa Evelia Nieves Blanco, Esther Cecilia Montoya, Fabiana Gallardo, Fabio Akashi, Fernando Fernandez, Fernando Sergio Zucoloto, Frederico F. Salles, Germán Horacio Cheli, Gilberto Jose de Moraes, Gloria Giraldo-Calderon, Guillermo León Rúa Uribe, Gustavo Hormiga, Harold Francis Greeney, Hernando Cortina Guerrero, Hugh Rowell, Humberto Fonseca Mendes, Clara Sordi Joachim Bravo, Ivan Carlos Fernandes Martins, J. Concepcion Rodriguez Maciel, J. L. Navarrete-Heredia, James K. Wetterer, Jaqueline Figueiredo Rosa, Jazzmin Arrivillaga, Jeffrey J. Stuart, Jesús Selfa, Jesús Romero Nâpoles, John R. Wallace, Jorge Enrique Llorente Bousquets, Jorge Ernesto Valenzuela González, Jorge González, José Antonio Corronca, José L. Fernández Triana, José Luis Rosas Acevedo, Jose Luis Torres-Estrada, José Pablo Liedo Fernández, José Roberto Postali Parra, José Schoederer, Juan Rull Gabayet, Julianne Milléo, Julieta B. Posadas, Julio César Rojas León, Karen L. Conniff, Katja Poveda, Kenneth Christiansen, Klaus Jaffe, Laura Delia Ortega Arenas, Leon G Higley, Liliانا Pardo Lopez, Lionel A. Stange, Luciano de Azevedo Moura, Luis Fernando Ospina Giraldo, Luis Francisco Angeli Alves, Luis Manuel Cervantes Peredo, Luke M. Jacobus, M. Alejandra Perotti, Madelaine Venzon, Malva Isabel Medina Hernández, Manuel Martinez, Marcio Uehara Prado, Marco A.A. Carneiro, Marcos Gonçalves Lhano, María Angélica Santana, Maria del Carmen Marquetti Fernández, María Milagro Coca Abia, Maribet Gamboa, Marilda Cortopassi Laurino, Mario Elgueta, Marta Wolff E., Martha lucia Quiñones Pinzon, Mauro Ramalho, Maxi Polihronakis, Miguel Angel Moron Ríos, Miguel Monné Freire, Murray B. Isman, Natalia von Ellenrieder, Netzahualcoyotl Mayek Pérez, Ninfá María Rosas García, Norma Binti Che Yusoff, Octavio Nakano, Onody, Helena Carolina, Pablo Daniel Ghiringhelli, Pablo Matias Dellapé, Panagiotis G. Milonas, Panomir Ivanov Tzenov, Patricia Rojas Fernández, Patricia Thyssen, Patricia Tamez Guerra, Pereira, A. E., Peterson Rodrigo Demite, Ramón Eduardo Rebolledo Ranz, Raquel Elvira Ocazionez, Rey Olivier, Ricardo Adaine da Silva, Ricardo Antonio Polanczyk, Ricardo Ceballos, Ricardo Ildefonso de Campos, Ricardo Sousa Cavalcanti, Richard A Humber, Roberto Barrera, Roger Fuester, Ronnie Von dos Santos Veloso, Rosa Murillo, S. Patricia Stock, Sergio Orduz P., Sergio Ovrusky, Sofia G. Seabra, Stephen L. Lapointe, Steve Naranjo, Steven Edgington, Susana L. Paradel, Tania Olivares, Teresinha Augusta Giustolin, Thomas Chouvenec, Tiago Maurício Francoey, Tomislav Curkovic, Toomas Tammaru, Ulysses Rodrigues Vianna, Valéria C. Maia, Vanessa Andalo Mendes de Carvalho, Victor M. Salceda, Volovnik S. V., Weliton Dias da Silva, Wesley Augusto Conde Godoy, Xavier Belles.

La Revista Colombiana de Entomología forma parte del Índice Nacional de Publicaciones Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas de Colciencias (Categoría A1) y aparece reseñada en: Scielo, ISI web of knowledge, SCOPUS, EBSCO, Zoological record, Ecology abstracts, Entomology abstracts, BioOne, Biology digest, Chemical abstracts, Aquatic Sciences and Fisheries abstracts (ASFA-1), Biological and living resources, Academic One file, Informe Académico, TEEAL, Biological Abstracts, Ulrich's, CAB Internacional y en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas (Latindex). La revista aparece semestralmente y tiene como misión publicar información científica de primera calidad producto de investigaciones en insectos y grupos relacionados. La revista se dirige primordialmente a investigadores y profesionales en entomología de universidades y centros de investigación públicos y privados. La aceptación de

los trabajos para su publicación dependerá de la evaluación de pares académicos nacionales e internacionales. SOCOLEN no se responsabiliza de las ideas emitidas por los autores. Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir los artículos o los resúmenes, sin la previa autorización escrita del editor. La persona interesada en poseer una copia de un artículo puede solicitarlo al autor cuya dirección aparece en el pie de página del mismo.

Foto portada:

Título: Araña
Autor: Edison Torrado

Sociedad Colombiana de Entomología
A. A. 11366 Bogotá, D. C.
Telefax 3472320
<http://www.socolen.org.co>
Se acepta canje (Ask for exchange)
publicaciones@socolen.org.co
Tarifa postal reducida para libros y revistas No. 476 de 4-72
Vence Dic. 31/2011

Licencia Mingobierno
002274/81

Edición digital e impresión
ARFO Editores e Impresores Ltda.
Teléfono 2175794

Tiraje 500 ejemplares

472

LA RED POSTAL DE COLOMBIA

www.4-72.com.co

472

LA RED POSTAL DE COLOMBIA

► Línea de Atención al Cliente Nacional 01 8000 111210 ◀

ARN interferente: Potenciales usos en genómica funcional y control genético de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae)

RNA interference: potential uses on functional genomics and genetic control of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae)

CAROLINA AGUILERA G.¹, BEATRIZ E. PADILLA H.², CLAUDIA P. FLÓREZ R.³,
JOSÉ D. RUBIO G.⁴ y JOSÉ R. ACUÑA Z.⁵

Resumen: Los organismos eucarióticos, incluidos los insectos, poseen un mecanismo para el silenciamiento de genes específicos mediante pequeñas secuencias de ARN de doble cadena (ARNdc), proceso conocido como ARN de interferencia (ARNi). El objetivo de esta investigación fue implementar esta herramienta para evaluar genes candidatos que puedan usarse como estrategia genética de control de la broca del café. Se utilizó una metodología de ingesta de gotas con diferentes ARNdc y diferentes concentraciones depositadas en la cavidad preoral de larvas de primer instar de la broca. Luego, las larvas se criaron en una dieta artificial suplementada con los respectivos ARNdc. Previamente, se comprobó la efectividad de la ingesta por vía oral mediante dos estrategias de control: a) ingesta de un compuesto fluorescente (Calcofluor®) en el tracto digestivo del insecto y b) ingesta de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas. Los genes seleccionados para el silenciamiento fueron los que codifican en la broca las proteínas mananasa, xilanasa, citocromo P450 mono-oxigenasa (2 genes), ATPasa D, α -tubulina y actina. Se encontró que los ARNdc de los citocromos P450 produjeron el mayor efecto causando una mortalidad de las larvas de un 64% y 52% respectivamente, seguido de los ARNdc de los genes mananasa y xilanasa, con un porcentaje de mortalidad de 37% y 33%, respectivamente, para la máxima concentración evaluada.

Palabras clave: ARNi. Mananasa. Xilanasa. Citocromos P450.

Abstract: Eukaryotic organisms, including insects, have a mechanism for specific gene silencing by short sequences of double-stranded RNA (dsRNA), such a process is known as RNA interference (RNAi). The objective of this research was to follow up this technique to screen candidate genes for the genetic control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. A methodology of feeding by oral drops containing different dsRNAs and dsRNAs' dosages that were placed in the preoral cavity of first instar larvae was used. Then, the larvae were reared on an artificial diet supplemented with the respective dsRNA. Previously, we verified the effectiveness of the dsRNA feeding using two control strategies: a) intake of a fluorescent compound (Calcofluor™) and b) intake of a commercial mixture of protease inhibitors. The genes coding for mannanase, xylanase, cytochrome P450 mono-oxygenase (two genes), ATPase D, α -tubulin and actin, expressed in the coffee berry borer, were selected for silencing. We found that dsRNA of cytochromes P450 produced the greatest effect, causing larval mortality of 64% and 52% respectively, followed by dsRNA of mannanase and xylanase, with a mortality rate of 37% and 33%, respectively, for the highest concentration tested.

Key words: RNAi. Mannanase. Xylanase. Cytochromes P450.

Introducción

El café (*Coffea arabica* L.) es el producto agrícola más importante en Colombia. Más de 500.000 familias lo cultivan en alrededor de 869.000 hectáreas y sus ingresos provienen de la venta de la semilla (Chaves y Riley 2001). Los aspectos sanitarios del cultivo son una de las principales preocupaciones de los caficultores para garantizar una buena productividad, una excelente calidad y asegurar sus ingresos.

La Broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867 (Coleoptera, Scolytidae) es el insecto más perjudicial para las plantaciones de café a nivel mundial. Es un insecto que apareció en Colombia en el año de 1988 y desde entonces su control ha sido un difícil reto debido a su hábito de permanecer oculto dentro de los frutos de café, en donde logra ali-

mentarse y reproducirse causando daños en cuanto al peso de la semilla, la disminución de la calidad del café y finalmente la pérdida total del fruto (Baker 1999). Adicionalmente Colombia presenta condiciones favorables para la permanencia de la broca debido a la distribución variable de las floraciones y sus cosechas a lo largo del año, así como de la continuidad de la caficultura a lo largo de las tres cordilleras Central, Occidental y Oriental con altitudes comprendidas entre 1100 a 2000 m (Camayo y Arcila 1997).

No es recomendable el uso de insecticidas como medida de control de *H. hampei* por su impacto ambiental en el ecosistema cafetero (Bustillo 2008). Además el uso de insecticidas solo resulta eficiente cuando la broca está penetrando en el fruto y el producto está en contacto con el insecto, ya que una vez en el interior de la almendra, ningún insecticida

¹ Candidata M.Sc. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. CENICAFE. Disciplina de Mejoramiento Genético. Planalto, Km 4 vía antigua Chinchiná-Manizales. Caldas, Colombia. carolina.aguilera@cafedecolombia.com. ² Bacterióloga. CENICAFE. Disciplina de Mejoramiento Genético. Planalto, Km 4 vía antigua Chinchiná-Manizales. Caldas, Colombia. beatrizelena.padilla@cafedecolombia.com. ³ Ph.D. CENICAFE. Disciplina de Mejoramiento Genético. Planalto, Km 4 vía antigua Chinchiná-Manizales. Caldas, Colombia. claudia.florez@cafedecolombia.com. ⁴ M.Sc. Entomología. CENICAFE. Disciplina de Mejoramiento Genético. Planalto, Km 4 vía antigua Chinchiná-Manizales. Caldas, Colombia. josed.rubio@cafedecolombia.com. ⁵ Ph.D. CENICAFE. Disciplina de Mejoramiento Genético. Planalto, Km 4 vía antigua Chinchiná-Manizales. Caldas, Colombia. Ricardo.Acuna@cafedecolombia.com. Autor para correspondencia.

ofrece control satisfactorio (Villalba *et al.* 1995). Por estas razones y debido al gran impacto de este insecto sobre la caficultura colombiana, es necesario disponer de alternativas para el control de esta plaga y evitar daños para el ecosistema causados por el uso indiscriminado de los productos químicos (Cadena 1991). En el Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE), se ha implementado un manejo integrado de la broca (MIB), que incluye prácticas amigables con los agroecosistemas cafeteros tales como el control cultural, el control biológico y el seguimiento de las poblaciones a través de muestreos para ayudar en la toma de decisiones de control acertadas (Bustillo *et al.* 1998).

La broca es un insecto que se alimenta exclusivamente de la semilla madura del café, la cual está compuesta principalmente por carbohidratos (48-60%), proteínas (10%), lípidos (12%), ácidos orgánicos y cafeína (1%) (Wolfson *et al.* 1965; Clifford 1985). Los carbohidratos están en forma de galactomananos (25%), arabinogalactanos (17%) y celulosa (7%), (Fischer *et al.* 2001). En el genoma de la broca se identificó el gen de una endo-mananasa que se expresa en el intestino del insecto y permite la hidrólisis del galactomanano en moléculas simples de manosa. También se identificó el gen de una xilanasa encargada de la hidrólisis de compuestos estructurales de la pared celular. De igual forma se han identificado las secuencias de tres genes correspondientes a la familia de las citocromo P450 mono-oxigenasas involucradas en el metabolismo de compuestos xenobióticos presentes en el grano de café. Con base en estos resultados, es de interés conocer el efecto del silenciamiento de estos genes sobre el ciclo de vida de la broca, con el fin de identificar blancos moleculares que puedan ser utilizados en un futuro control genético de esta plaga del café.

La técnica de ARN de interferencia (ARNi) descrita por Fire *et al.* (1998) se ha convertido en una estrategia importante en los estudios de genómica funcional en insectos porque permite el silenciamiento post-transcripcional de genes en respuesta a la introducción de ARN de doble cadena (ARNdc) (Vanhecke y Janitz 2005). Esta herramienta, además de representar una alternativa tecnológica para estos estudios, también contribuye al desarrollo de estrategias altamente selectivas para el control de insectos (Zhou *et al.* 2008). Para ello, el insecto debe ser capaz de introducir autónomamente las moléculas de ARNdc por medio de alguno de estos mecanismos: i) a través de los ortólogos de la proteína transmembrana SID-1 previamente caracterizada en *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900 (Rhabditida, Rhabditidae), de la cual se sabe que interviene en el proceso de captura de ARNdc; ii) Por medio de una vía en donde la ATPasa H^+ vacuolar desempeña un papel importante (Huvenne y Smagghe 2010). Baum *et al.* (2007), evidenciaron el potencial uso de ARNi para el control de insectos en la protección de cultivos y reportaron la reducción en el daño causado por el gusano de la raíz del maíz *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, 1868 (Coleoptera, Chrysomelidae) sobre plantas de maíz modificadas genéticamente con ARNdc del gen ATPasa H^+ . Otros estudios que incluyen el suministro de ARNdc vía ingestión oral, indican que existe una amplia gama de organismos blanco de diferentes ordenes de insectos, varios genes candidatos y métodos de alimentación que demuestran la gran aplicación de ARNdc y el potencial de la técnica ARNi (Bautista *et al.* 2009).

En esta investigación se propone implementar una metodología de ingestión por vía oral de ARNdc que permita la

evaluación de genes candidatos que puedan utilizarse como estrategia genética de control de la broca del café.

Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en los laboratorios del Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE) de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, en la Sede de la vereda Planalto, Municipio de Chinchiná, Departamento de Caldas.

Material entomológico. La unidad de cría de parasitoides Biocafé suministró granos de café pergamino infestados con *H.hampei*. Estos granos de café se mantuvieron con una humedad del 45%, en condiciones de oscuridad, a temperatura promedio de 27°C y humedad relativa del 65-75%. Huevos de la broca extraídos de estos granos se colocaron en una dieta artificial descrita por Portilla (1999). Esta dieta se mantuvo en cajas multipozos donde los individuos inoculados completaron su ciclo hasta llegar a pupa. Este último estadio corresponde al estadio final de evaluación.

Comprobación de la ingestión de un compuesto fluorescente. Se tomaron 10 larvas en segundo instar (L2) y a cada una de ellas se le aplicó en la cavidad preoral una gota de 5 μ l de una solución de Calcofluor® al 0,5 %. Este fluorocromo se utilizó como control positivo y produjo una tinción fluorescente en el tracto digestivo del insecto al unirse a compuestos de celulosa y quitina presentes en la dieta. La comprobación de la ingestión se realizó mediante la disección de los tractos digestivos y la observación al estereomicroscopio de fluorescencia. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento utilizando una gota de agua destilada sin el compuesto fluorescente.

Ingestión de una mezcla de inhibidores de proteasas. La validación funcional del método de ingestión se realizó utilizando una mezcla de inhibidores de proteasas de amplio espectro (Completer™, Hoffmann-La Roche) incluidos en la dieta artificial y evaluados en tres concentraciones (0,13 mg/ml, 0,26 mg/ml y 0,53 mg/ml). La dieta se sirvió en cajas multipozos (2 ml de dieta/pozo) y se colocaron 20 huevos por cada pozo. Cada pozo se sirvió por duplicado y tres días después de la inoculación, cuando los huevos eclosionaron, se aplicó en la cavidad preoral de cada larva L1 una gota de 5 μ l de solución con los inhibidores de proteasas en las tres concentraciones. Como control se implementó el mismo procedimiento sin adicionar inhibidores de proteasas disueltos. Las larvas llegaron al estadio pupa 12 días después de iniciar el ensayo, momento en el que se evaluó la dieta de forma destructiva. Para esta evaluación se vació el contenido de dieta de cada pozo, se hizo un conteo de los individuos sobrevivientes al tratamiento y un registro de los estadios que habían alcanzado.

Síntesis de ARN de doble cadena. La síntesis de los ARNdc se realizó siguiendo las recomendaciones del sistema T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega, MA, USA). Se diseñaron 28 oligonucleótidos iniciadores para los genes en estudio, cuatro por cada gen, dos de los cuales contienen en sus extremos 5' una secuencia del promotor T7 para la unión de la enzima T7 ARN polimerasa que cataliza la síntesis de los ARN de doble cadena (Tabla 1). Las secuencias utilizadas para el diseño de los oligos se obtuvieron de los ADN com-

Tabla 1. Secuencia de nucleótidos de los oligos-iniciadores utilizados para la construcción de los ARN de interferencia correspondientes a siete genes de la broca del café *Hypothenemus hampei*.

GEN DE AMPLIFICACIÓN	Tamaño (pb)	SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDO INICIADOR
T7 Mananasa_FW	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTTCAGAACATTCTGTCCCTC
Mananasa_FW	20	TTCAGAACATTCTGTCCCTC
T7 Mananasa_RV	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCTTGAGGATATTGTCCGTA
Mananasa_RV	20	GCTTGAGGATATTGTCCGTA
T7 Xilanasa_FW	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGATACTTGCACCAGACC
Xilanasa_FW	20	GAGATACTTGCACCAGACC
T7 Xilanasa_RV	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGAATTGGAACCTCTTGTG
Xilanasa_RV	20	ATGAATTGGAACCTCTTGTG
T7 Citocromo1_FW	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATTGGAGAAATTGTGGTGTG
Citocromo1_FW	20	ATTGGAGAAATTGTGGTGTG
T7 Citocromo 1_RV	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTCCATTTCATCTCCACTCAT
Citocromo 1_RV	20	TTCCATTTCATCTCCACTCAT
T7 Citocromo2_FW	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGATCAGAATGTAGACCAA
Citocromo2_FW	20	GGGATCAGAATGTAGACCAA
T7 Citocromo2_RV	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCTGGATATGAACTTCTGC
Citocromo 2_RV	20	GCTGGATATGAACTTCTGC
T7 ATPaseD_FW	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAAACGTTAATGGG
ATPaseD_FW	20	GAGACAAAAACGTTAATGGG
T7 ATPaseD_RV	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAAGGACGTTTGTGAATGAAGC
ATPaseD_RV	20	AAGGACGTTTGTGAATGAAGC
T7 aTUB_FW	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCATCAAGACGAAACGTACT
ATUB_FW	20	CCATCAAGACGAAACGTACT
T7 aTUB_RV	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCCTCGTAATCTTTCTCCAAA
ATUB_RV	20	CCTCGTAATCTTTCTCCAAA
T7 Actina_FW	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAGTCAGTGATCAACCACCAC
Actina_FW	20	AGTCAGTGATCAACCACCAC
T7 Actina_RV	45	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTGTGAATGCCAGATCTTTT
Actina_RV	20	GTGTGAATGCCAGATCTTTT

plementarios (ADNc) de una librería de expresión construida previamente a partir del ARN mensajero (ARNm) de tractos digestivos de larvas en segundo instar de la broca. Se seleccionaron las secuencias de genes involucrados la digestión de los principales carbohidratos del grano de café (*mananasa*, *xilanasa* y *Citocromos-P450*) y en funciones constitutivas del metabolismo del insecto (*actina*, α -*tubulina* y *ATPase D*). Para el diseño de los iniciadores se empleó el programa Primer 3® (v. 0.4.0). Los fragmentos esperados para cada uno de los genes fueron: *mananasa* (304 pb), *xilanasa* (302 pb), *ATPase D* (308 pb), α -*tubulina* (300 pb), *actina* (300 pb) y dos *citocromos-P450* (301 pb y 309 pb, respectivamente). Inicialmente se realizó una amplificación a partir de ADN genómico de larvas L2, extraído con el sistema DNAeasy (Qiagen, MD;USA). Para la amplificación de los fragmentos se emplearon dos combinaciones de oligos iniciadores, la primera con el iniciador en sentido específico de cada gen y un iniciador antisentido conteniendo la cola del promotor T7. La segunda combinación con el oligo-iniciador conteniendo la cola del promotor T7 y el oligo antisentido específico de cada gen. Posteriormente se sintetizaron los ARNdc con la enzima T7 ARN polimerasa, contenida en el Kit, se removió la cadena de ADN y las cadenas sencillas de ARN y finalmente se

purificaron los ARNdc de acuerdo con las especificaciones del manual. La integridad y concentración del ARNdc se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa.

Bioensayos con ARN doble cadena en larvas de la broca.

Esta evaluación se realizó con base en la metodología establecida para la ingesta de los inhibidores de proteasas. Se preparó la dieta adicionando en cada pozo 30µg y 60µg de ARNdc respectivamente, para el silenciamiento de los genes de *mananasa*, *xilanasa*, *citocromos P450* y *ATPase D*, 60µg para el silenciamiento del gen *actina* y 5,5µg para el silenciamiento del gen α -*tubulina*. Debido a que no fue posible sintetizar grandes cantidades de ARNdc para este último gen, se evaluó en menor cantidad con respecto a los ARNdc de los otros genes. La dieta se sirvió en cajas multipozos (2ml de dieta/pozo). Se inoculó cada pozo con 20 huevos previamente extraídos de los granos de café. Cada evaluación se realizó por duplicado y transcurridos tres días después de la inoculación, cuando los huevos eclosionaron y llegaron a larvas L1, se aplicó en la cavidad preoral de cada larva una gota de agua destilada suplementada con cada uno de los ARNdc sintetizados. Como control del ensayo se utilizó el mismo procedimiento pero a las gotas no se les adicionó ARNdc. Las larvas

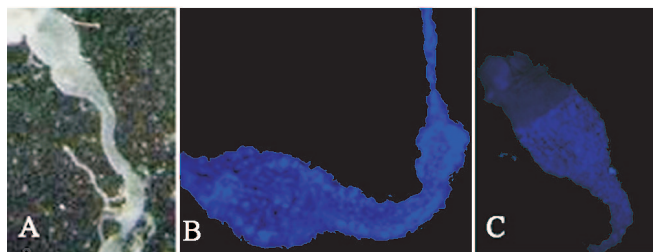


Figura 1. Análisis histológico de tractos digestivos de larvas L2 después de ingerir por vía oral gotas de una solución fluorescente. **A.** Observación al estereomicroscopio de luz visible del tracto digestivo de una Larva L2 sin tratamiento. **B.** Tracto digestivo de una larva L2 utilizando como tratamiento una gota de agua destilada suplementada con el fluorocromo "Calcofluor" (control positivo). **C.** Tracto digestivos de una larva L2 utilizando como tratamiento una gota de agua destilada sin compuesto fluorescente.

continuaron con su alimentación hasta convertirse en pupas, aproximadamente 12 días después de iniciar el ensayo. En este tiempo se evaluó la dieta de forma destructiva. Para esta evaluación se vació el contenido de dieta de cada pozo, se hizo un conteo de los individuos sobrevivientes al tratamiento y un registro de los estadios que habían alcanzado.

Análisis estadístico. Para establecer las diferencias entre tratamientos que incluyen ARNdc se realizó un análisis de varianza al 95% de confiabilidad. Para determinar el tratamiento de mayor efectividad con respecto al porcentaje de mortalidad del insecto se utilizó la prueba de comparación de medias de Duncan (5%). Estos procedimientos estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico SAS® versión 9.0 System Analysis Software. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.)

Resultados y Discusión

Implementación del método de ingestión. Los experimentos de control de la ingesta por vía oral utilizando compuestos marcadores (fluorescentes e inhibidores de proteasas) permitieron concluir que las gotas depositadas en la cavidad preoral de las larvas de la broca son ingeridas y pasan a lo largo de su tracto digestivo con lo que se valida este procedimiento para la evaluación de moléculas de ARNdc. El compuesto fluorescente Calcofluor se evidenció en los

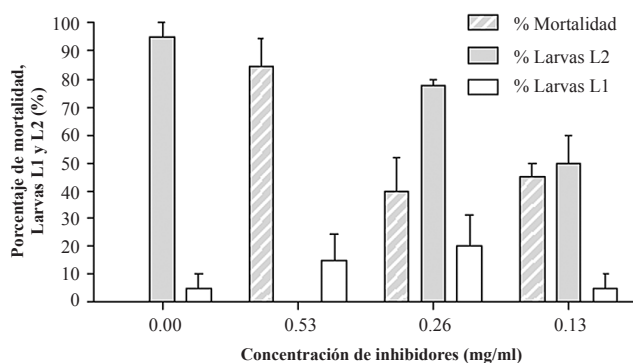


Figura 2. Efecto de la ingestión por vía oral de tres concentraciones de una solución de inhibidores de proteasas.

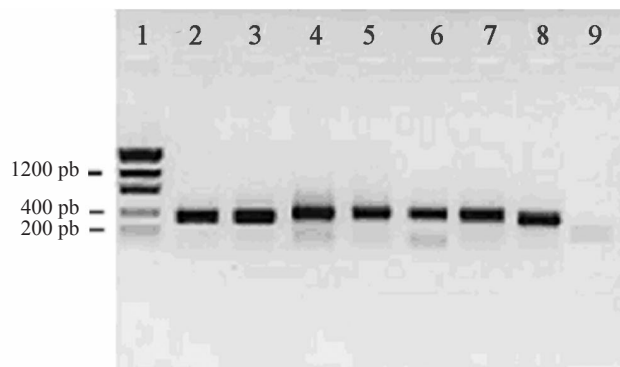


Figura 3. Productos de la síntesis de ARNdc. 1. Marcador de bajo peso molecular (Low mass ladder), 2. ARNdc del gen mananasa, 3. ARNdc del gen xilanasas, 4. ARNdc del gen ATPasa D, 5. ARNdc del gen α -tubulina, 6. ARNdc del gen citocromo P450, 7. ARNdc del gen citocromo P450, 8. ARNdc del gen actina, 9. Control negativo.

tractos digestivos de las larvas sometidas al tratamiento cuando fueron observadas al microscopio de fluorescencia. El compuesto se dispersó a lo largo de todo el tracto digestivo de las larvas (Figs. 1 A-C). Si bien en el tejido control se observa una fluorescencia basal, es evidente la diferencia en intensidad respecto al tejido con el tratamiento. Algunos compuestos en el tracto digestivo del insecto pueden ser excitados con la luz y emitir algún tipo de fluorescencia natural. La mezcla de inhibidores de proteasas (Complete™) resultó ser efectiva para alterar el normal desarrollo y crecimiento de las larvas de la broca. Esta mezcla ya había sido evaluada en varias especies de insectos manifestándose en porcentajes de mortalidad significativamente altos (Chen 2008). Al evaluar las tres concentraciones de la mezcla de inhibidores de proteasa (0,13mg/ml, 0,26 mg/ml y 0,53 mg/ml), se encontró un 85% de mortalidad en la mayor dosis aplicada (0,53 mg/ml), el 15% sobreviviente no llegó a estado L2 en el momento de la evaluación. (Fig. 2). Los porcentajes de mortalidad se corrigieron respecto al control negativo del experimento. A medida que se aumentaba la concentración de la mezcla de inhibidores de proteasas, disminuía el porcentaje de larvas L1 que pasaron a L2 y se incrementaba el porcentaje de mortalidad (Fig. 2).

Efecto del silenciamiento genético. Los productos de la síntesis de cada ARNdc se verificaron por electroforesis en gels de agarosa. Los fragmentos tenían el tamaño esperado entre 300 pb y 350 pb para cada ARNdc (Fig. 3).

Los bioensayos con dietas conteniendo los ARNdc produjeron mortalidades que van desde el 10% hasta el 60%. El análisis de varianza de los datos de la mortalidad corregida con el control en cada uno de los tratamientos y por cada gen mostró diferencias entre las concentraciones y entre cada ARNdc sin embargo no existen diferencias entre las dos concentraciones con el ARNdc xilanasas, y entre el tratamiento con los ARNdc de actina y ATP-asa D ($F=448,14$; $df=27$; $P<0,0001$). Los ARNdc de los genes de citocromo P450 fueron los mejores tratamientos, ya que produjeron porcentajes de mortalidad de 64% y 52%, seguido a estos se encuentran los ARNdc de mananasa y xilanasas con un porcentaje de mortalidad de 37% y 33% respectivamente, para la máxima concentración (60 μ g). (Fig. 4).

La teoría de la defensa química propone que la alta concentración de cafeína en las hojas jóvenes, frutos y botones florales del café actúa como defensa para proteger a los tejidos blandos de los agentes patógenos y herbívoros (Ashihara *et al.* 2008). Se ha demostrado que la fumigación de hojas de tomate con una solución al 1% de cafeína, disuade a la alimentación de gusanos picudos del tabaco, mientras que el tratamiento de las hojas de repollo y de orquídeas con soluciones de 0,01-0,1% de la cafeína actúa como un neurotóxico y mata o repele las babosas y los caracoles. Pruebas convincentes de la teoría de la defensa química han sido recientemente obtenidas con plantas transgénicas de tabaco productoras de cafeína (Uefuji *et al.* 2005). El papel de la cafeína como una defensa química para el café contra la broca *H. hampei* también ha sido investigado aunque no se observó relación entre la resistencia y el contenido de cafeína en experimentos en los que las semillas de varias especies de café con diferentes niveles de cafeína fueron expuestas a insectos adultos. Se sugirió que la broca ha desarrollado una adaptación para manejar los efectos tóxicos de la cafeína (Guerreiro *et al.* 2003). Es probable que un organismo como la broca, que es capaz de crecer específicamente en las semillas del café, pueda metabolizar compuestos xenobióticos presentes en la semilla, como la cafeína (1,5% p/v), entre otros (Gokulkrishnan *et al.* 2005).

Nuestros resultados demuestran que el mecanismo de ARN de interferencia sobre los genes de citocromo P450 oxigenasas, cuya expresión es específica del tracto digestivo de la broca del café, tuvo un efecto significativo sobre la mortalidad (64% y 52%) y sobre el crecimiento de las larvas, en las cuales se evidenció un retraso (datos no mostrados). Considerando que la dieta artificial con la que se alimentaron las larvas de la broca está hecha principalmente con semillas molidas de café, es probable que la absorción de los ARNdc correspondientes a los genes que codifican estas enzimas hayan interferido con su síntesis alterando significativamente el metabolismo de compuestos xenobióticos de la dieta. En consecuencia, las larvas no pueden metabolizar estos compuestos, retrasan su crecimiento, se intoxican y algunas mueren.

El efecto del silenciamiento de los genes mananasa y xilanasas fue menor, comparado con los citocromo P450 y la actina, pero significativo. Es posible que dosis mayores de ARNdc de estos genes tenga efectos mayores sobre la mortalidad de las larvas. El galactomanano es el principal poli-

sacárido de la semilla del café por lo que su descomposición en azúcares simples sería un factor nutricional determinante en la dieta de las larvas. El análisis del transcriptoma del aparato digestivo de la broca ha demostrado una significativa expresión genética de genes que codifican enzimas glicohidrolíticas, entre las que se identificaron amilasas, galactosidasas, mananasas y xilanasas (datos no publicados). Por tal motivo, es de esperarse que el silenciamiento del gen mananasa provoque un efecto antinutricional significativo debido a la incapacidad de las larvas de metabolizar estos polisacáridos.

Aunque todavía no se ha determinado con precisión el papel de las xilanasas en la digestión del grano de café, el silenciamiento de este gen produjo porcentajes de mortalidad significativos lo que implicaría un rol funcional de la xilanasas similar al de la mananasa. El xilano o los carbohidratos con residuos de xilosa, que serían los potenciales substratos de la enzima, no se han identificado plenamente en la semilla del café, aunque se conoce que la hidrólisis ácida de los carbohidratos de la semilla produce concentraciones bajas de xilosa (Redgwell *et al.* 2006). La posibilidad de utilizar inhibidores enzimáticos proteicos de alguna de estas glico-hidrolasas o la producción de plantas transgénicas expresando los ARNdc de estos genes se unen como alternativa para el control genético de la broca del café. En el caso de las xilanasas se han identificado inhibidores de la enzima en semillas de trigo y otros cereales. Bioensayos con dietas artificiales usando un inhibidor de xilanasas, XIP-I produjeron el 60% de mortalidad de larvas L2 de la broca (datos no publicados).

La estrategia de suministro por vía oral de ARNdc ha sido ampliamente usada en estudios de silenciamiento génico, en su mayoría con el fin de crear nuevas tecnologías para el control de plagas. Baum *et al.* (2007) observaron mortalidades significativas y reducción en la masa corporal larval en individuos de *D. virgifera virgifera*, alimentados en dietas artificiales con moléculas silenciadoras de los genes V-ATPasa subunidad A, D y E. Usando técnicas moleculares cuantitativas demostraron que el efecto de mortalidad puede atribuirse a la disminución en la expresión de los genes blanco, es decir, a su silenciamiento específico. Adicionalmente establecieron un sistema de transformación de plantas de maíz que expresaran los ARNdc efectores y en experimentos *in vivo* observaron una significativa reducción en los niveles de infestación de raíces por parte del gusano (Baum *et al.* 2007). Del mismo modo en otros insectos de varios órdenes se han determinado diversos efectos fisiológicos derivados de la ingestión de este tipo de moléculas. Mao *et al.* (2007) demostraron la baja regulación de los genes CYP6AE14 y Glutión-S-transferasa por Northern blot y la susceptibilidad de individuos de *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 (Lepidoptera, Noctuidae) al gossypol. Por su parte, y empleando el Lepidóptero *Plutella xylostella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera, Plutellidae) como modelo, Bautista *et al.* (2009) suministraron gotas ARNdc del gen CYP6BG1 a larvas alterando su resistencia a permetrina y lograron determinar una reducción del 98% en la expresión de este gen por medio de qPCR. Adicionalmente a esta evidencia, otros estudios realizados por Kumar *et al.* (2009) y Griebler *et al.* (2008), sugieren que el método de suministro por vía oral de ARNdc desencadena el proceso de silenciamiento génico específico de ARNi. Lo anterior permite argumentar que la estrategia ARNi podría ser utilizada como alternativa de control de insectos vía expresión de ARNdc en la planta (Huvenne y Smaghe 2010).

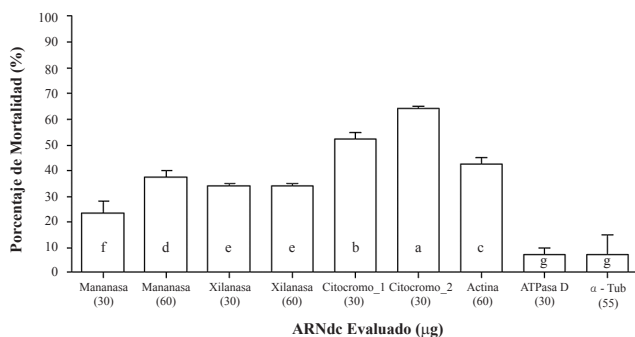


Figura 4. Evaluación el efecto del la ingesta de ARNdc de genes con importancia en procesos digestivos y de genes constitutivos en la broca del café. Cada dato corresponde al promedio del porcentaje de mortalidad calculado en los tratamientos realizados sobre 20 individuos por cada pozo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia por la financiación de esta investigación. A la unidad de cría de parasitoides de Biocafé por el suministro del material entomológico.

Literatura citada

- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. 2008. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* 69: 841-856.
- BAKER, P.S. 1999. La broca del café en Colombia. Informe final del proyecto MIP para el café DFID-Cenicafé-CABI Bioscience (CNTR 93/1536 A). Chinchiná, Colombia, DFID. 154 p.
- BAUM, J.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.Y.; ROBERTS, J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25: 1322-1326.
- BAUTISTA, M.A.M.; MIYATA, T.; MIURA, K.; TANAKA, T. 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39:38-46.
- BUSTILLO P, A. 2008. Aspectos sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. pp. 388-418. En: Bustillo P, A.E. (Ed.). Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Federación Nacional de Cafeteros. Chinchiná. Colombia. 466 p.
- BUSTILLO, A.E.; CÁRDENAS, R.; VILLALBA, D.A.; BENAVIDES, P.; OROZCO, J.; POSADA, F.J. 1998. Manejo Integrado de la Broca, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), en Colombia. *Cenicafé*, Chinchiná, Colombia. 134 p.
- CADENA, G.G. 1991. Sostenibilidad de la producción cafetera, el control de plagas y enfermedades. *Ensayos Sobre Economía Cafetera* 4 (6): 19-26.
- CAMAYO, G.; ARCILA, J. 1997. Desarrollo floral del café en condiciones de la zona cafetera colombiana (Chinchiná - Caldas). *Cenicafé*, Avances técnicos, No. 245. Chinchiná, Colombia. 8 p.
- CHAVES, B.; RILEY, J. 2001. Determination of factors influencing integrated pest management adoption in coffee berry borer in Colombian farms. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 87: 159-177.
- CHEN, M-S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect science* 15: 101-114.
- CLIFFORD, M. N.; IN, M. N.; CLIFFORD, K. C. 1985. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. Wilson (eds), pp. 305-374.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-11.
- FISCHER, M.; REIMANN, S.; TROVATO, V.; REDGWELL, R.J. 2001. Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydrate Research* 330: 93-101.
- GRIEBLER, M.; WESTERLUND, S.A.; HOFFMANN, K.H.; MEYERLING-VOS, M. 2008. RNA interference with the allatregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *Journal of Insect Physiology* 54: 997-1007.
- GUERREIRO, O.; MAZZAFERA, P. 2003. Caffeine and resistance of coffee to the berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6987-6991.
- GOKULAKRISHNAN, S.; CHANDRARAJ, K.; SATHYANARAYANA, N. GUMMADI. 2005. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 225-232.
- HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology* 56: 227-235.
- KUMAR, M.; GUPTA, G.P.; RAJAM, M.V. 2009. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology* 55: 273-278.
- MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J.; HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology* 25: 1307-1313.
- PORTILLA, M. 1999. Desarrollo y evaluación de una dieta artificial para la cría de *Hypothenemus hampei*. *Revista Cenicafe* (Colombia) 50(1): 24-38.
- REDGWELL, R.J.; FISHER, M. 2006. Coffee carbohydrates. Mini review. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18(1): 165-174.
- UEFUJI, H.; TATSUMI, Y.; MORIMOTO, M.; KAOTHINAKAYAMA, P.; OGITA, S.; SANO, H. 2005. Caffeine production in tobacco plants by simultaneous expression of three coffee N-methyltransferases and its potential as a pest repellent. *Plant Molecular Biology* 59: 221-227.
- VANHECKE, D.; JANITZ, M. 2005. Functional genomics using high throughput RNA interference. *Drug discovery Today: Targets* 10: 205-212.
- VILLALBA, D.A.; BUSTILLO, A.E.; CHAVEZ, B. 1995. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. *Revista Cenicafe* (Colombia) 46 (3): 152-163.
- WOLFROM, M. L.; PATIN, D. L. 1965. Carbohydrates of the coffee bean. IV. An arabinogalactan. *Journal of Organic Chemistry* 30: 4060-4063.
- ZHOU, X.; WHEELER, M.M.; OI, F.M.; SCHARF, M.E. 2008. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 805-815.

Recibido: 11-nov-2010 • Aceptado: 22-sep-2011

Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus obscurus* e *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

Biologic, morphologic, and genetic aspects of *Hypothenemus obscurus* and *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

LUIS M. CONSTANTINO¹, LUCIO NAVARRO², ALEJANDRO BERRIO³, FLOR E. ACEVEDO⁴, DAVID RUBIO⁵
y PABLO BENAVIDES⁶

Resumen: Existen dos especies de *Hypothenemus* en Colombia de importancia económica: *H. hampei* y *H. obscurus*. La primera es la plaga más destructiva del café, mientras que la segunda ataca varias especies, incluyendo macadamia y café. El objetivo de esta investigación fue comparar estas dos especies, biológica, morfológica y genéticamente, con el fin de establecer diferencias que expliquen la adaptación de la broca al café. Los insectos fueron criados en dieta artificial de café y macadamia para estudiar su biología. Se estudió su morfología mediante mediciones en microscopio de luz y a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las comparaciones genéticas se realizaron mediante citogenética y bandeo C cromosómico, desarrollo de perfiles genéticos AFLP y estudios de partenogénesis. La duración del ciclo de vida (huevo a adulto) de *H. obscurus* fue de $28,5 \pm 1,3$ días y en *H. hampei* de $26,8 \pm 1,0$ en dietas de macadamia y café respectivamente. Ambas especies se desarrollaron en las dietas alternativas; sin embargo, su capacidad reproductiva se afectó significativamente. Las comparaciones morfológicas mostraron características específicas que diferencian ambas especies y permitieron explicar su comportamiento de alimentación. Los análisis citogenéticos revelaron heterocromatización facultativa que ocasiona patrones idénticos de haplodiploidía funcional en ambas especies, igualmente se reportan similares cariotipos y número de cromosomas. No se evidenció partenogénesis y se amplificaron fragmentos de ADN exclusivos en cada una de ellas. Esta información permitirá avanzar en la comparación de los transcriptomas de estas especies para dilucidar las bases genéticas que soportan los hábitos monófagos de la Broca del Café.

Palabras claves: Citogenética. Huella digital. Microscopia electrónica.

Abstract: There are two species of the genus *Hypothenemus* of economical importance in Colombia: *H. hampei* and *H. obscurus*. The first is the most destructive insect pest of coffee worldwide, while the latter attacks several crops including macadamia nut and coffee. This research was carried out in order to compare, biologically, morphologically and genetically, these two species to establish differences which explain the adaptation of coffee berry borer to coffee plants. The insects were reared on macadamia and coffee artificial diets. The morphology was studied through observations under light microscope, and Scanning Electron Microscopy (SEM). The genetic comparisons were made using cytogenetics, C-Banding of chromosomes, AFLP molecular fingerprints and parthenogenesis bioassays. *H. obscurus* life cycle (egg to adult) was estimated in 28.5 ± 1.3 days, while *H. hampei* was 26.8 ± 1.0 on macadamia and coffee diets respectively. Both species could develop on the alternative diet; however, their reproductive capacity was significantly reduced. The morphological comparisons showed specific characteristics for each species, and allowed to explain their feeding habits. The cytogenetic analysis showed facultative heterochromatization which offered identical functional haplo-diploid patterns in both species. We also reported similar karyotypes and chromosome number for both species. There was no evidence of parthenogenesis in these two species and each one showed distinguishable DNA fragments in their fingerprints. This basic information will allow advancing in the comparison of the transcriptomes of these two species in order to elucidate the genetic basis that supports the monophagous habits of coffee berry borer.

Key words: Cytogenetics. Fingerprints. Electronic Microscopy.

Introducción

La Broca del Café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) y la Falsa Broca *H. obscurus* (Fabricius, 1801) son dos especies que se han reportado en el cultivo del café. La primera es la plaga más devastadora del cultivo a nivel mundial, se alimenta y reproduce del endospermo del fruto, causando su deterioro comercial y reduciendo su calidad en taza; es una especie de hábitos monófagos, exclusiva del género *Coffea* y es de origen africano (Bustillo 2006). Por otro lado *H. obscurus* es una especie polífaga, de origen neotropical, se alimenta del mucílago del café, pero es incapaz de perforar las almendras (Vélez 1997).

Los adultos de estas dos especies se pueden encontrar atacando simultáneamente los frutos de café, siendo *H. hampei* la especie más abundante y de distribución más amplia en todo Colombia. Actualmente infesta unas 800.000 ha de café (Bustillo 2006) en un rango entre 600 y 2.200 m.s.n.m. con temperaturas entre 19 y 21°C (Arcila 2007), mientras que *H. obscurus* se encuentra asociada principalmente a cultivos de macadamia en regiones de la zona central cafetera colombiana ubicadas entre los 20 y 23°C, a altitudes comprendidas entre 1.000 y 1.500 m.s.n.m (Villegas y Sánchez 2008). Los adultos de *H. obscurus* y *H. hampei* a simple vista son difíciles de distinguir. *H. hampei* posee setas erectas y filiformes, mientras que *H. obscurus* las po-

¹ M.Sc., Investigador Científico I, Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. luismiguel.constantino@cafedecolombia.com. ² Biólogo, Investigador Científico I, Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. lucionavarro@cafedecolombia.com. ³ Biólogo, Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. alejandroberrio@cafedecolombia.com. ⁴ I. A. Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. floreth.acevedo@cafedecolombia.com. ⁵ M.Sc., Mejoramiento Genético, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. david.rubio@cafedecolombia.com. ⁶ Ph.D., Investigador Científico II, Coord Disciplina de Entomología, Cenicafé, Chinchiná, Caldas. pablo.benavides@cafedecolombia.com

see más cortas y achatadas en forma de bate en su extremo con seis estrías longitudinales (Alonzo-Padilla 1984; Rubio 2003).

Ambas especies presentan varias sinonimias dados los problemas para identificar correctamente las 200 especies del género *Hypothenemus* conocidas en el ámbito mundial (Wood 2007). *H. obscurus* se encuentra distribuido en Costa Rica, Sur África, en el sudeste asiático, Sur de Estados Unidos, Hawai, Guadalupe, Jamaica, Puerto Rico, México, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Trinidad, Guyana, Surinam, Colombia y Brasil, donde se tiene reportada como plaga del cultivo de macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden y Betch) ocasionando una disminución del rendimiento y calidad de la nuez. Igualmente esta especie se alimenta de las vainas y semillas, y en algunas ocasiones en ramas secas, de una amplia variedad de hospedantes entre los cuales los más importantes son: el algarrobo *Hymenaea courbaril* (Caesalpiniaceae), tamarindo *Tamarindus indica* (Caesalpiniaceae), clavellino *Caesalpinia pulcherrima* (Caesalpiniaceae), nuez moscada *Myristica fragrans* (Myristicaceae), nuez del brasil *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae), yarumo *Cecropia* sp. (Cecropiaceae), matapalo *Phoradendron* sp. (Loranthaceae), *Ficus* sp. (Moraceae), mangle *Rhizophora* sp. (Rhizophoraceae), cacao *Theobroma cacao* (Sterculiaceae), congolo *Mucuna* sp. (Fabaceae) y café *Coffea arabica* (Rubiaceae) (Wood 2007). Estos antecedentes nos indican que *H. obscurus* es de hábitos polípagos, contrario a *H. hampei* el cual ha sido descrito de hábitos monófagos, alimentándose exclusivamente del género *Coffea* spp. (Rubiaceae) (Vélez 1997; Bustillo 2006).

En Colombia *H. obscurus* está reportada como plaga del cultivo de la nuez de macadamia en la zona cafetera de los departamentos de Quindío, Risaralda, Caldas, Cauca, Valle y Cundinamarca (Villegas 1998). Las hembras inician el ataque al realizar perforaciones laterales en la nuez, hasta alcanzar la almendra donde depositan sus huevos, de los que emergen las larvas que consumen la almendra casi en su totalidad, encontrando que el daño se produce tanto en los frutos verdes que se empiezan a secar en el árbol como en los frutos que se caen al suelo (Beardsley 1990; Jones *et al.* 1992; Villegas 1998). Además del daño mecánico directo ocasionado por la Falsa Broca al alimentarse y destruir las almendras, los orificios de entrada y de salida realizados por el insecto en los frutos son la puerta de entrada a esporas de hongos saprofitos que contaminan la nuez, causando mayores pérdidas de calidad y disminución del valor comercial de la almendra (Jones *et al.* 1992). En el caso del cultivo de café, *H. hampei* ataca y daña los frutos que son comercializados, reduce la producción por la destrucción de los granos (pérdida de peso), provoca la caída de frutos, deprecia el café en su clasificación por tipo al aumentar los granos perforados y quebrados en el beneficio y además, altera el sabor de la bebida (Duque y Chaves 2000).

Una de las características biológicas de la Broca del Café es su comportamiento reproductivo altamente endogámico, la broca fundadora produce una progenie compuesta principalmente por hembras, en una proporción de 10:1 con respecto a los machos, estos últimos ápteros y de menor tamaño, los cuales permanecen dentro del fruto apareándose con las hembras de su misma progenie (consanguíneos) (Bustillo 2008; Benavides 2008). Una vez apareadas, las hembras emergen para buscar nuevos frutos de café para ovipositar de manera que la mayor parte del ciclo el insecto ocurre dentro del fruto.

La disponibilidad de dietas artificiales desarrolladas para la cría de la Broca del Café (Villacorta y Barrera 1993; Portilla 1999; Vega *et al.* 2009) ha permitido el mantenimiento de poblaciones por varias generaciones sucesivas para adelantar estudios de biología y genética en condiciones de laboratorio. Los estudios de genética de la Broca del Café muestran que esta especie es funcionalmente haplodiploide, ya que en exámenes citogenéticos de células somáticas de hembras y machos se evidenció que ambos eran diploides; sin embargo, los machos fallaron en expresar genes de resistencia a insecticidas e incluso parece que no pueden transmitir sus cromosomas paternos a su descendencia; esta característica podría ser denominada pseudoarrenotoquia (Brun *et al.* 1995).

La haplodiploidía ha evolucionado al menos unas 17 veces en animales, incluyendo los taxones Rotifera, Nematoda, Arachnida e Insecta (Mable y Otto 1998). En los artrópodos existen dos formas de llegar a ser un macho haploide en las especies haplodiploides: en organismos *arrenotocos* los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados haploides; mientras que en *pseudoarrenotocos*, los machos se desarrollan de huevos fertilizados diploides, pero luego el genoma paterno es eliminado. En el último caso, existen dos formas de perder el genoma paternal: (i) el set de cromosomas paterno es eliminado durante los estados tempranos del desarrollo embrionario y el macho se convierte en un individuo somáticamente haploide; o (ii) el set cromosómico paterno es inactivado y retenido al interior de las células somáticas como una masa condensada de cromatina y eliminados durante la espermatogénesis. En ambos casos, el set cromosómico materno es génicamente expresado y cromosómicamente transmitido a su progenie. A la fecha, la pseudoarrenotoquia ha sido estudiada en cóccidos (Hemiptera) (Nur 1980), ácaros de la familia Phytoseiidae (Acari) (Nelson-Rees *et al.* 1980; Schulten 1985; Perrot-Minnot *et al.* 2000) y en la Broca del Café (Coleoptera) (Brun *et al.* 1995; Borsa y Kjellberg 1996).

En vista de que el ciclo de vida de *H. obscurus* no está descrito completamente y que esta especie parece cercana a *H. hampei*, surgió la necesidad de hacer este estudio comparativo para determinar las diferencias biológicas, morfológicas, citogenéticas y genéticas existentes entre estas dos especies pertenecientes al mismo género, pero contrastantes en hábitos y comportamientos, que podría ayudar a entender las razones biológicas y genéticas que posee la Broca del Café para ser una especie tan especializada en alimentarse, desarrollarse y reproducirse únicamente en plantas del género *Coffea* spp.

Materiales y Métodos

Aspectos biológicos de *H. obscurus* y *H. hampei*. Para avanzar en el conocimiento de la biología de la Falsa Broca y la Broca del Café, se realizaron estudios comparativos sobre la cría de estos dos insectos en frutos de macadamia, granos de café y dietas artificiales. También se estudió el daño y el modo de penetración de *H. obscurus* en frutos de macadamia. Para el desarrollo de una dieta artificial para la cría de *H. obscurus* en confinamiento, se estudió la dieta Cenibroca (Portilla 1999) usada para la cría de la Broca del Café, donde se reemplazó el café molido por endospermo y pericarpio de macadamia.

El modo de penetración y el daño de la Falsa Broca se registraron mediante observación directa en cultivos de ma-

cadamia de la Estación Experimental Paraguacito de Cenicafé, localizada a 1.200 m de altitud, en el departamento del Quindío, Colombia. Se recolectaron 100 frutos brocados del suelo de una parcela de 180 árboles productivos, que contenían una perforación de entrada en la corona. Estos frutos se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 2\%$ de HR durante 60 días en cajas plásticas de 30 x 25 x 10cm con tapa y dos orificios de ventilación de 5cm de diámetro cubiertos con muselina blanca. Una vez se obtuvieron los adultos se establecieron colonias del insecto mediante la cría en dieta artificial.

En laboratorio se realizó un ensayo de alimentación de *H. obscurus* y *H. hampei* con frutos y granos de café. Inicialmente se tomaron 100 cerezas de café (*Coffea arabica* var. Colombia) con 22 a 30 semanas de desarrollo y se depositaron sobre cajas plásticas. Estos frutos se infestaron en una proporción de 1:1 con 100 hembras adultas de Falsa Broca provenientes de la colonia en dieta artificial de macadamia (Cenibroca modificada). Del mismo modo, otros 100 frutos de café con las mismas características se infestaron con hembras fértiles de Broca del Café criadas sobre café pergamino del 47% de humedad. En otro experimento, granos de café pergamino del 47% de humedad se individualizaron en 80 viales de vidrio borosilicato (12 x 35mm) con tapa plástica y se infestaron con un adulto hembra de *H. obscurus* y de *H. hampei* (40 repeticiones/especie). Estas muestras se mantuvieron en condiciones de laboratorio de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura y $80\pm 2\%$ de humedad relativa (HR).

Los frutos y granos de café se disecaron 12 días después. Se registró el número de frutos y granos perforados, la posición de los adultos de cada especie en frutos y granos de café y la presencia de estados inmaduros.

Con el fin de describir el ciclo de vida (huevo a adulto) de las dos especies de *Hypothenemus*, se realizó un experimento con dietas artificiales. La unidad experimental estuvo conformada por un vial de vidrio (60 x 25mm) esterilizado con 1 g de dieta artificial Cenibroca (café) y Cenibroca modificada (macadamia), conteniendo una hembra fértil de cada especie en cuatro tratamientos (Tabla 1): T1 dieta de macadamia con *H. obscurus*, T2 dieta de macadamia con *H. hampei*, T3 dieta de café con *H. obscurus* y T4 dieta de café con *H. hampei*. La infestación de las dietas se realizó con adultos de Falsa Broca y Broca del Café desinfectados con una solución al 3% de hipoclorito de sodio con tres lavados durante tres minutos y un enjuague con agua destilada para evitar contaminación en las dietas. Los viales se ubicaron dentro de cajas plásticas de color negro sobre estantes metálicos para evitar la entrada de luz y semejar los hábitos crípticos del insecto. Este experimento se mantuvo en las mismas condiciones de laboratorio descritas anteriormente. Por cada tratamiento se tuvieron 30 repeticiones, asignadas bajo un diseño completamente aleatorio. Se evaluó la oviposición de las hembras y el número de estados biológicos de cada especie en las dietas artificiales a los 28 y 35 días después de infestadas. Los datos se analizaron por medio de la estimación del promedio y del coeficiente de variación por tratamiento, con un análisis de varianza al 5% bajo un modelo con un diseño completamente aleatorio y prueba de Tukey ($p<5\%$) entre tratamientos. Se determinó la duración del ciclo de vida de ambas especies a partir de las unidades experimentales de los tratamientos (T1) y (T4).

Comparación morfológica entre *H. obscurus* y *H. hampei*.

Se tomaron fotografías mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), para lo cual los adultos de ambas especies se fijaron en solución de glutaraldehído (2,5%) con buffer fosfato (0,1M; pH7,4) por 48 horas y luego se sometieron a deshidratación en una serie gradual de diferentes concentraciones de etanol (80, 90 y 100%) durante 20 minutos; luego las muestras se sumergieron en etanol:xileno (1:1) durante 12 horas y después se transfirieron a etanol 100% por 20min. El secado por punto crítico con CO_2 se realizó en una cámara de vacío Tousimis 780 (Rockville, MD). Los especímenes adultos se colocaron sobre un portaobjeto adherido con cinta transparente de doble faz en posición lateral, dorsal y ventral, con 10 individuos por cada especie. Las muestras se sometieron a fase de metalizado con Oro y Paladio de 18nm cubiertas con un pulverizador y visualizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-820, Tokio), de la Unidad de Virología del CIAT, Palmira, Colombia.

Igualmente se realizaron comparaciones usando Microscopía de Luz (ML). Para esto, individuos adultos de *H. hampei* y *H. obscurus* se fijaron y aclararon en una solución de KOH (10%) por ocho días, después se lavaron en etanol (95%) y se montaron sobre portaobjetos de vidrio con bálsamo de Canadá y se visualizaron con un microscopio de luz Nikon modelo SM2 1500, equipado con un dispositivo de iluminación con luz blanca (Digital Sight DS-U1), usando un software (NIS-Elements-BR- Nikon Corporation, Tokio). Las mediciones se realizaron a 100 individuos de cada estado para cada especie con la ayuda de una reglilla milimétrica acoplada al ocular del microscopio de luz.

Evaluación de partenogénesis. Para determinar si *H. obscurus* y *H. hampei* presentaron sistema de reproducción partenogenética, por especie se individualizaron 50 pupas hembras en viales de vidrio con dieta de macadamia y café respectivamente. La diferenciación de sexos en las pupas de ambas especies se logró gracias a que ambas especies presentaron claro dimorfismo sexual, siendo los machos más pequeños, con cuerpo más recurvado y ápteros. Los viales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $80\pm 2\%$ en cajas multiuso plásticas de color negro. Se tomaron lecturas cada semana hasta 50 días después para contabilizar y determinar la presencia o ausencia de posturas y el desarrollo de las progenies.

Análisis citogenético de *H. hampei* y *H. obscurus*. Para comparar células somáticas de *H. hampei* y *H. obscurus*, larvas y pupas de ambas especies se prepararon tejidos procedentes de la unidad de cría de broca en el laboratorio de Entomología de CENICAFE, Colombia. Se usó el método de microcentrifugación de Camargo *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Cada individuo se sumergió en solución hipotónica (NaCl 44mM; CaCl_2 0,90 mM; KCl 1,34mM; NaHCO_3 1,19mM; Colchicina 1%) durante 2h, después de la primera hora, los individuos se maceraron suavemente usando un pistilo plástico para obtener una suspensión celular. Posteriormente, las suspensiones celulares fueron fijadas en Carnoy (4 etanol: 1 ácido acético). La suspensión celular fue preparada por medio de dispersión mecánica de los tejidos, haciendo entre ocho y 10 movimientos suaves con una micropipeta. Las células fueron colectadas por centrifugación durante 4 min a 3000rpm en una microcentrífuga a temperatura

ambiente, el sobrenadante se descartó y el botón celular fue resuspendido en fijador fresco. Esta suspensión se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 15 µL de fijador fresco. Después, 10 mL de la suspensión fue goteada desde una altura de 20 a 30 cm sobre láminas de porta objetos limpias y enfriadas en agua-hielo. Las láminas goteadas se secaron por flameo y después se tiñeron por 5 min con solución Giemsa (5% en H₂O). Las bandas C se prepararon usando el procedimiento descrito por Schwarzacher *et al.* (1980) con algunas modificaciones. Las láminas goteadas se hidrolizaron después de tres días con una solución de ácido acético (45%) a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, se incubaron en Ba(OH)₂ a 25°C por 10 min y en buffer 2xSSC (pH 7,0) a 60°C por 80 min. Las láminas secas se tiñeron con Giemsa (4%) por 5 minutos. Todas las observaciones y las fotomicrografías se realizaron en un microscopio Nikon Eclipse 90i, las imágenes se capturaron con la cámara integrada usando un software Lucia v5.3 y se procesaron en el programa Adobe Photoshop CS3.

Desarrollo de perfiles genéticos. Los perfiles genéticos de ambas especies se obtuvieron mediante la técnica de AFLP (Polimorfismos Amplificados de Longitud de Fragmentos), utilizando el sistema de análisis II de AFLP (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) según la metodología de Vos *et al.* (1995). Para estos ensayos se usaron tres combinaciones de cebadores específicos *EcoRI/MseI* (AC/CTG, AA/CTG, AA/CTC) a partir de ADN de 10 adultos para cada especie. El ADN fue extraído con el kit Dneasy Tissue-Qiagen (Valencia, CA, USA.). Los amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida (5%) preparados en cámaras de electroforesis vertical (OWL Thermo Fisher Scientific Inc, Portsmouth, NH) y se revelaron por tinción con AgNO₃ según la metodología de Bassam *et al.* (1991).

Resultados y Discusión

Aspectos biológicos de *H. obscurus* y *H. hampei*. Las hembras de *H. obscurus* perforan el pericarpio del fruto de macadamia a través de la corona o cicatriz del cáliz floral cuando el fruto aún está verde y no en la parte lateral del endocarpo como fue reportado anteriormente (Jones *et al.* 1992; Villegas 1998) (Fig. 1A); posteriormente, ellas perforan el endocarpo inmaduro para poder entrar en el endospermo o nuez, donde barrenan y forman galerías y cámaras en su interior. Una vez adentro, ovipositan entre 10 y 30 huevos y completan su ciclo de vida (Fig. 1C). Posteriormente se aparearon y las hembras rompieron la parte lateral del endocarpo, abriendo varios orificios circulares por donde emergieron los adultos en busca de nuevos frutos para colonizar (Fig. 1E). La textura externa lisa y dura del endocarpo, la cual no permite apoyo y fricción al insecto, podría ser la explicación para que no pueda penetrar lateralmente. Una situación diferente se presenta cuando los frutos están secos, ya que el endocarpo se vuelve extremadamente duro y se dificulta la salida de las hembras de la nueva generación. En este estudio se observó que más del 80% de las hembras muertas halladas dentro de frutos secos presentaron los dientes de las mandíbulas completamente desgastados y un gran número de perforaciones parciales no finalizadas de adentro hacia afuera del endocarpo en frutos colectados del campo (Fig. 1D).

Además del daño mecánico directo ocasionado por el insecto al alimentarse y destruir las almendras, los orificios de entrada y de salida son la puerta de entrada a esporas de



Figura 1. Sitio de penetración y daño de Falsa Broca *Hypothenemus obscurus* en frutos de macadamia. **A.** frutos verdes mostrando el cáliz floral (cf) o corona. **B.** frutos secos mostrando el canal de penetración (cp), pericarpio (p), endocarpo (e), endospermo (almendra) (a). **C.** galerías en la almendra. **D.** perforaciones parciales no finalizadas de adentro hacia afuera en el endocarpo. **E.** fruto seco mostrando el orificio de entrada (oe) en la corona, y orificio de salida (os) en la parte lateral del endocarpo.

hongos saprofitos que contaminan la nuez, causando mayores pérdidas de calidad y disminución del valor comercial de la almendra, tal como lo reporta Jones *et al.* (1992).

H. obscurus logró perforar 59% de las cerezas de café, pero sólo el 3% logró roer los granos superficialmente. No se observaron galerías dentro de los granos y sólo un huevo fue depositado en el interior de un grano. *H. hampei* por el contrario, perforó el 96% de las cerezas de café, el 66% de los granos y ovipositó en el 8% de ellos a los 12 días de la infestación. Sobre café cereza se encontraron estados inmaduros en el 32,5% de los frutos infestados con Falsa Broca, con un promedio de 5,3 estados por fruto alimentándose de pulpa y mucílago en el espacio que separa los dos granos; estos estados larvales lograron desarrollarse hasta adulto. La totalidad de los frutos de café perforados por *H. hampei* contenían estados inmaduros en el interior de las almendras con un promedio de 40 estados por grano. Estos resultados confirman las observaciones previas (Vélez 1997; Bustillo 2006). Estos resultados indican que bajo las condiciones de laboratorio, *H. obscurus* tuvo la capacidad de perforar y desarrollarse en cerezas de café, alimentándose del mucílago y pulpa de las cerezas sin realizar daño a las almendras. Se confirman los hábitos polífagos de *H. obscurus*, incluido el café, tal como lo reportan Vélez (1997) y Wood (2007). A pesar de que estas pruebas se realizaron en laboratorio y los insectos fueron expuestos a una sola posibilidad de alimento, no se esperaría en condiciones naturales en Colombia que la Falsa Broca ofrezca una amenaza al cultivo del café, ya que los registros citados de Falsa Broca en frutos de café en otros países tampoco reportan daño a las almendras (Wood 2007).

Las evaluaciones de cría de *H. obscurus* en dieta artificial Cenibroca modificada (macadamia) permitieron observar que la adición de sólo endospermo, producía una película lipídica que no permitía el normal desarrollo de los estados del insecto. La proporción de los componentes provenientes de macadamia que permitieron la cría de la Falsa Broca

Tabla 1. Componentes de la dieta artificial Cenibroca (Portilla 1999) (café) para la cría de *Hypothenemus hampei* y de la dieta artificial Cenibroca modificada (macadamia) para la cría de *Hypothenemus obscurus*.

Ingredientes	<i>H. obscurus</i>	<i>H. hampei</i>
Agua	200 ml	200 ml
Agar	5,6 g	5,6 g
Nuez de macadamia molida	6 g	--
Pericarpio de macadamia molida	20 g	--
Café molido	--	26 g
Sucrosa	3,7 g	3,7 g
Caseína	5,3 g	5,3 g
Levadura torula	5,3 g	5,3 g
Acido benzoico	0,21 g	0,21 g
Benomil	0,4 g	0,4 g
Vitaminas de Vanderzant	0,133 g	0,133 g
Nipagin	0,26 g	0,26 g
Colesterol	0,16 g	0,16 g
Acido sorbico	0,06 g	0,06 g
Sales de Wesson	0,53 g	0,53 g
Etanol	2,66 ml	2,66 ml
Formaldehido 37%	0,53 ml	0,53 ml

fue de 20% de endospermo con 80% de pericarpio molidos (Tabla 1).

En la dieta de café, *H. obscurus* ovipositó en solo 10% de las unidades experimentales, en contraste con la dieta de macadamia donde ovipositó en la totalidad de ellas. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la capacidad reproductiva de esta especie entre la dieta de macadamia y la dieta de café a los 28 y a los 35 días ($n=30$; $gl=6$; $P=0,0001$) (Tabla 2). Lo mismo se observó para *H. hampei*, donde esta especie no ovipositó en dieta de macadamia ($n=30$; $gl=6$; $P=0,0001$) (Tabla 2). Estos resultados confirman los hábitos polífagos de *H. obscurus* y monófagos de *H. hampei* tanto en dieta artificial Cenibroca (macadamia) y Cenibroca (café) como en frutos de café, mientras que Vélez (1997) solo lo reportó en frutos de café.

El ciclo de vida desde huevo hasta adulto de *H. obscurus*

Tabla 2. Número de huevos (promedio $\pm$ error estándar) depositados por hembras de *Hypothenemus obscurus* y de *Hypothenemus hampei* en dieta artificial de café (Cenibroca) y macadamia (Cenibroca modificada) a los 28 y 35 días de infestadas (DDI) ($n=30$).

Hypothenemus obscurus

DDI	Café	Macadamia
28	13,1 $\pm$ 4,3 a	36,4 $\pm$ 5,8 b
35	14,7 $\pm$ 4,7 a	42,1 $\pm$ 5,5 b

Hypothenemus hampei

DDI	Café	Macadamia
28	29,4 $\pm$ 6,1 a	0,0 $\pm$ 0,0 b
35	32,2 $\pm$ 6,4 a	0,0 $\pm$ 0,0 b

Medias $\pm$ error estándar seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos.

en dieta artificial de macadamia fue un poco más largo que el de *H. hampei* (Tabla 3). Estos resultados registran por primera vez la cría de *H. obscurus* en dieta artificial bajo condiciones de laboratorio. Se encontró una proporción sexual (macho: hembra) de 1:12 en *H. obscurus* y 1:10 en *H. hampei*. Estas diferencias de radio sexual podrían estar relacionadas con la probacteria *Wolbachia* y su efecto en la determinación sexual de estas especies, de la manera como ha sido reportada como distorsionador de la determinación sexual en varios insectos (Benavides 2008) y su presencia en la Broca del Café fue confirmada (Vega *et al.* 2002). Se presume que en la Falsa Broca se podría presentar esta misma situación. Entre los mecanismos reportados como un distorsionador en la determinación sexual de insectos está la feminización o conversión sexual en el cual individuos genéticamente machos se convierten en hembras funcionales (Rousset *et al.* 1992) y la incompatibilidad citoplasmática, en al cual la fertilidad depende de la ausencia o la presencia de la probacteria en el macho o la hembra (O'Neill *et al.* 1997; Benavides 2008).

Comparación morfológica entre *H. obscurus* y *H. hampei*. Los huevos de las dos especies son de color blanco hialino, lisos y de forma elíptica (Figs. 2A, F), siendo un poco más grandes en *H. hampei* en longitud y grosor (Tabla 4). Las larvas son blanco crema, de tipo curculioniforme, eucéfalas, ápodas y encorvadas. La cabeza es marrón claro con mandíbulas bien desarrolladas (Figs. 2B, G). Pasan por dos etapas de crecimiento o instares larvales (L1 y L2). Las pupas de ambas especies son del tipo exarata, de color blanco recién formadas y se tornan de color crema al cabo de dos días. La cabeza está cubierta completamente por el pronoto (Figs. 2C, H) vistas dorsalmente bajo un Microscopio de Luz (ML).

Los adultos de *H. obscurus* son negro brillante, de forma cilíndrica (vistos dorsalmente), el cuerpo está recubierto de setas achatadas en forma de bate en su extremo. Las formas adultas jóvenes recién formadas, cuando la cutícula del cuerpo aún no está completamente melanizada, son de color castaño claro acaramelado, pero al cabo de dos días se tornan de color negro. Las hembras son de mayor tamaño que el macho (Tabla 4) (Figs. 2 I, J) y presentan alas membranosas bien desarrolladas y funcionales. Los machos carecen de alas membranosas y permanecen todo el tiempo dentro de los frutos apareándose con las hembras de su misma progenie. En *H. hampei*, los adultos son más grandes que *H. obscurus* y presentaron setas filiformes (Figs. 2 D, E) vistos con un Microscopio de Luz (ML). La forma del pronoto es semicircular en *H. obscurus* como en *H. hampei* pero con la superficie reticulada y rugosa que es lisa en *H. hampei*. El pronoto visto en forma dorsal, cubre completamente la cabeza en los dos sexos de ambas especies. La hembra de *H. obscurus*, de perfil, muestra una línea dorsal más o menos recta, mientras que en *H. hampei* es levemente curvada (Figs. 2 D, I). En los machos, en cambio presentan un arco más pronunciado y comprende todo el perfil del borde anterior del protórax y la extremidad apical de los élitros (Figs. 2 E, J) siendo más pronunciado en *H. hampei* que en *H. obscurus*. Según Wood (2007), un carácter diagnóstico de la Falsa Broca es la frente de la cabeza de forma convexa y amplia, con un surco profundo y estrecho en el área medial desde el nivel superior de los ojos hasta el borde del epistoma; sin embargo, este es un carácter débil frente a *H. hampei*.

Las mandíbulas en las dos especies, son estructuras fuertemente esclerotizadas, articuladas dorsolateralmente, situa-

Tabla 3. Duración en días (promedio $\pm$ error estándar) de los diferentes estados de desarrollo de *Hypothenemus obscurus* y *Hypothenemus hampei* en dieta artificial de macadamia y café, respectivamente (n=100).

Estado de desarrollo	<i>H. obscurus</i>	<i>H. hampei</i>
Huevo	4,1 $\pm$ 1,2	5,1 $\pm$ 1,0
Larva 1	7,2 $\pm$ 2,1	6,4 $\pm$ 1,5
Larva 2	9,2 $\pm$ 1,5	6,6 $\pm$ 1,1
Prepupa	2,0 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,1
Pupa	6,0 $\pm$ 1,3	6,5 $\pm$ 1,2
Total	28,5 $\pm$ 1,3	26,8 $\pm$ 1,0

das en la región anterior de la cabeza y de forma triangular (Figs. 3 A, B); poseen dos regiones, una región ventral, en donde se observan tres incisivos diseñados para cortar y en la región dorsal un molar amplio que facilita la trituración del material alimenticio. El tercer incisivo en *H. obscurus* es más desarrollado y visible al que presenta *H. hampei* (Figs. 4 A, B).

Las hembras de *H. hampei* presentan en promedio un número aproximado de 115 omatidios (Fig. 3 C), mientras que el ojo compuesto de *H. obscurus* exhibe alrededor de 150 omatidios (Fig. 3 D) vistos con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Este carácter diagnóstico que no estaba documentado para *H. obscurus*, puede servir para separar ambas especies adultas.

El flagelo de la antena está conformado en las dos especies por ocho flagelómeros que se encuentran fusionados, los primeros cuatro y el pedicelo forman el funículo y los cuatro restantes de la región distal forman una porra o clava ovalada, que presenta una serie de setas a lo largo de las suturas que unen los flagelómeros, estas setas de la porra en *H. hampei* son de menor longitud comparadas con las de *H. obscurus* (Figs. 5 C y 6 D). Wood (2007) describe que el funículo antenal del género *Hypothenemus* presenta de tres a cinco segmentos, de acuerdo con lo registrado en este trabajo, las especies *H. hampei* y *H. obscurus* presentan cuatro segmentos flagelares y solamente en la región distal del cuarto flagelo se observan entre seis a ocho setas (Figs. 5 A y 5 B).

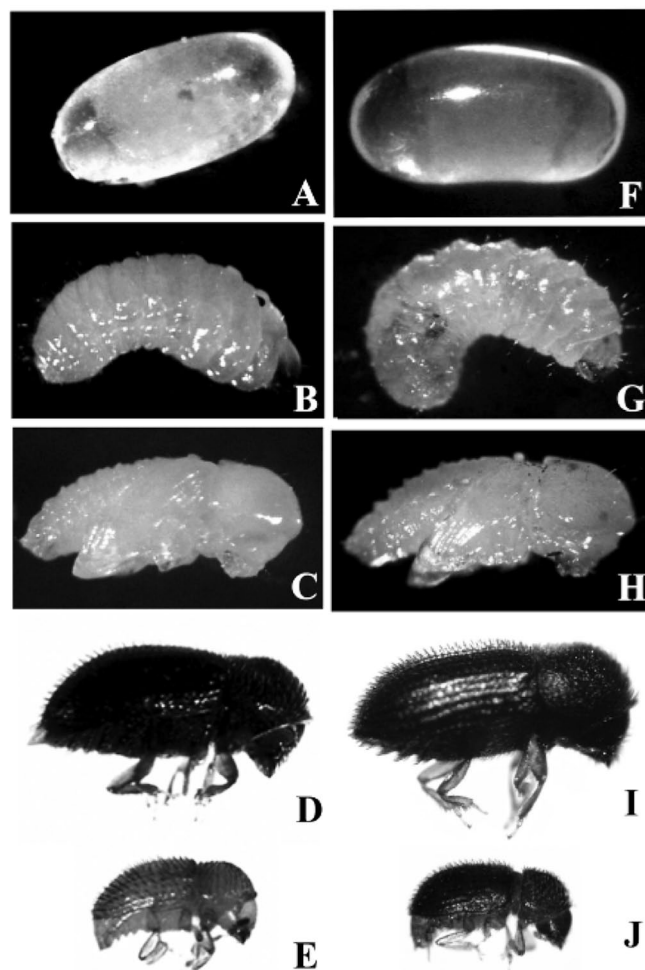
Visto dorsalmente, el pronoto de los dos insectos se inclina en la zona posterior y contiene una gran cantidad de asperezas simétricas, en tipo espiral que presentan setas de diferentes formas y tamaños. Estas setas son largas, cilíndricas y de forma filiforme en *H. hampei*, mientras que en *H. obscurus* son redondeadas en su extremo, en forma de bate y se caracterizan por tener seis a siete estrías longitudinales en la punta (Figs. 6 A a la D) vistas con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Con un Microscopio de Luz las estrías no se alcanzan a visualizar bien, solo se puede apreciar la forma de las setas. La superficie de los élitros en la Broca del Café y en la Falsa Broca es lisa y brillante, las diferencias que presentan están relacionadas en cuanto al número de estrías y la forma de las setas en las interestrias. Los élitros en las hembras de *H. obscurus* cuentan con 10 interestrias y nueve estrías dispuestas longitudinalmente, mientras que en *H. hampei* éstos presentan 11 interestrias y 10 estrías dispuestas longitudinalmente vistos con un Microscopio de Luz (ML) (Figs. 7 A y 7 B).

La tibia en las dos especies se encuentra recubierta de setas y presenta en la región anterior una serie de dientes que

Tabla 4. Longitud (promedio $\pm$ error estándar) en milímetros de cada estado de desarrollo de *Hypothenemus obscurus* y *Hypothenemus hampei* en dieta artificial de macadamia y café, respectivamente (n=100).

Estado	<i>H. obscurus</i>	<i>H. hampei</i>
Huevo	0,65 $\pm$ 0,05 x 0,26 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,02 x 0,30 $\pm$ 0,02
Larva 1	0,63 $\pm$ 0,01 x 0,3 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,02 x 0,33 $\pm$ 0,02
Larva 2	2,0 $\pm$ 0,03 x 0,5 $\pm$ 0,02	2,2 $\pm$ 0,04 x 0,6 $\pm$ 0,03
Pupa	1,65 $\pm$ 0,02 x 0,64 $\pm$ 0,03	1,68 $\pm$ 0,03 x 0,68 $\pm$ 0,02
Adulto macho	1,10 $\pm$ 0,04 x 0,50 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,05 x 0,53 $\pm$ 0,03
Adulto hembra	1,75 $\pm$ 0,06 x 0,76 $\pm$ 0,03	1,85 $\pm$ 0,05 x 0,82 $\pm$ 0,04

difieren en las dos especies, para el caso de *H. hampei* la tibia presenta una serie de seis o siete espinas en la margen distal, mientras en *H. obscurus* se observan ocho espinas (Figuras 7 C y 7 D). Este carácter diagnóstico no fue reportado por Wood (2007). En las dos especies estas espinas son más evidentes en las patas pro y mesotorácicas, pero en las patas metatorácicas son pequeñas y ovaladas. El abdomen en *H. hampei* y *H. obscurus* es completamente curvado en la parte dorsal, debido a que en esta región se pliegan las alas posteriores

**Figura 2.** Estados de desarrollo de *Hypothenemus hampei* A. huevo. B. larva 2. C. pupa. D. hembra. E. macho. Estados de desarrollo de *Hypothenemus obscurus*. F. huevo. G. larva 2. H. pupa. I. hembra. J. macho.

que se resguardan en los élitros. En posición ventral, las dos especies muestran cinco esternitos o placas abdominales muy diferenciadas, pero en *H. hampei* se presenta mayor cantidad de setas en la región ventral del abdomen.

Estudio de partenogénesis. Hubo oviposición en el 70% de los viales para *H. obscurus* y en más del 90% en los viales para *H. hampei*. El total promedio acumulado de huevos fue de $42,1 \pm 5,5$ por hembra en *H. obscurus* y $32,4 \pm 6,4$ huevos en *H. hampei*. Al día 50 las hembras fueron retiradas y se hizo seguimiento a las posturas durante dos meses. De un total de 1.750 huevos ovipositados por *H. obscurus* en 50 días y de 1.458 huevos ovipositados por *H. hampei* en el mismo periodo, ninguno de los huevos eclosionaron, confirmando en este estudio que *H. hampei* ni *H. obscurus* presentaron partenogénesis; esto concuerda con los trabajos de Álvarez y Cortina (2004) en Colombia y Barrera *et al.* (1995) en Méjico para la Broca del Café y se encuentra en contraste con los resultados de Muñoz (1989) en Honduras, y Montoya (1992), Montoya y Cárdenas (1994) en Colombia, donde una pequeña proporción de hembras no fertilizadas produjeron huevos fértiles ($< 0,3\%$).

Estudio citogenético. El estudio de las metafases de *H. hampei* y de *H. obscurus* evidenció un número diploide de $2n=14$ en las hembras y un sistema de determinación sexual en el que un set cromosómico se encuentra condensado en los machos de ambas especies (Figs. 8C, 8D). De acuerdo con las observaciones en las preparaciones cromosómicas, las hembras de *H. hampei* y de *H. obscurus* presentaron una fórmula cariotípica formada por cinco pares de cromosomas submetacéntricos y dos pares acrocéntricos. El tamaño de los cromosomas se distribuye para las dos especies, desde 5 a $1\mu\text{m}$ aproximadamente, tres de ellos poseen tamaños similares (Figs. 8A, 8B). Las células pro-metafásicas de machos de *H. hampei* y *H. obscurus* evidenciaron una masa condensada de uno de los componentes haploides, acompañadas de siete cromosomas (Figs. 8C, 8D). Las células interfásicas de hembras de las dos especies se caracterizaron por la presencia de cromómeros; manchas conspicuas e intensamente teñidas que se relacionaron con un alto grado de condensación de la cromatina (Figs. 8E, 8F). El análisis cariotípico de los machos de estas dos especies revelaron que el set heterocromático haploide visto durante la metafase forma un cromocentro que usualmente está acompañado de varias manchas heteropícnóticas (Figs. 8G, 8H).

Dado que algunos cromosomas de una misma metafase presentaron similitudes macro que dificultaron su análisis, fue necesario realizar bandedo-C. Esta técnica permitió revelar selectivamente las regiones de heterocromatina constitutiva y ofreció mejor información sobre la arquitectura de los cromosomas para una mejor caracterización de los cariotipos (Fig. 9). Adicionalmente, en este estudio se confirma que el cariotipo de *H. hampei* y *H. obscurus* son muy parecidos, de hecho, ambas especies se caracterizaron por poseer una fórmula cromosómica idéntica. Podría argumentarse que *H. obscurus* también desarrolla el sistema genético de heterocromatización de un set cromosómico. En todos los machos de ambas especies se observó un tipo de masa heterocromática acompañada de numerosos puntos heteropícnóticos en células interfásicas y de siete cromosomas en células metafásicas. Además, las manchas heteropícnóticas observadas en interfase no necesariamente corresponden a centrómeros, debido a

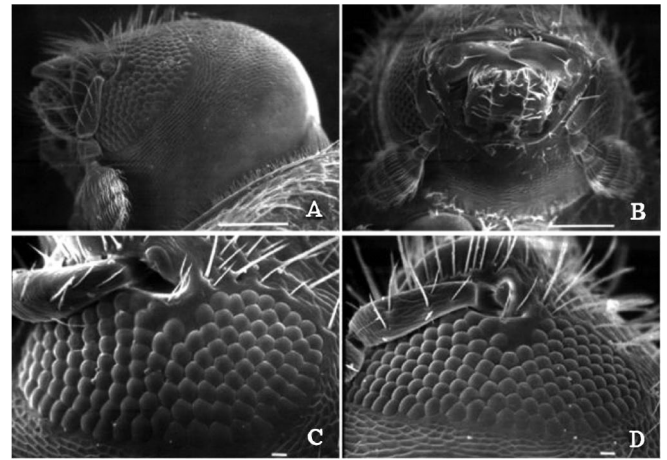


Figura 3. A. Cabeza en vista lateral de *Hypothenemus hampei*, escala= $100\mu\text{m}$, 230X; B. Aparato bucal de *H. hampei*, escala $100\mu\text{m}$, 230X; C. Ojo compuesto de *H. hampei* mostrando el número de omatidias, escala= $10\mu\text{m}$, 500X; D. Ojo compuesto de *H. obscurus*, escala= $10\mu\text{m}$, 500X.

que el número de manchas sobrepasa en muchas ocasiones al número de centrómeros presentes en *Hypothenemus*. En general, entre *H. hampei* y *H. obscurus* no se lograron observar diferencias cromosómicas evidentes, esto indicaría que las diferencias citogenéticas entre estas dos especies yacen a un nivel estructural muy fino y que su divergencia evolutiva radica en rearrreglos cromosómicos muy pequeños, tales como microdeleciones, microduplicaciones, microinversiones, o incluso efectos epigenéticos dados por modificaciones en la estructura de la cromatina independientes de la secuencia del ADN.

La haplodiploidía verdadera (arrenotoquia) ha sido documentada dentro de la subfamilia Scolytinae en las tribus Xyleborini y Dryocoetini (Kirkendall 1993), representando al menos el 70% de las especies de esta subfamilia. Sin embargo, la haplodiploidía funcional en Scolytinae ahora podría ser descrita en una especie más: *H. obscurus*, (Cryphalini), sumándose a la Broca del Café. Todas las especies haplodiploides en Scolytinae, incluyendo las especies del género *Hypothenemus*, comparten varias características ecológicas y reproductivas como la endogamia extrema, relación sexual basada en las hembras, machos desprovistos de alas y de-

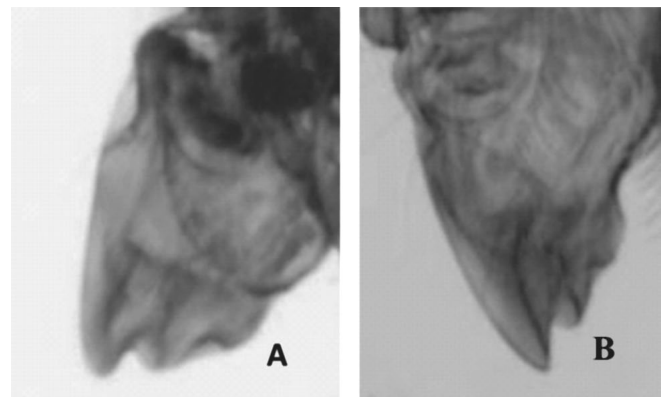


Figura 4. Mandíbula izquierda de una hembra adulta. A. *Hypothenemus hampei*. B. *Hypothenemus obscurus*.

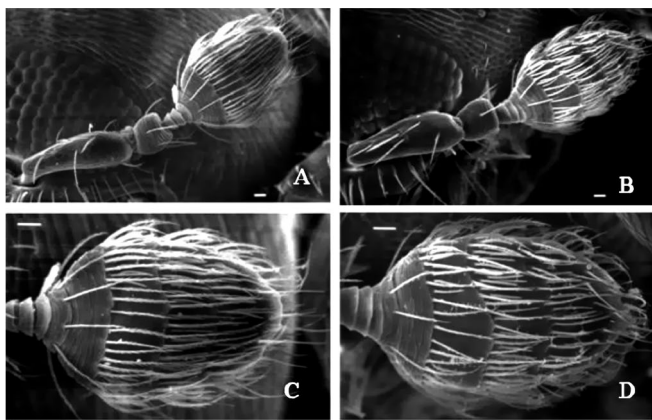


Figura 5. Antena de hembras de *Hypothenemus obscurus* A. y *Hypothenemus hampei* B. Escala = 10µm a 400X. Porra de la antena de *H. obscurus* C y *H. hampei* D. Escala = 10µm a 800X.

sarrollo de vida en galerías construidas en diversos órganos vegetales (Kirkendall 1993). Análisis filogenéticos proponen que la haplodiploidía bajo arrenotoquia evolucionó una sola vez dentro de Scolytinae para conformar un clado claramente reconocible; Xyleborini y Dryocoetini (Normark *et al.* 1999). Basados en esta hipótesis, la haplodiploidía funcional pudo aparecer una vez en la tribu Cryphalini dentro de un clado formado por los géneros *Hypothenemus*, *Cryptocarenus*, *Trischidias* y *Periocryphalus* (en Cryphalini se describen cerca de 25 géneros), conocidos como endogámicos y con radios sexuales basados en las hembras (Wood 2007). A pesar que en *Cryptocarenus*, *Trischidias* y *Periocryphalus* no existen datos citogenéticos que soporten la haplodiploidía funcional, es probable que este sistema genético esté presente en estos géneros dado que comparten las características ecológicas y reproductivas con otras especies haplodiploides en Scolytinae (Vega *et al.* 2002).

Desarrollo de perfiles genéticos de *H. obscurus* y *H. hampei*. Las especies compartieron el 14,9% de los 254 marcadores generados con las combinaciones evaluadas; sin

embargo, el agrupamiento generado a partir del análisis de distancia realizado bajo el algoritmo de UPGMA, identificó las especies. El índice de similitud de Jaccard se calculó utilizando la información generada mediante AFLP, encontrando valores de similitud de tan solo 0,184/1,0, los cuales son bastante bajos y comunes en individuos de especies distintas (Fig.10).

Conclusiones

A pesar de que *H. hampei* y *H. obscurus* provienen de diferentes centros de origen, África y América, y que atacan diferentes cultivos de importancia económica como son café y macadamia, la similitud en sus características morfológicas, biológicas y genéticas son sorprendentes. Los estudios morfológicos entre los adultos de estas dos especies permitieron identificar caracteres no documentados previamente (Vélez 1997; Wood 2007); el número de estrias longitudinales en los élitros, la cantidad de omatidios en los ojos compuestos, las espinas en las tibias de las patas protorácicas y la forma de los dientes en las mandíbulas, se convierten en caracteres diagnósticos de estas especies. A nivel biológico, se documentó el modo de alimentación y penetración de las hembras de *H. obscurus* en frutos de macadamia, el cual controvierte los reportes previos (Jones *et al.* 1992; Villegas 1998). Se determinó en este estudio el ciclo de vida completo de *H. obscurus*, por primera vez en una dieta artificial de macadamia, en condiciones de laboratorio. Se confirman los hábitos polífagos de *H. obscurus* y monófagos de *H. hampei*. A nivel genético, aunque los perfiles genéticos indicaron clara diferenciación de especies, ninguna especie evidenció partenogénesis; los estudios citogenéticos y reproductivos documentados aquí por primera vez para *H. obscurus*, indican que son similares a los reportados para *H. hampei*, como el número y estructura cromosómica, la condensación de un juego cromosómico en los machos, pseudoarrenotoquia y un alto grado de endogamia.

El estudio de una especie tan cercana a la Broca del Café es importante para determinar las condiciones biológicas y genéticas que la llevaron a adquirir una alta especialización al cultivo del café. Las diferencias entre estas especies yacen en caracteres moleculares mínimos que han ofrecido respuestas

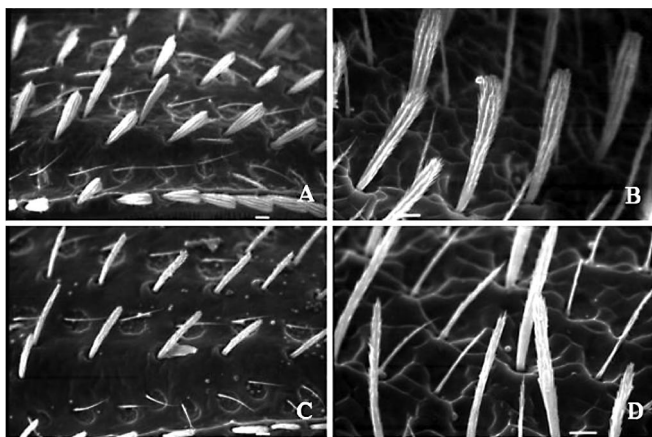


Figura 6. A. Setas de los élitros de *Hypothenemus obscurus*. Escala = 10µm a 500X. B. Setas en el pronoto de *H. obscurus*. Escala = 10µm a 950X. C. Setas de los élitros de *H. hampei*. Escala = 10µm a 500X. D. Setas en el pronoto de *H. hampei*. Escala = 10µm a 950X.

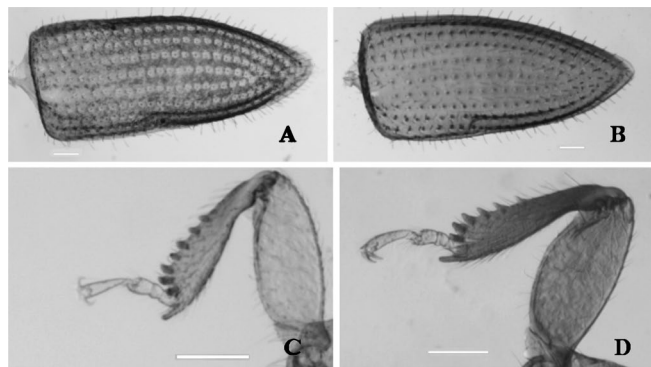


Figura 7. A. Élitro derecho de una hembra de *Hypothenemus obscurus* con 10 interestrias y 9 estrias dispuestas longitudinalmente. B. Élitro derecho de una hembra de *H. hampei* con 11 interestrias y 10 estrias dispuestas longitudinalmente. C. Pata protorácica de *H. obscurus* con 8 espinas tibiales. D. Pata protorácica de *H. hampei* con 7 espinas tibiales. Escala = 0,1mm, 40X, 80X.

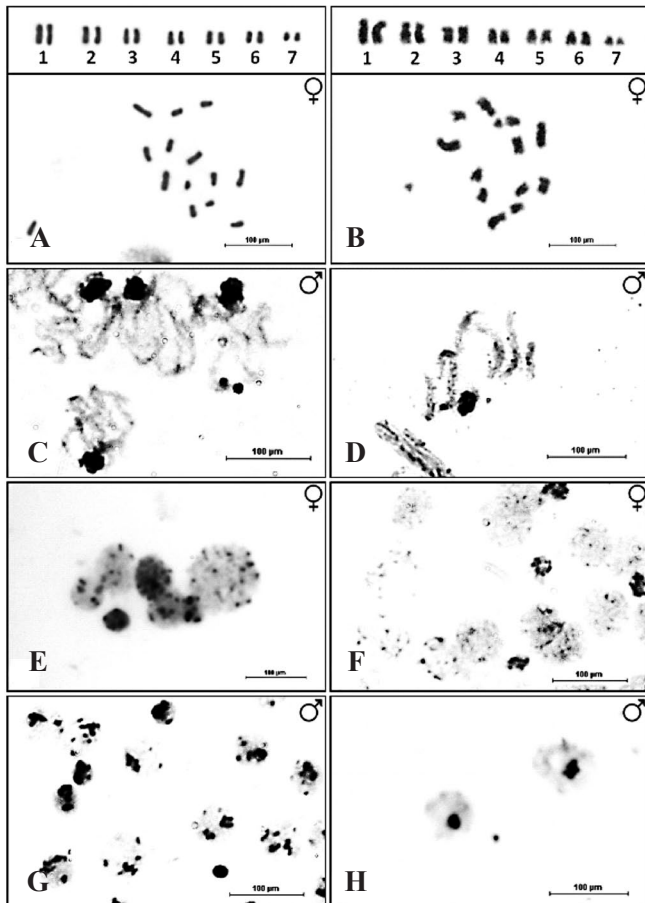


Figura 8. Patrones de condensación de cromatina en células de *Hypothenemus hampei* y *H. obscurus*. Metáfase y cariotipo en hembras de *H. hampei* A. y *H. obscurus* B. prometáfase en machos de *H. hampei* C. y *H. obscurus* D. Interfases en hembras de *H. hampei* E. y *H. obscurus* F. Interfases en machos de *H. hampei* G. y *H. obscurus* H. Escala=100µm

adaptativas y evolutivas complejas. Le proseguirá a esta investigación el análisis de la expresión génica de ambas especies criadas en café para identificar los genes y rutas metabólicas necesarias en la broca durante su desarrollo y reproducción sobre granos de café, paso intermedio en la exploración de nuevas estrategias de control genético y etológico para el manejo de ambas plagas.

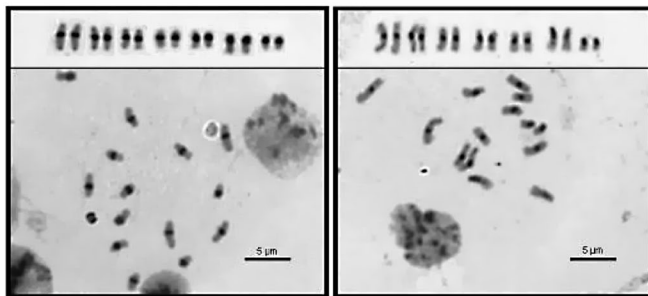


Figura 9. Bando-C para detectar la heterocromatina constitutiva en células de *Hypothenemus hampei* y *Hypothenemus obscurus*. A. Metáfase y cariotipo en hembras de *H. hampei*; y B. *H. obscurus*.

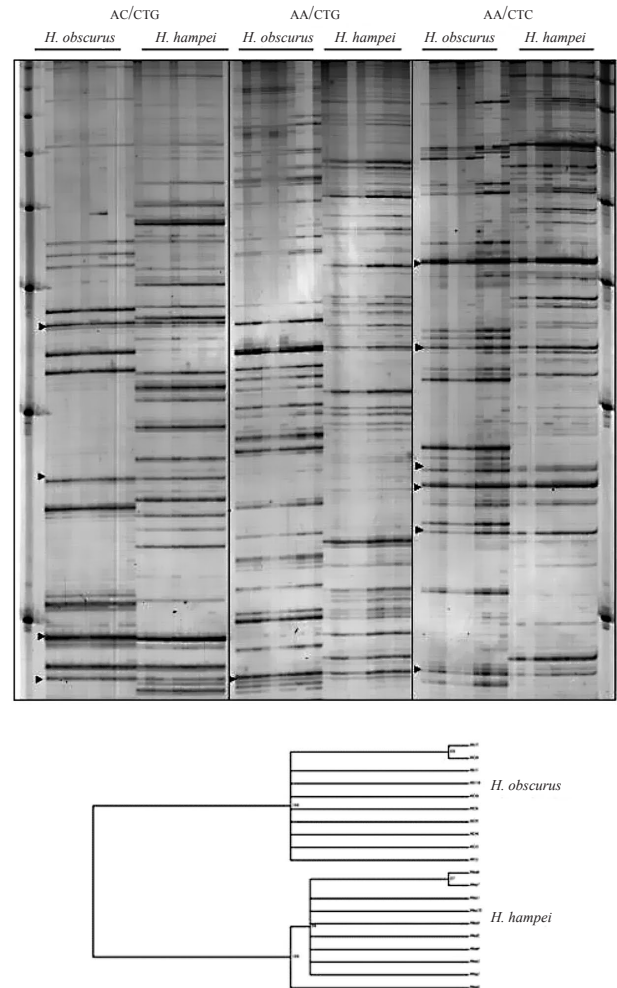


Figura 10. A. Perfiles AFLP de *Hypothenemus hampei* e *Hypothenemus obscurus* con tres combinaciones de cebadores específicos *Eco RI/Mse I*, (AC/CTG, AA/CTG, AA/CTC). Las flechas indican bandas compartidas. B. Dendrograma con el análisis de distancia realizado bajo el algoritmo de UPGMA mediante el índice de similitud de Jaccard para *H. obscurus* y *H. hampei*.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a Jhon Jairo García, Disciplina de Entomología, CENICAFE por la ayuda en el mantenimiento de las crías de broca, al Dr. Juan Carlos Herrera y a Gloria Camayo, Disciplina de Mejoramiento Genético, CENICAFE por su asistencia en las fotografías microscópicas de citogenética, a Walforth Sánchez y Diego Montoya, subestación experimental Paraguaicito por la consecución de adultos de Falsa Broca, a Juan Carlos Ortiz, CENICAFE, por su asistencia en la toma de fotografías de luz, a José A. Arroyave, CIAT, por la toma de las fotografías de microscopía electrónica de barrido y a dos evaluadores anónimos por sus valiosas sugerencias que contribuyeron a mejorar el manuscrito final. Este estudio fue co-financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Literatura citada

ALONZO-PADILLA, F. 1984. El problema de la broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) y la caficultura.

- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 242 p.
- ALVAREZ, J.H.; CORTINA, H. 2004. ¿Presenta partenogénesis *Hypothenemus hampei* (Coleoptera:Curculionidae: Scolytinae)? Fitotecnia Colombiana 4(1): 107-111.
- ARCILA, J.P. 2007. Factores que determinan la productividad del cafetal. Capítulo 3, pp. 62-86. En: Arcila, J.P.; Farfán, F.; Moreno, A.; Salazar, L.F.; Hincapié, E. (eds.) Sistemas de producción de café en Colombia. FNC- Cenicafe, Chinchiná (Colombia). 309 p.
- BARRERA, J.F.; GOMEZ, J.; ALAUZET, C. 1995. Can the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) reproduce by parthenogenesis? Entomologia Experimentalis et Applicata 77: 351-354.
- BASSAM, B. J.; ANOLLÉS, G. C.; GRESSHOFF, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196: 80-83.
- BEARDSLEY, J.W. 1990. *Hypothenemus obscurus* (Fabricius) (Coleoptera: Scolytidae), a new pest of macadamia nuts in Hawaii. Proceedings of the Hawaiian Entomological Society 30: 147-150.
- BENAVIDES, P. 2008. Aspectos genéticos relacionados con la Broca del Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), Capítulo 17, pp. 284 -297. Editor A. E. Bustillo P. En: Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. FNC - Cenicafe, Chinchiná (Colombia). Editorial Blanecolor Ltda., Manizales, 466 p.
- BORSA, P.; KJELLBER, G. F. 1996. Allozyme variation and an estimate of the inbreeding coefficient in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Bulletin of Entomological Research 85: 21-28.
- BRUN, L. O.; STUART, J.; GAUDICHON, V.; ARONSTEIN, K.; FRENCH-CONSTANT, R.H. 1995. Functional haplodiploidy: a mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92 (21): 9861-9865.
- BUSTILLO, A. E. 2006. Una revisión sobre la Broca del Café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Revista Colombiana de Entomología 32 (2): 101-116.
- BUSTILLO, A. E. 2008. La Broca del Café, pp. 387-418. Editor A. E. Bustillo. En: Los Insectos y su manejo en la caficultura colombiana. FNC- Cenicafe, Chinchiná (Colombia) Editorial Blanecolor Ltda, Manizales, 466 p.
- CAMARGO, M.; DUQUE-CORREA, M.A.; BERRÍO, A. 2006. A micro-spreading improvement for spermatogenic chromosomes from Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 101 (3): 339-340.
- DUQUE, H.; CHAVES, B. 2000. Estudio sobre la adopción del manejo integrado de la Broca del Café. Cenicafe, Chinchiná, Colombia. 90 p.
- JONES, V.P.; BURNAB-LARISH, L.; CAPRIO, L.C. 1992. Effect of harvest interval and cultivar on damage to macadamia nuts caused by *Hypothenemus obscurus* (Coleoptera: Scolytidae). Journal of Economic Entomology 85 (5): 1878-1883.
- KIRKENDALL, L. R. 1993. Ecology and evolution of biased sex ratios in bark and ambrosia beetles, pp. 235-345. En: Wreesh, D. L.; Mercedes, A. E. (eds). Evolution and Diversity of Sex Ratio in Insects and Mites. Chapman & Hall. New York. USA. 630 p.
- MABLE, B. K.; OTTO, S. P. 1998. The evolution of life cycles with haploid and diploid phases. BioEssays 20: 453-462.
- MONTOYA, A. S. 1992. Ciclo de vida de la broca *Hypothenemus hampei* sobre frutos en diferentes estados de desarrollo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. 78 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
- MONTOYA, A.S.; CARDENAS, R. 1994. Biología de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en frutos de café de diferentes edades. Revista Cenicafe 45: 5-13.
- MUÑOZ, R. 1989. Ciclo biológico y reproducción partenogenética de la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Turrialba 39 (3): 415-421.
- NELSON-REES, W. A.; HOY, M. A.; ROUSH, R. T. 1980. Heterochromatinization, chromatin elimination and haploidization in the parahaploid mite *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acarina: Phytoseiidae). Chromosoma 77: 263-276.
- NORMARK, B. B.; JORDAL, B. H.; FARRELL, B. D. 1999. Origin of a haplodiploid beetle lineage. Proceedings of the Royal Society of London Biological series 266: 2253-2259.
- NUR, U. 1980. Evolution of unusual chromosome system in scale insects (Coccoidea: Homoptera), pp. 97-117. En: Blackman, R. L.; Hewitt, G. M.; Ashburner, M. (eds). Insect Cytogenetics. Xth Symposia of the Royal Entomological Society of London. Blackwell Scientific Publications. Oxford. UK. 437 p.
- O'NEILL, S.L.; HOFFMANN, A. A.; WERREN, J. H. 1997. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, New York. 214 p.
- PERROT-MINNOT, M. J.; LAGNEL, J.; MIGEON, A.; NAVAJAS, M. 2000. Tracking paternal genes with DALP markers in a pseudoarrhenotokous reproductive system: biparental transmission but haplodiploid-like inheritance in the mite *Neoseiulus californicus*. Heredity 84: 702-709.
- PORTILLA, M. 1999. Desarrollo y evaluación de una dieta artificial para criar masivamente *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Cenicafe 50 (1): 24-38.
- ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences 250 (1328): 91-98.
- RUBIO, J. D. 2003. Aspectos morfológicos de la Broca del Café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), una búsqueda de estructuras de mycangia. Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuaria. 182 p (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. Plant Systematics and Evolution 134: 293-297.
- SCHULTEN, G. G. 1985. Pseudoarrhenotoky, pp. 67-71. En: Helle, W.; Sabelis M. W. (eds). Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control World Crop Pests. Vol. 1B. Elsevier. Amsterdam. Holanda. 458 p.
- VEGA, F.E.; BENAVIDES, P.; STUART, J.; O'NEILL, S. 2002. *Wolbachia* infection in the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). Annals of the Entomological Society of America 95:374-378.
- VEGA, F.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; JARAMILLO, J. 2009. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. Terrestrial Arthropod Reviews 2: 129-147.
- VELEZ, R.A. 1997. *Hypothenemus hampei* (Ferrari) Coleoptera: Scolytidae, pp. 169-181. En: Plagas Agrícolas de Impacto económico en Colombia: Bionomía y manejo integrado. Editorial Universitaria de Antioquia. Medellín. Colombia. 455 p.
- VILLEGAS, C. 1998. Manejo de insectos y ácaros asociados a las estructuras reproductivas de la macadamia. Cenicafe, Avances Técnicos No. 250. Chinchiná. Colombia. 8 p.
- VILLEGAS, C.; SANCHEZ, W. 2008. Estudio de los hemipteros plaga en el cultivo de la macadamia. Sus enemigos naturales y alternativas de manejo. FNC- Cenicafe, Chinchiná (Colombia) Editorial Blanecolor Ltda, Manizales, 32 p.
- VILLACORTA, A.; BARRERA, J. 1993. Dieta merídica para críacao de sucesivas geracoes de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 14(2):316-319.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23 (21): 4407- 4414.
- WOOD, S.L. 2007. Bark and Ambrosia Beetles of South America (Coleoptera: Scolytidae). Monte L. Bean Science Museum, Brigham Young University, Provo, Utah. 900 p.

Inhibidores de proteasas de plantas efectivos contra las aspártico proteasas de *Hypothenemus hampei*

Plant protease inhibitors effective against aspartic proteases from Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*)

DIANA MOLINA V¹, ALEJANDRO BLANCO-LABRA² y HUMBERTO ZAMORA E.³

Resumen: La broca del café (*Hypothenemus hampei*), produce las pérdidas económicas más graves al cultivo de café (*Coffea arabica*). En extractos proteínicos de insectos adultos se identificaron aspártico proteasas las cuales mostraron dos bandas de actividad proteolítica en los zimogramas y una actividad máxima a pH 2,5 en los ensayos espectrofotométricos. Esta enzima se clasificó como cathepsina D considerando su inhibición por pepstatina A y la hidrólisis de hemoglobina. Para encontrar inhibidores de las aspártico proteasas de *H. hampei*, se evaluaron extractos proteínicos de semillas de plantas no-huésped como: *Lupinus bogotensis*, *Brachiaria humidicola*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus coccineus*, *Hyptis suaveolens*, *Centrosema pubescens* y *Trifolium repens*. El extracto proteínico de *L. bogotensis* produjo la mayor inhibición de las aspártico proteasas con una actividad específica de 74,1 UI/mg; en comparación con los extractos de *H. suaveolens*, *B. humidicola* y *A. hypochondriacus* que presentaron una inhibición menor de las aspártico proteasas. Los demás extractos proteínicos no inhibieron la actividad aspártico proteasa. La actividad proteolítica de *H. hampei* se inhibió en un 90% con 100 µg del extracto crudo de *L. bogotensis*, mientras que se necesitó 1 mg de extracto crudo de *H. suaveolens* y *B. humidicola* para inhibir la actividad en 70 y 60%, respectivamente. Los zimogramas identificaron posibles inhibidores de proteasas en los extractos de *L. bogotensis*, *H. suaveolens*, *B. humidicola* y *A. hypochondriacus* que bloquearon *in vitro* la actividad de las aspártico proteasas del insecto. La expresión de genes de inhibidores de proteasas en café es una alternativa para obtener variedades resistentes.

Palabras clave: *Lupinus bogotensis*. Leguminosae. Inhibidor de aspártico proteasa. Aspártico proteasa. *Hypothenemus hampei*.

Abstract: The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, is one of the most devastating coffee pests (*Coffea arabica*). Aspartic proteases were identified in protein extracts of adult insects, showing two bands of proteolytic activity in zymograms and a maximum activity at pH 2.5 in the spectrophotometric assays. Considering its inhibition by pepstatin A and hemoglobin hydrolysis this enzyme was classified as cathepsin D. Seeds extracts of *Lupinus bogotensis*, *Brachiaria humidicola*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus coccineus*, *Hyptis suaveolens*, *Centrosema pubescens*, and *Trifolium repens* were evaluated to identify aspartic protease inhibitors. The greatest inhibitory activity of aspartic proteases was found in *L. bogotensis* extract with a specific activity of 74.1 IU/mg, compared with extracts of *H. suaveolens*, *B. humidicola*, and *A. hypochondriacus* that showed a lower inhibition of aspartic proteases. Other protein extracts did not inhibit aspartic protease activity. The proteolytic activity of *H. hampei* was inhibited by 90% with 100 µg of crude extract of *L. bogotensis*, whereas it took 1 mg of crude extract of *H. suaveolens* and *B. humidicola* to inhibit the activity at 70 and 60% respectively. The zymograms identified potential protease inhibitors in extracts of *L. bogotensis*, *H. suaveolens*, *B. humidicola* and *A. hypochondriacus* that blocked *in vitro* activity of aspartic proteases of the insect. The expression of protease inhibitor genes in coffee is an alternative to obtain resistant varieties.

Key words: *Lupinus bogotensis*. Leguminosae. Aspartic protease inhibitor. Aspartic protease. *Hypothenemus hampei*.

Introducción

El café (*Coffea* spp., Rubiaceae) es el producto agrícola más importante en 70 países de la región tropical húmeda (Jaramillo *et al.* 2006). En Colombia, el cultivo de café representa el 12,4 % del producto interno bruto agropecuario (MADR-IICA-OAC 2008). La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) es el insecto plaga que causa las mayores pérdidas económicas al café; debido a que se alimenta del endospermo disminuyendo el rendimiento y alterando la calidad del grano (Duque y Baker 2003; Bustillo 2008).

Muchos caficultores controlan *H. hampei* con insecticidas como endosulfán, clorpirifos, pirimifos metil y fenitrotion (Villalba *et al.* 1995). La creciente preocupación ambiental y el incremento de la resistencia de *H. hampei* a los insecti-

cidas (Navarro *et al.* 2010), han estimulado la búsqueda de estrategias de control amigables con el ambiente (Jaramillo *et al.* 2006). Entre estas estrategias, diversas proteínas vegetales tienen potencial para el control de insectos incluyendo las lectinas, los inhibidores de proteasas (IPs), los inhibidores de α -amilasas y las proteínas de almacenamiento de las semillas, vicilinas, leguminas y arcelinas (Macedo *et al.* 2007; Prasad *et al.* 2010; Barbosa *et al.* 2010; Sales *et al.* 2005).

La habilidad de los IPs para interferir con el crecimiento y desarrollo de insectos se atribuye a su capacidad para impedir el acceso al sustrato, reduciendo la disponibilidad de aminoácidos de las proteínas ingeridas Ryan (1990); y en algunos casos ocasionando la muerte, como el inhibidor de tripsina Kunitz de soja sobre el coleóptero *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Franco *et al.* 2004). Los IPs se clasifican según la enzima digestiva con la que interactúan en

¹ Investigador Científico Ph.D. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), Disciplina de Mejoramiento genético, Plan Alto Km. 4 - vía antigua a Manizales, Chinchiná, Caldas, Colombia. Diana.molina@cafedecolombia.com. Autor para correspondencia. ² Investigador titular Ph.D. Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) Unidad Irapuato, Km 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato - León, C.P. 36821 Irapuato, Guanajuato, México. ablanco@ira.cinvestav.mx. ³ Profesor asociado Ph.D. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 #45-03, Ciudad universitaria, Bogotá, Cundinamarca, Colombia. hmzamora@unal.edu.co

serín, cisteín, aspártico, metalo, glutámico y treonín proteasa (Laskowski *et al.* 2003). Según, Molina *et al.* (2010) la digestión en el intestino medio de *H. hampei* es facilitada por aspártico proteasas activas al pH ácido de esa región corporal (Ossa *et al.* 2000). De acuerdo con esta información, la inhibición de las aspártico proteasas es un mecanismo de defensa promisorio para el control de este coleóptero.

Todas las plantas tienen algún nivel de resistencia endógena al ataque por insectos plaga. Sin embargo, como resultado de la co-evolución los insectos se adaptan a los mecanismos de defensa de las plantas por evasión o detoxificación (Gatehouse 2002). Por ejemplo, los coleópteros se alimentan de leguminosas que tienen un alto contenido de compuestos tóxicos, mientras que otros insectos no utilizan estas semillas como fuente de alimento (Sales *et al.* 2005). Además, los insectos comprometen las estrategias de defensa de las plantas usando sus mecanismos de señalización, es así como *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) emplea las moléculas de señalización, jasmonato y salicilato de las plantas huésped, para activar cuatro de sus genes citocromo P450, facilitando la inducción de sus enzimas de detoxificación de manera rápida y específica (Li *et al.* 2002). Esta asociación es altamente específica, por esto semillas de muy pocas especies sirven de alimento a un insecto particular (Gatehouse 2002).

La co-evolución de *H. hampei* y el género *Coffea* sugiere que es necesario evaluar el efecto de IPs de plantas no huésped como leguminosas y solanáceas, en las cuales se han identificado IPs efectivos contra insectos (Sumikawa *et al.* 2010; Tamhane *et al.* 2007). Recientemente se identificó el primer inhibidor de aspártico proteasa de *Lupinus bogotensis* (LbAPI) que tiene una identidad de 76% con vicilinas de las semillas de *Lupinus albus* (Linnaeus, 1753). Esto sugiere que los IPs de aspártico proteasas son proteínas multifuncionales que actúan como proteínas de almacenamiento de las semillas, inhiben aspártico proteasas, y también pueden unirse a las estructuras que contienen quitina en el intestino medio de coleópteros como *H. hampei* (Molina *et al.* 2010). Sin embargo, para conseguir resistencia durable contra un insecto es necesario utilizar varios IPs, por esto el objetivo de este trabajo es la identificación de inhibidores de las aspártico proteasas en plantas no huésped y sus variaciones en especificidad contra las proteasas digestivas de *H. hampei*.

Materiales y Métodos

Materiales. Se evaluaron semillas de cinco plantas de la familia Fabaceae: *L. bogotensis* (Benth, 1845), *Centrosema pubescens* (Benth, 1839), *Trifolium repens* (Linnaeus, 1753), *Phaseolus acutifolius* (Gray, 1852) y *Phaseolus coccineus* (Linnaeus, 1753) y de una planta de la familia Poaceae: *Brachiaria humidicola*; estas semillas se adquirieron en la empresa Semicol (Bogotá, Colombia). También se probaron semillas de una Amaranthaceae: *Amaranthus hypochondriacus* (Linnaeus, 1753), y una Lamiaceae: *Hyptis suaveolens* (L., Poit. 1806), suministradas por el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Irapuato, México.

Los insectos adultos de la broca del café proporcionados por la unidad de cría de Cenicafe (Chinchiná, Colombia), se criaron en café pergamino seco con una humedad de 45% y se mantuvieron bajo condiciones controladas a una temperatura de 27°C con una humedad relativa del 65-75%; los insectos empleados para la extracción estaban recién emergidos de las semillas de café.

Se utilizaron reactivos grado analítico, NaCl, HCl, cloroformo, metanol y ácido acético de Merck (Darmstadt, Germany). La hemoglobina bovina, albúmina sérica bovina (BSA), pepsina (EC 3.4.23.1), pepstatina A, tripsina (EC 3.4.21.4), N α -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE), fenilmetilsulfonilo fluoruro (PMSF), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), trans epoxisuccinilo-L-leucilo-amida (4) guanidino butano (E-64), Tris, dodecil sulfato de sodio (SDS), glicerol, casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La solución de Bradford, la solución de acrilamida-bis-acrilamida, persulfato de amonio de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). La resina de exclusión Bio-Gel® P-6DG empacada en una columna Econo-Pac® 10DG de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Las membranas de ultrafiltración de 30 kDa (Amicon, Millipore) y el dispositivo de filtración centrífuga Centriprep®, membrana Ultracel YM-3, límite de peso molecular nominal 3 kDa (Amicon, Millipore) (Beverly, MA, USA). Las membranas de diálisis de 3,5 kDa (Spectra/Por®) (Broadwick Street, CA, USA).

Extracción de las aspártico proteasas de *H. hampei* (APH). Para la extracción de las aspártico proteasas se maceraron 100 g de insectos adultos en 0,2 M de búfer succínico pH 6,0 en una relación 1:5 p/v a 4°C. El homogeneizado se centrifugó a 9.500 g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se dializó tres veces cada seis horas contra 5 l de H₂O con 100 ml de búfer succínico 50 mM pH 6,0 utilizando una membrana de 3,5 kDa (Spectra/Por®), el dializado se liofilizó y se utilizó como fuente de aspártico proteasas.

Ensayos de actividad inhibitoria. La actividad proteolítica de las aspártico proteasas de *H. hampei* y pepsina se determinó evaluando la hidrólisis de hemoglobina a 280 nm en 0,2 M de búfer citrato, 0,1 M NaCl pH 2,5 (Lenney 1975). El extracto proteínico se incubó con 1,3 ml de hemoglobina al 1% como sustrato. Después de dos horas se adicionaron 2,5 ml de Cl₃CO₂H 0,34 N para detener la reacción. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza un incremento en 0,01 unidades de absorbancia. El inhibidor se incubó con el extracto proteínico de *H. hampei* durante 15 min (Lenney 1975). Una unidad de inhibición se definió como la diferencia entre las actividades proteolíticas medidas en ausencia y presencia del inhibidor. Las variables medidas fueron: las unidades de inhibición por ml de extracto (UI ml⁻¹), las unidades de inhibición por gramo de tejido (UI g⁻¹), las unidades de inhibición totales (UI) y la actividad específica, unidades de inhibición por miligramo de tejido (UI mg⁻¹). Se evaluó la inhibición de las aspártico proteasas por E-64 (Oliveira *et al.* 2002); EDTA; PMSF (Schwartz y Takenaka 1955) y pepstatina A (Lenney 1975). Una concentración final de 1 μ M se utilizó para todos los inhibidores con la excepción de pepstatina A, el cual se usó en una concentración final de 1 μ M.

Electroforesis en gel de poliacrilamida. La electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se realizó según Schägger y von Jagow (1987). Las proteínas usadas como estándar de peso molecular fueron: miosina (210 kDa), β -galactosidasa (118 kDa), BSA (82 kDa), anhidrasa carbónica (40 kDa), inhibidor tripsina de soya (31 kDa), lisozima (17 kDa) y aprotinina (6 kDa). Las proteínas se detectaron por tinción con 0,1% de azul de Coomassie brillante G-250 por 30 min y la destinción se realizó con AcOH:H₂O (1:9, v/v) por 1 h.

Zimogramas. Para el zimograma de actividad proteolítica 20 mg de extracto proteínico del intestino medio de *H. hampei* se separaron en un gel nativo al 10%. El gel se incubó en una solución de hemoglobina al 1% en 0,2 M de búfer citrato pH 2,5 durante 1 h a 4°C. Después, se retiró el exceso de sustrato y el gel se incubó durante 4 h a 30°C. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 30 min, y se destiñó con AcOH:H₂O (1:9, v/v) por 1 h.

En el zimograma de inhibición se preincubaron 20 µg de extracto proteínico del intestino medio de *H. hampei* con 40 µg de los extractos de las semillas de *L. bogotensis*, *A. hypochondriacus*, *B. humicicola* e *H. suaveolens* durante 30 min a 30°C. Después, se siguió el mismo procedimiento descrito en el zimograma de actividad proteolítica.

Para el zimograma del inhibidor, los extractos crudos de las semillas se separaron por SDS-PAGE. El gel se incubó en una solución de 1% de hemoglobina bovina en 0,2 M de búfer citrato pH 2,5 durante 1 h a 4°C. Luego, el gel se lavó con H₂O desionizada y se incubó en una solución con 10 mg/ml de extracto proteínico de *H. hampei*, durante 4 h a 30°C. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 30 min, y se destiñó con AcOH:H₂O (1:9, v/v) por 1 h. Los inhibidores de aspártico proteasas se observaron como bandas azules sobre fondo claro, porque las aspártico proteasas digieren la hemoglobina presente en el gel, a excepción del lugar donde la banda (inhibidor) está localizado.

Actividad de APH en función del pH. Para determinar la actividad de las aspártico proteasas en función del pH, el extracto crudo de adultos de *H. hampei* (1 mg/ml) se incubó 30 min a 37°C con diferentes búfer (100 mM): citrato de sodio (pH 2 - 4), acetato de sodio (pH 5), fosfato de sodio (pH 6-7), Tris-HCl (pH 7,5). Después, se ajustó el pH a 2,5 para evaluar la actividad inhibidora contra las aspártico proteasas de *H. hampei* según Lenney (1975). Los resultados representan el promedio de tres pruebas independientes.

Identificación de los inhibidores de aspártico proteasas (IAP) en las semillas. Para la identificación de los IAP se realizaron ensayos enzimáticos y zimogramas. 200 g de las semillas secas se molieron en un molino criogénico marca Restch, la harina se tamizó a través de dos mallas de 1,4 mm y 0,85 mm en un separador estándar. La fracción más fina (150 g) se desgrasó en agitación durante 30 min en una mezcla de CHCl₃:MeOH (750 ml, 4:1, v/v); este proceso se repitió tres veces. La extracción de proteínas a partir de harina seca (100 g) se realizó en H₂O (500 ml) o 0,2 M de búfer succínico pH 4,5 por 6 h a 4°C. Con todas las semillas se utilizó una relación 1:5, p/v a excepción de *T. repens* con una relación de 1:10, p/v. La suspensión se clarificó por centrifugación a 7.500 g por 30 min a 4°C. El precipitado se descartó y la suspensión liofilizada de los extractos de las semillas se adicionaron a una columna de exclusión por tamaño Econo-Pac® 10DG, empacada con Bio-Gel P-6DG para eliminar pigmentos (Molina *et al.* 2010). La proteína del extracto proteínico se precipitó con 80% de (NH₄)₂SO₄. El precipitado se disolvió en búfer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, se dializó contra H₂O desionizada en una membrana de 3,5 kDa (Spectra/Por®) y se liofilizó. Las proteínas liofilizadas se disolvieron en 10 ml de búfer Tris-HCl 20 mM pH 8,0 para fraccionarlas por ultrafiltración con una membrana de 30 kDa. Las fracciones eluidas de la membrana de 30 kDa, que mostraron actividad inhibidora contra las aspártico proteasas de *H. hampei*,

se concentraron utilizando el dispositivo Centriprep®, límite de exclusión 3 kDa y se utilizaron como fuente de inhibidor. Se evaluó la actividad inhibidora de los extractos crudos de las semillas contra *H. hampei* siguiendo el método de Lenney (1975).

Determinación de proteína. La concentración de proteína se determinó por el ensayo de Bradford modificado por Zor y Selinger (1996) usando BSA como estándar.

Análisis estadístico. Para la determinación de las mejores condiciones de extracción de los IPs se utilizó un experimento multifactorial, los tratamientos evaluaron el empleo o no de desgrase y la extracción con agua o 0,2 M de búfer succínico pH 4,5, se utilizó un diseño experimental completamente al azar y el número de repeticiones 3. Para la identificación de la semilla que produce la mayor inhibición de las aspártico proteasas de *H. hampei* se realizó un experimento unifactorial, se utilizó un diseño experimental completamente al azar y el número de repeticiones 3. La unidad experimental fue un tubo conteniendo las aspártico proteasas de *H. hampei*, el inhibidor de aspártico proteasas, el sustrato y ácido tricloroacético.

A los experimentos se les aplicó un análisis descriptivo: se estimaron el promedio y la varianza para las unidades de inhibición totales (UI). Se comprobó la homogeneidad de varianza y se realizó el análisis de varianza, bajo un diseño completamente al azar. La comparación de medias se realizó mediante prueba de Duncan al 5%. Los datos se procesaron en un computador IBM con el programa SAS versión 9.1.

Resultados

Zimograma de las APH. Los zimogramas mostraron dos bandas de actividad aspártico proteasa en los extractos de intestinos (Fig. 1A) y de adultos completos de *H. hampei* (Fig. 1B), resultados similares registró Molina *et al.* (2010). También, Preciado *et al.* (2000) encontraron tres bandas de actividad proteolítica en el intestino medio y en brocas adultas. El hallazgo de actividad aspártico proteasa en el intestino medio confirmó su función digestiva. De acuerdo con estos resultados y considerando que *H. hampei* es de 0,8 a 0,7 mm de longitud (Bergamin 1943), se utilizaron extractos proteínicos de adultos completos, para obtener la cantidad suficiente de enzima para los ensayos de actividad proteolítica y de inhibición.

Actividad de las APH en función del pH. Las APH son activas a pH entre 2 a 5, con una actividad máxima a pH 2,5 (Fig. 1C). Una característica particular de este tipo de enzimas es su rango óptimo de actividad a pH entre 2 - 6 (Silva y Xavier-Filho 1991; Blanco *et al.* 1996; Wilhite *et al.* 2000; Liu *et al.* 2004; Valencia y Arboleda 2005), el cual coincide con el pH ácido del intestino medio de *H. hampei* (Ossa *et al.* 2000). La actividad de las APH se evaluó usando como sustrato hemoglobina y BSA, encontrando que las aspártico proteasas digirieron 100% de hemoglobina y 10% de BSA. Esto demostró que estas enzimas digestivas son catépsina D, como previamente registraron Valencia y Arboleda (2005).

Inhibición de la actividad de las APH por IPs. Pepstatina A en una concentración de 1 µM inhibió la actividad pro-

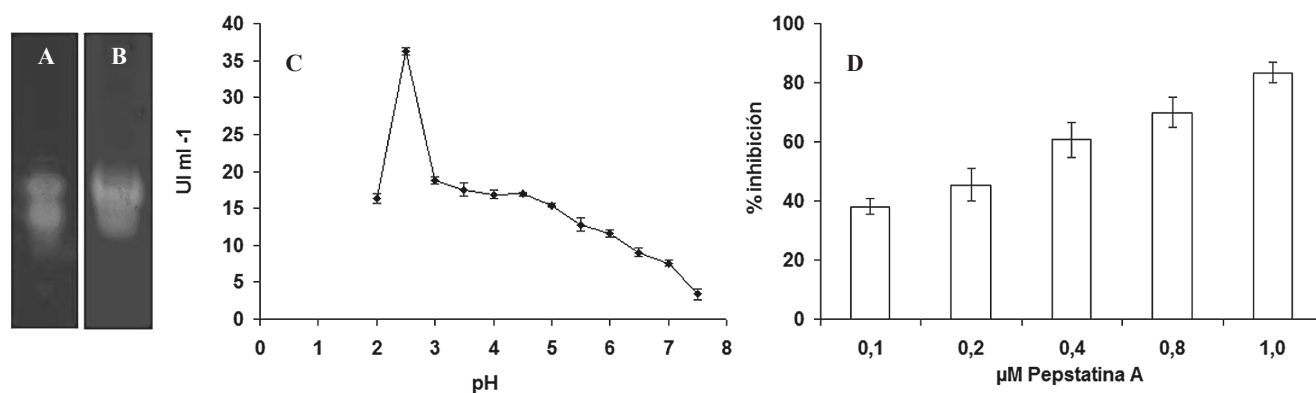


Figura 1. A. Zimograma del extracto crudo de intestino de *H. hampei* usando un perfil electroforético nativo al 10%. B. Zimograma de extracto crudo de insectos adultos de *H. hampei* usando un perfil nativo al 10%. C. UI ml⁻¹ de las APH en función del pH. D. Porcentaje de inhibición de la actividad APH en función de la concentración de pepstatina A (μM).

teolítica de *H. hampei* en 83,3% (Fig. 1D), al igual que lo registrado por Valencia y Arboleda (2005). Mientras que los inhibidores de serín proteinasa: PMSF (1mM), cisteín proteinasa: E-64 (1mM) y metaloproteinasa: EDTA (1mM), no inhibieron las enzimas digestivas del insecto. Esto confirmó la presencia de aspártico proteasas en el intestino medio.

Extracción de los IAP en las semillas de *L. bogotensis* y *B. humidicola*. El extracto acuoso de *L. bogotensis* con harina desgrasada presentó 8.764 UI y una actividad específica de 97,4 UI mg⁻¹, siendo esta inhibición significativamente superior al resto de los tratamientos, según la prueba de Duncan al 5%. Del mismo modo, el extracto acuoso de *B. humidicola* con harina desgrasada mostró la mayor inhibición de las APH con 2.426 UI son miles no decimas (Tabla 1). El empleo de harina desgrasada en la extracción con agua o con búfer succínico 0,2 M pH 4,5, aumentó significativamente la inhibición ($P<0,0001$) de las APH (4.284 UI) en comparación con la harina sin desgrasar (2.572 UI). Esto indica que la grasa interfiere con la determinación de la actividad inhibidora de las APH. La extracción de los IPs fue mejor con agua, obteniéndose una inhibición mayor de las proteasas de *H. hampei* (4.215 UI) que con búfer succínico 0,2 M pH 4,5 (2.641 UI). Con base en estos resultados se seleccionó la extracción de

los inhibidores de aspártico proteasas de harina desgrasada y agua en una relación 1:5, p/v.

Identificación de IAP en los extractos vegetales. 100 μg del extracto conteniendo los inhibidores de aspártico proteasas de *L. bogotensis* (IAPLb) disminuyeron en 100% y 90% la actividad de pepsina y de las APH, respectivamente (Fig. 2A); mientras que con *B. humidicola* e *H. suaveolens* se requiere 1 mg de extracto crudo para inhibir la actividad de las APH en 60% y 70%, respectivamente (Fig. 2B). Estos resultados son promisorios ya que se inhibió la actividad de las APH con una concentración muy baja de IAPLb.

El extracto de *L. bogotensis* produjo la mayor inhibición de las proteasas de *H. hampei* con 5.560 UI y una actividad específica de 74,1 UI mg⁻¹, en comparación con *H. suaveolens*, *B. humidicola* y *A. hypochondriacus* que fueron iguales, según la prueba de Duncan al 5% (Tabla 2). Los extractos proteínicos de *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *T. repens* y *C. pubescens* no inhibieron las aspártico proteasas de *H. hampei*. Las diferencias en la inhibición podrían deberse a la selectividad que los inhibidores de plantas han desarrollado para reconocer enzimas específicas de insectos, a la inactivación de los IPs por proteasas digestivas y a variaciones en afinidad entre los IPs y las enzimas digestivas (Ryan 1990).

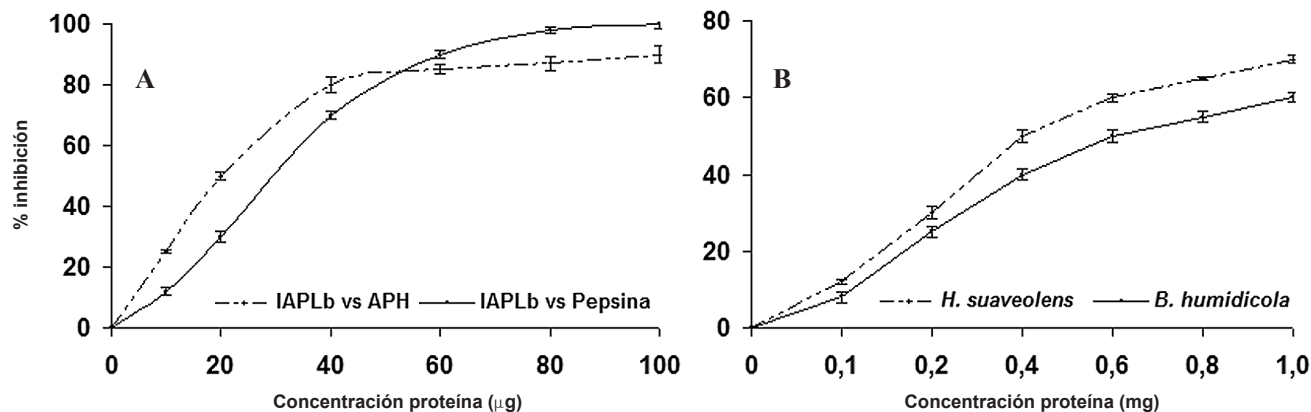


Figura 2. A. Porcentaje de inhibición de las APH y pepsina en función de la concentración de proteína (μg) de los IAPLb. B. Porcentaje de inhibición de las APH en función de la concentración de proteína (mg) del extracto de *B. humidicola* e *H. suaveolens*.

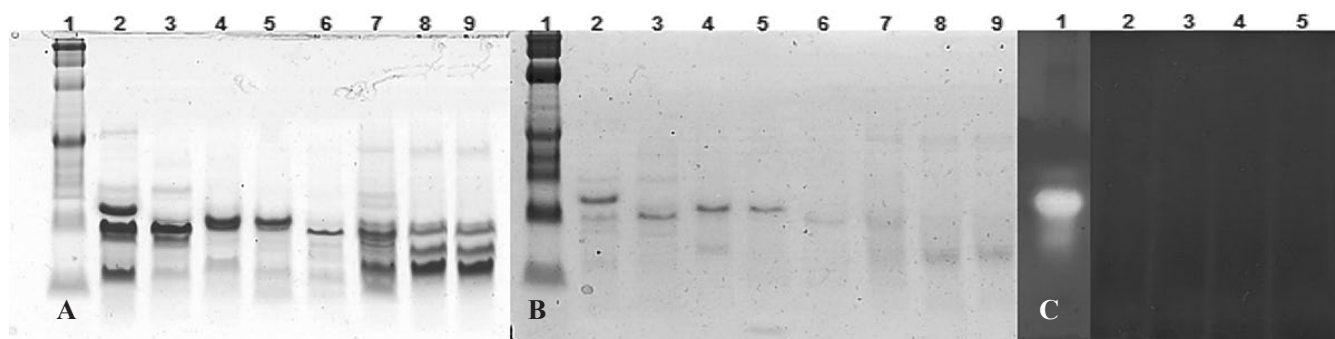


Figura 3. A. Separación electroforética de los extractos proteínicos de las semillas de plantas. B. Zimograma de los extractos proteínicos de las semillas de plantas, en condiciones denaturantes al 16%. 1. Marcador de peso molecular. 2. *B. humidicola*. 3. *H. suaveolens*. 4. *L. bogotensis*. 5. *A. hypochondriacus*. 6. *C. pubescens*. 7. *T. repens*. 8. *P. acutifolius*. 9. *P. coccineus*. C. Zimograma de inhibición de las APH por inhibidores de proteasas de los extractos proteínicos, usando electroforesis nativa al 10%. 1. Control, extracto de adultos de *H. hampei*. 2. *L. bogotensis*. 3. *B. humidicola*. 4. *H. suaveolens*. 5. *A. hypochondriacus*.

Zimogramas para la identificación de IAP. los zimogramas son determinaciones cualitativas, que se utilizaron para identificar las bandas de IPs en los extractos proteínicos, mientras que los ensayos de inhibición cuantifican la inhibición de las aspártico proteasas de *H. hampei* por los IPs de extractos de plantas. Valencia *et al.* (2007) usaron este método para la detección de inhibidores de α -amilasas de *Phaseolus vulgaris* (Linnaeus, 1753). La separación electroforética de los extractos proteínicos de las semillas mostró la presencia de bandas en un rango de masa molecular entre 6 a 30 kDa (Fig. 3A). El zimograma mostró que las bandas de proteína de *B. humidicola*, *H. suaveolens*, *L. bogotensis* y *A. hypochondriacus* son resistentes a la digestión por las APH del insecto; esto sugiere que son inhibidores tipo aspártico proteasa (Fig. 3B). Mientras que las proteínas de los extractos de *C. pubescens*, *T. repens*, *P. acutifolius* y *P. coccineus*, son digeridas por las aspártico proteasas de *H. hampei* y no actúan como IPs; confirmando los resultados de los ensayos de inhibición.

Zimograma de inhibición. En este zimograma (Fig. 3C) no se observaron las bandas de actividad proteolítica cuando se incubó el extracto de *H. hampei* con los inhibidores presentes en los extractos de *L. bogotensis*, *B. humidicola*, *H. suaveolens* y *A. hypochondriacus*, confirmando los resultados de los ensayos de inhibición. Esto indica que los IPs se unen al sitio activo de las aspártico proteasas inhibiendo su actividad, lo

cual se refleja en la desaparición de las dos bandas de actividad proteolítica.

Discusión

Para la identificación de inhibidores de las APH se utilizaron extractos proteínicos de insectos adultos que representan la actividad aspártico proteasa. De forma similar, extractos de las larvas del coleóptero *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) se emplearon para purificar la aspártico proteinasa tipo cathepsina D, debido a que los zimogramas mostraron actividad proteolítica en intestinos y larvas, demostrando la naturaleza digestiva de esta enzima (Blanco *et al.* 1996). En otra investigación se encontró que en *Prostephanus truncatus* (Horn, 1878) la actividad α -amilasa es mayor en larvas de segundo instar y en adultos (Mendiola *et al.* 2000). Además, la actividad de α -amilasa y de tripsina de *P. truncatus* fue más alta en adultos que en larvas; esto sugiere que es mejor utilizar adultos para evaluar el efecto de inhibidores de estas enzimas (Vásquez *et al.* 1999).

Las aspártico proteasas de *H. hampei* presentaron un rango óptimo de actividad a pH 2 a 5. De manera similar, otros coleópteros como *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775), *T. castaneum*, *P. truncatus*, *Hypera postica* (Gyllenhal, 1813), *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833), *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) y *Diabrotica virgifera* (LeConte,

Tabla 1. Actividad inhibidora de los IAPs de las semillas de *L. bogotensis* y *B. humidicola* contra las APH.

Especie	Tratamiento	Búfer	UI ml ⁻¹	Actividad inhibición total UI	Actividad específica UI mg ⁻¹
<i>L. bogotensis</i>	Desgrasado	Agua	219,1	8764 *	97,4
<i>L. bogotensis</i>	Desgrasado	B succínico 0.2 M pH 4.5	123,3	4314	47,9
<i>L. bogotensis</i>	Sin desgrasar	Agua	109,8	4391	48,8
<i>L. bogotensis</i>	Sin desgrasar	B succínico 0.2 M pH 4.5	88,4	3449	38,3
<i>B. humidicola</i>	Desgrasado	Agua	73,5	2426	27,0
<i>B. humidicola</i>	Desgrasado	B succínico 0.2 M pH 4.5	52,7	1633	18,1
<i>B. humidicola</i>	Sin desgrasar	Agua	42,7	1280	14,2
<i>B. humidicola</i>	Sin desgrasar	B succínico 0.2 M pH 4.5	34,3	1167	13,0

* = $p < 0.0001$.

Tabla 2. Actividad inhibidora de los IAPs de las semillas de *L. bogotensis*, *B. humidicola*, *A. hypochondriacus* e *H. suaveolens* contra las APH.

Especie	UI ml ⁻¹	Actividad inhibición total UI	UI g ⁻¹	Actividad específica UI mg ⁻¹
<i>L. bogotensis</i>	139,0	5560 A	556,0	74,1
<i>B. humidicola</i>	58,0	1380 B	138,0	18,6
<i>H. suaveolens</i>	29,6	1392 B	139,0	18,4
<i>A. hypochondriacus</i>	16,8	673,3 B	67,3	9,0

Promedios seguidos por la misma letra son iguales ($P < 0,0001$).

1868), que utilizan aspártico proteasas para la digestión de las proteínas del alimento, tienen una actividad proteolítica óptima en un rango de pH de 3 a 6 (Silva y Xavier-Filho 1991; Blanco *et al.* 1996; Vásquez *et al.* 1999; Wilhite *et al.* 2000; Lemos *et al.* 1990; Wolfson y Murdock 1987; Liu *et al.* 2004). En general, las aspártico proteasas se han encontrado en insectos de los ordenes hemiptera y coleóptero que se caracterizan por el pH ácido del intestino medio (Houseman y Downe 1983).

La presencia de aspártico proteasas en el intestino medio de *H. hampei* se confirmó por su inhibición con pepstatina A, este inhibidor ha sido utilizado para identificar aspártico proteasas en el intestino medio de varios coleópteros como *T. castaneum*, *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *H. hampei*, por la pérdida de la actividad proteolítica de la enzima (Blanco *et al.* 1996; Silva y Xavier-Filho 1991; Valencia y Arboleda 2005). La actividad aspártico proteasa del intestino medio de las larvas de *Z. subfasciatus* fue inhibida completamente con el empleo de 14 μ M de pepstatina A (Lemos *et al.* 1990). Del mismo modo, la actividad proteolítica del intestino medio de *H. postica* se redujo en 50% por la adición de pepstatina A y del inhibidor de catepsina D de papa (Mares *et al.* 1989). Mientras que el inhibidor de aspártico proteasas de calabaza (SQAPI), que inhibe pepsina pero no catepsina D (Christeller *et al.* 1998), no inhibió la actividad proteolítica de *H. postica*, esto confirmó que catepsina D es la principal aspártico proteinasa de este gorgojo (Wilhite *et al.* 2000).

Se concluye que las aspártico proteasas de *H. hampei* son de tipo catepsina D porque digieren casi exclusivamente hemoglobina. De forma similar, la enzima aislada de *T. castaneum* se clasificó como catepsina D porque digiere únicamente hemoglobina (Blanco *et al.* 1996). También, la aspártico proteinasa presente en el intestino medio de las larvas de *C. maculatus* es catepsina D porque digiere 100% de hemoglobina y 30% de BSA (Silva y Xavier-Filho 1991). Catepsina D es una de las aspártico proteasas mejor estudiadas en vertebrados y artrópodos; esta enzima es responsable de la digestión intracelular y extracelular de proteínas en el lumen del intestino medio de muchos coleópteros donde las cisteín proteasas son las enzimas digestivas más importantes (Ahn y Zhu-Salzman 2009). En *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) está involucrada en la producción de vitelogenina (Cho y Raickel 1992). En *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) su actividad coincide con la hidrólisis del cuerpo graso (Rabossi *et al.* 2004). En *Bombix mori* (Linnaeus, 1758) su acción en la muerte celular programada es clave en la metamorfosis para la transformación de pupa a larva (Lee *et al.* 2009). Esta enzima también participa en la digestión de la sangre en ácaros y garrapatas (Boldbaatar *et al.* 2006).

En *C. maculatus* y *Z. subfasciatus* las aspártico y cisteín proteasas son responsables de la digestión de las proteínas del alimento (Silva y Xavier-Filho 1991). Es probable que en *H. hampei* ambas enzimas son responsables de la proteólisis como ocurre en otros coleópteros, debido a que las cisteín proteasas son activas en un rango de pH entre 5 a 7, cercano al de *H. hampei*. El conocimiento del papel de los diferentes tipos de proteasas en el tracto digestivo del insecto, ayudará a entender los sitios de vulnerabilidad bioquímica, por esto es necesario continuar con la caracterización de las enzimas digestivas de la broca del café.

Las mejores condiciones para la extracción de los inhibidores de las aspártico proteasas de semillas de plantas fueron el empleo de agua y de harina desgrasada. La extracción con agua ha sido empleada para aislar inhibidores de *Cicer arietinum* (Linnaeus, 1753), *Gossypium arboreum* (Linnaeus, 1753), *Arachis hypogaea* (Linnaeus, 1753), *Psophocarpus tetragonolobus* (L., DC. 1825), *Solanum tuberosum* (Linnaeus, 1753), e *H. suaveolens* (Harsulkar *et al.* 1999; Giri *et al.* 2003; Aguirre *et al.* 2004). El procedimiento de desgrase se ha utilizado con éxito para la identificación y purificación de IPs en las semillas de *A. hypochondriacus*, *Inga laurina* (Sw., Willd. 1806), *Cicer echinospermum* (Davis, 1869), *A. hypogaea*, y *P. tetragonolobus* (Valdes *et al.* 1993; Rodríguez *et al.* 2007; Harsulkar *et al.* 1999).

Se identificaron inhibidores de las aspártico proteasas de *H. hampei* en las semillas de *L. bogotensis*, *B. humidicola*, *H. suaveolens* y *A. hypochondriacus*, estos IPs bloquean la digestión de las proteínas del alimento en el intestino medio y podrían utilizarse para el control del insecto. La broca del café es monófaga, sugiriendo que su mecanismo de defensa podría ser menos complejo y más vulnerable a la acción de IPs de plantas no-huésped que los insectos polífagos. Sin embargo, los estudios con IPs han mostrado que cuando se inhiben las proteasas más importantes para la digestión de las proteínas del alimento en el intestino medio, se incrementa la actividad de otras enzimas insensibles al inhibidor y que en su ausencia no están sobre-expresadas. Esto permite la digestión de las proteínas de la dieta en presencia del inhibidor y es fundamental para la supervivencia de los insectos (Zhu-Salzman *et al.* 2003; Amirhusin *et al.* 2007). En consecuencia, para una inhibición efectiva de las enzimas digestivas de los insectos es necesaria la expresión de diversos IPs (Jongsma y Bolter 1997).

Para conseguir resistencia durable contra *H. hampei*, los IPs de las semillas de *L. bogotensis*, *H. suaveolens* y *B. humidicola* pueden transferirse a café mediante ingeniería genética para producir plantas transgénicas con variaciones en la resistencia contra este insecto. Plantas de tabaco que expresan genes del inhibidor de proteinasa de tomate I (fuerte

inhibidor de quimotripsina y débil de tripsina) y II (fuerte inhibidor de tripsina y quimotripsina) mostraron diferencias en la especificidad contra *Manduca sexta* Linnaeus, 1763 (Johnson *et al.* 1989). El crecimiento de las larvas de *M. sexta* que se alimentaron de las hojas de tabaco transformadas con el inhibidor de proteinasa II se redujo significativamente en comparación con el crecimiento de las larvas que se alimentaron de las hojas sin transformar. Mientras, que el inhibidor de proteinasa I tuvo poco efecto en el crecimiento de las larvas de este lepidóptero (Johnson *et al.* 1989). Estos resultados muestran la importancia de identificar nuevos IPs con variaciones en la especificidad contra diferentes enzimas de los insectos (Mendiola *et al.* 2000).

H. hampei y *C. arabica* co-evolucionaron favoreciendo la adaptación del insecto a los compuestos tóxicos de la planta. Los IPs de *L. bogotensis*, *H. suaveolens* y *B. humicicola*, plantas no-huésped de la broca del café, inhiben las proteasas del insecto; mientras que los inhibidores de la planta huésped no bloquean las proteasas del insecto. Otros estudios han mostrado que los IPs de *A. hypogaea*, *P. tetragonolobus* y *S. tuberosum*, plantas no-huésped de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) inhiben las isoproteinasas y el crecimiento de las larvas de este lepidóptero, en comparación con los IPs de las plantas huésped (Harsulkar *et al.* 1999; Giri *et al.* 2003). De igual manera, el inhibidor de tripsina de *Momordica charantia* (Linnaeus, 1753) planta no-huésped de *H. armigera* y *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775), afectó la fertilidad y fecundidad de las larvas de ambos insectos (Telang *et al.* 2003). También, las vicilinas de leguminosas no-huésped de *C. maculatus* como *P. vulgaris*, *Phaseolus lunatus* (Linnaeus, 1753), *Canavalia ensiformis* (L., DC. 1825), y *Glycine max* (L., Merr. 1917) retardaron el desarrollo de las larvas del insecto (Yunes *et al.* 1998). Mientras que las vicilinas de *Vigna angularis* (Willd, 1969) una especie genéticamente cercana a la planta huésped *Vigna unguiculata* (L., Walp. 1843) no afectaron el desarrollo de las larvas de este insecto (Yunes *et al.* 1998). Estos resultados muestran la importancia de evaluar IPs de plantas no-huésped contra las enzimas de insectos en la búsqueda del control de plagas vía transgénesis.

Los inhibidores presentes en el extracto crudo de *L. bogotensis* produjeron la mayor inhibición de las aspártico proteasas de *H. hampei* usando una concentración de extracto proteínico de 100 µg, menor en comparación con otras investigaciones que usaron 160 µg de extracto crudo de *M. charantia* con una inhibición del 84% de la actividad de las proteinasas del intestino de *H. armigera* (Telang *et al.* 2003). Del mismo modo, una concentración diez veces mayor de extracto crudo de *P. vulgaris* y *Amaranthus* spp., sólo inhibió la actividad α-amilasa de *H. hampei* en un 80% y 40%, respectivamente (Valencia *et al.* 2000). De forma similar, 1 mg de extracto crudo de *Amaranthus cruentus* (Linnaeus, 1759) sólo inhibió 80% de la actividad amilasa de *H. hampei* (Valencia *et al.* 2000).

Estos resultados sugieren que los IAPLbs podrían ser buenos candidatos para transferir a café mediante ingeniería genética para producir plantas resistentes contra *H. hampei*, debido a que inhiben las enzimas del insecto a bajas concentraciones y al pH encontrado en el intestino medio del insecto. Además, esta leguminosa no ha estado expuesta a *H. hampei*, proporcionando nuevos y más potentes inhibidores de las proteasas de este insecto. Esto coincide con investigaciones previas que muestran que los IPs de plantas no-huésped son mejores para inhibir las proteasas de un insecto particular que

los inhibidores de las plantas huésped (Harsulkar *et al.* 1999; Giri *et al.* 2003).

Conclusiones

Se identificaron inhibidores de las aspártico proteasas de *H. hampei* en diferentes semillas; los inhibidores de *L. bogotensis* produjeron una mayor inhibición de las aspártico proteasas del insecto en comparación con los IPs de *H. suaveolens*, *B. humicicola* y *A. hypochondriacus*. Los IPs se unen al centro activo de la enzima bloqueando su actividad proteolítica. Esto muestra que los IPs de plantas no-huésped pueden suministrar nuevos y más potentes inhibidores de las proteasas de *H. hampei*. Estos inhibidores de proteasas pueden transferirse a café en la búsqueda de resistencia durable contra *H. hampei*. Este trabajo junto con el de Scarafoni *et al.* (2008) y Molina *et al.* (2010) confirma la existencia de inhibidores de proteasas en las semillas de *Lupinus* spp., contrario a lo que se había publicado de la falta de actividad inhibitoria de las proteasas de *L. albus* y *Lupinus luteus* (Linnaeus, 1753) (Gallardo *et al.* 1974).

Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia por la donación de recursos para llevar a cabo este proyecto, a Colciencias por la beca de doctorado de Diana Molina, y a los revisores del manuscrito.

Literatura citada

- AGUIRRE, C.; VÁLDES, S.; MENDOZA, G.; ROJO, A.; BLANCO, A. 2004. A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology 138: 81-89.
- AHN, J. E.; ZHU-SALZMAN, K. 2009. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. Journal of Insect Physiology 55: 678-685.
- AMIRHUSIN, B.; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; MURDOCK, L.; ZHU-SALZMAN, K. 2007. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. Journal of Insect Physiology 53: 734-740.
- BARBOSA, A. E.; ALBUQUERQUE, E.; SILVA, M.; SOUZA, D.; OLIVEIRA-NETO, O.; VALENCIA, A.; ROCHA, T.; GROSSI-DE-SA, M. F. 2010. α-amylase inhibitor- 1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits α-amylases from coffee berry borer. BMC Biotechnology 10:44.
- BERGAMIN, J. 1943. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Col. Ipidae). Arquivos do Instituto Biológico 14: 31-72.
- BLANCO, A.; MARTÍNEZ, N.; SANDOVAL, L.; DELANO, J. 1996. Purification and characterization of a digestive Cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). Insect Biochemistry and Molecular Biology 26: 95-100.
- BOLDBAATAR, D.; SIKASUNGE, C. S.; BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. 2006. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 36: 25-36.
- BUSTILLO, A. E. 2008. Aspectos sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. P. 388-418. En: Alex Enrique Bustillo (ed.). Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. FNC. Chinchiná, Colombia. 466 p.

- CHO, W. L.; RAICKEL, A. S. 1992. Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease. Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsins D and E. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 21823-21829.
- CHRISTELLER, J. T.; FARLEY, P. C.; RAMSAY, R. J.; SULLIVAN, P. A.; LAING, W. A. 1998. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *European Journal of Biochemistry* 254: 160-167.
- DUQUE, H.; BAKER, P. 2003. Case studies in CBB economics. p. 51-63. En: *Devouring Profit. The socio economics of coffee berry borer IPM. The Commodities Press-CABI-CENICAFE* (ed.). Chinchiná, Colombia. 106 p.
- FRANCO, O. L.; DIAS, S. C.; MAGALHAES C. P.; MONTEIRO, A. C.; BLOCH, Jr. C.; MELO, F. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SA, M. F. 2004. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry* 65: 81-89.
- GALLARDO, F.; ARAYA, H.; PAK, N.; TAGLE, M. A. 1974. Toxic factors in chilean legumes II. Trypsin inhibitor activity. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 24: 183-189.
- GATEHOUSE, J. A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist* 156: 145-169.
- GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; KU, M. S. B.; GUPTA, V. S.; DESHPANDE, V. V.; RANJEKAR, P. K.; FRANCESCHI, V. R. 2003. Identification of potent inhibitors of *Helicoverpa armigera* gut proteinase from winged bean seeds. *Phytochemistry* 63: 523-532.
- HARSULKAR, A. M.; GIRI, A. P.; PATANKAR, A. G.; GUPTA, V. S.; SAINANI, M. N.; RANJEKAR, P. K.; DESHPANDE, V. V. 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. *Plant Physiology* 121: 497-506.
- HOUSEMAN, J. G.; DOWNE, A. E. R. 1983. Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of Hemipteran insects. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 75: 509-512.
- JARAMILLO, J.; BORGEMEISTER, C.; BAKER, P. 2006. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): Searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research* 96: 1-12.
- JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. J. 1997. The adaptation of insects to plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43: 885-896.
- JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; GYNHEUNG, A.; RYAN, C. 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9871-9875.
- LASKOWSKI, M. Jr.; QASIM, M. A.; LU, S. M. 2003. Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with serine proteinases. In *Protein-Protein Recognition* (Kleanthous, C., ed.), pp. 228-279, Oxford University Press, Oxford.
- LEE, K. S.; KIM, B. Y.; CHOO, Y. M.; YOON, H. J.; KANG, P. D.; WOO, S. D.; SOHN, H. D.; ROH, J. Y.; GUI, Z. Z.; JE, Y. H.; JIN, B. R. 2009. Expresión profile of cathepsin D in the fat body of *Bombix mori* during metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 154: 188-194.
- LEMOES, K. J. A.; CAMPOS, F. A. P.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 56: 21.
- LENNY, J. F. 1975. Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B and C. *The Journal of Bacteriology* 122: 1265-1273.
- LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. 2002. Jasmonate and salicylate induce expresión of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature* 419: 712-715.
- LIU, Y. L.; SALZMAN, R. A.; PANKIW, T.; ZHU-SALZMAN, K. 2004. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 1069-1077.
- MACEDO, M. L.; FREIRE, M. G.; SILVA, M. B.; COELHO, M. B. 2007. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae); *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146: 486-498.
- MADR-HICA-OAC (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Interamericano de Cooperación en la Agricultura, y Observatorio de Agrocadenas de Colombia). 2008. Información estadística. <<http://www.agrocadenas.gov.co/home.htm>> (Fecha última revisión: 20 junio 2010. Fecha último acceso: [10 julio 2010]).
- MARES, M.; MELOUN, B.; PAVLIK, M.; KOSTKA, V.; BAUDYS, M. 1989. Primary structure of the cathepsin D inhibitor from potatoes and its structural relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Letters* 251: 94-98.
- MENDIOLA, E.; VALENCIA, A.; VALDÉS, S.; DÉLANO, J.; BLANCO, A. 2000. Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 126: 425-433.
- MOLINA, D.; ZAMORA, H.; BLANCO-LABRA, A. 2010. An inhibitor from *Lupinus bogotensis* seeds effective against aspartic proteases from *Hypothenemus hampei*. *Phytochemistry* 71: 923-929.
- NAVARRO, J.; GÓNGORA, C.; BENAVIDES, P. 2010. Single nucleotide polymorphism detection at the *Hypothenemus hampei* *Rdl* gene by allele-specific PCR amplification with T_m-shift primers. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97: 204-208.
- OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, R. A.; LIMA, L. M.; MORAIS, A. H. A.; MELO, F. R.; FRANCO, O. L.; BLOCH, Jr. C.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; SALES, M. P. 2002. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algarroba tree (*Prosopis juliflora* D. C.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72: 122-132.
- OSSA, G. A.; BUSTILLO, A. E.; VALENCIA, A. 2000. Determinación del pH en el fluido digestivo de larvas y adultos de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Revista Cenicafé* 51: 97-101.
- PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. 2010. Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pest. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98: 80-88.
- PRECIADO, D. P.; BUSTILLO, A. E.; VALENCIA, A. 2000. Caracterización parcial de una proteinasa digestiva proveniente de la broca del café (Coleoptera: Scolytidae). *Revista Cenicafé* 51: 20-27.
- RABOSSI, A.; STOKA, V.; PUIZDAR, V.; TURK, V.; QUESADA-ALLUE, L. A. 2004. Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitis capitata* early metamorphosis. *Archives Insect Biochemistry Physiology* 57: 51-67.
- RODRÍGUEZ, M. L.; ALVES, V.; GRACAS, M.; RICHARDSON, M. 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (Sw.) Willd. *Phytochemistry* 68: 1104-1111.
- RYAN, C. A. 1990. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449.
- SALES, M. P.; ANDRADE, L. B. S.; ARY, M. B.; MIRANDA, M. R. A.; TEXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, A. S.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. 2005. Performance of bean bruchids (Coleoptera: Bruchidae) reared on resistant (IT81D-1045) and susceptible (Epace 10) *Vigna unguiculata* seeds: Relationship

- with trypsin inhibitor and vicilin excretion. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology 142: 422-426.
- SCARAFONI, A.; CONSONNI, A.; GALBUSERA, V.; NEGRI, A.; TEDESCHI, G.; RASMUSSEN, P.; MAGNI, C.; DURANTI, M. 2008. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. Phytochemistry 69: 1820-1825.
- SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of protein in the range of 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry 166: 368-379.
- SCHWERTZ, G. W.; TAKENAKA, Y.; 1955. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin activity. Biochimica et Biophysica Acta 16: 571-575.
- SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. 1991. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology 99: 529-533.
- SUMIKAWA, J. T.; DE BRITO, M. V.; MACEDO M. L.; UCHOA, A. F.; MIRANDA, A.; ARAUJO, A. P.; SILVA-LUCCA, R. A.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. 2010. The defensive functions of plant inhibitors are not restricted to insect enzyme inhibition. Phytochemistry 71: 214-220.
- TAMHANE, V. A.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. 2007. Diverse forms of Pin-II family proteinase inhibitors from *Capsicum annum* adversely affect the growth and development of *Helicoverpa armigera*. Gene 403: 29-38.
- TELANG, M.; SRINIVASAN, A.; PATANKAR, A.; HARSULKAR, A.; JOSHI, V.; DAMLE, A.; DESHPANDE, V.; SAINANI, M.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, G.; BIRAH, A.; RANI, S.; KACHOLE, M.; GIRI, A. P.; GUPTA, V.; BIRAH, A.; RANI, S.; KACHOLE, M.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. Phytochemistry 63: 643-652.
- VALDES, S.; SEGURA, M.; CHAGOLLA, A.; VERVER, A.; MARTÍNEZ, N.; BLANCO, A. 1993. Purification, Characterization, and complete amino sequence of a trypsin inhibitor from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. Plant Physiology 103: 1407-1412.
- VALENCIA, A.; BUSTILLO, A.; OSSA, G.; CHRISPPEELS, M. 2000. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30: 207-213.
- VALENCIA, A.; ARBOLEDA, J. W. 2005. Digestion of the inhibitor α AI by *Hypothenemus hampei* aspartic proteinases. Revista Colombiana de Entomología 31: 117-121.
- VALENCIA, A.; ARBOLEDA, J. W.; GROSSI-DE-SÁ. 2007. Detection of α -amylase inhibitors by a zymography method, performed in isoelectric focusing electrophoretic phastGels. Analytical Biochemistry 366: 113-115.
- VÁSQUEZ, M.; SMITH, R. H.; MARTÍNEZ, N. A.; BLANCO, A. 1999. Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Stored Products Research 35: 167-174.
- VILLALBA, D. A.; BUSTILLO, A. E.; CHÁVES, B. 1995. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. Revista Cenicafe 46: 152-163.
- WILHITE, S. E.; ELLEN, T. C.; BRZIN, J.; SMIGOCKI, A. C. 2000. Inhibition of cysteine and aspartyl proteinases in the alfalfa weevil midgut with biochemical and plant-derived proteinase inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30: 1181-1188.
- WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L. 1987. Suppression of larval Colorado beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. Entomologia Experimentalis et Applicata 44: 235-240.
- YUNES, A. N. A.; ANDRADE, M. T.; SALES, M. P.; MORAIS, R. A.; FERNANDES, K. V. S.; GOMES, V. M.; XAVIER-FILHO, J. 1998. Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F)]. Journal of the Science of Food and Agriculture 76: 111-116.
- ZOR, T.; SELINGER, Z. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. Analytical Biochemistry 236: 302-308.
- ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; SHADE, R. E.; AHN, J. E. 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. Insect Biochemistry and Molecular Biology 12: 135-145.

Recibido: 27-ago-2010 • Aceptado: 2-jun-2011

Actividad insecticida y fijadora de nitrógeno de la bacteria transformada *Paenibacillus polymyxa* que expresa Cry1C

Insecticidal and nitrogen fixation activities of the transformed *Paenibacillus polymyxa* expressing Cry1C

AMAL IBRAHIM HUSSEIN^{1,2}, NAHED IBRAHIM ABD EL-GHAFFAR^{3,4}, ADEL EL-SAYED HATEM^{2,3}, HANI K. ALDEBIS^{2,3} y ENRIQUE VARGAS-OSUNA^{2,3}

Resumen: Se realizaron ensayos de laboratorio con el objeto de conocer la posibilidad de utilización de la bacteria *Paenibacillus polymyxa* modificada genéticamente para expresar la toxina Cry1C de *Bacillus thuringiensis* como un sistema de aplicación de proteínas Cry para el control del noctuido *Spodoptera littoralis* en cultivos de algodón. Se ha estudiado la actividad insecticida en larvas de primer estadio de *S. littoralis* y la persistencia de la cepa de *P. polymyxa* transformada, en comparación con la misma cepa no modificada y con *B. thuringiensis* var. *aizawai* que expresa de forma natural la toxina. Los resultados muestran que la bacteria transformada tiene una mayor toxicidad ($CL_{50}=7,04 \times 10^7$ espora+cristal/ml) que *B. thuringiensis* var. *aizawai* ($CL_{50}=8,47 \times 10^7$ espora+cristal/ml). Se encontraron altos niveles de supervivencia de la bacteria en el interior de los tejidos foliares y actividad insecticida al menos hasta 720 horas después del tratamiento foliar. Por otro lado, su aplicación en la planta aumenta la cantidad de Nitrógeno y en el suelo mejora la actividad nitrogenasa, en comparación con *P. polymyxa* no transformada.

Palabras clave: Algodón. *Bacillus thuringiensis*. Persistencia. *Spodoptera littoralis*. Toxicidad.

Abstract: Laboratory tests have been conducted in order to ascertain the possibility of using the bacteria *Paenibacillus polymyxa* expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin as a delivery system for Cry proteins that can be used to control the *Spodoptera littoralis* noctuid on cotton crops. We have studied the insecticidal activity on first instar larvae of *S. littoralis* and the persistence of the transformed strain of *P. polymyxa*, compared with the unmodified strain and *B. thuringiensis* var. *aizawai* naturally expressing the toxin. The results show that the transformed bacteria was more toxic ($LC_{50}=7.04 \times 10^7$ spore+crystal/ml) than *B. thuringiensis* var. *aizawai* ($LC_{50}=8.47 \times 10^7$ spore+crystal/ml). High levels of persistence into foliar tissues and insecticide activity were found, at least until 720 hours after foliar treatment. On the other hand, its application in the plant increases the amount of nitrogen and improves soil nitrogenase activity compared to untransformed *P. polymyxa*.

Key words: Cotton. *Bacillus thuringiensis*. Persistence. *Spodoptera littoralis*. Toxicity.

Introducción

Bacillus thuringiensis (Berliner, 1915) (Bt) es una bacteria Gram-Positivo que se caracteriza por producir una inclusión parasporal durante la esporulación formada por uno o más cuerpos cristalinos que contienen las proteínas insecticidas (Höfte y Whiteley 1989; Schnepf *et al.* 1998). Estas proteínas, llamadas delta-endotoxinas o Cry, son tóxicas para insectos de los órdenes Lepidoptera (Brock y Madigan 1988), Coleoptera (Dulmage y Aizawa 1982; Chiang *et al.* 1986) y Diptera (Lambert y Peferoen 1992) y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial (Brar *et al.* 2006).

Los avances en la genética de Bt permiten el desarrollo de su máxima potencialidad como insecticida mediante manipulación de genes *cry* (que codifican determinadas toxinas) con objeto de ampliar su espectro de actividad, aumentar su toxicidad mediante efectos sinérgicos o aditivos (Crickmore *et al.* 1995; Lee *et al.* 1996) o para la producción de organismos genéticamente modificados.

Un problema relacionado con los preparados comerciales a base de Bt es su limitada persistencia y estabilidad en campo (Cohen 1991) y para paliar este inconveniente se han puesto en práctica técnicas de inserción de genes *cry* específi-

cos en otros organismos con capacidad de colonizar la planta huésped del fitófago, de tal manera que los organismos transformados puedan sintetizar de forma continua cantidades suficientes de proteína Cry para evitar el daño causado por el insecto (Obukowicz *et al.* 1986; Gelernter 1990; Stock *et al.* 1990; Waalwijk *et al.* 1991; Lampel *et al.* 1994).

Sin embargo, la introducción de genes *cry* en bacterias distintas a *B. thuringiensis* acarrea inconvenientes debido a la inestabilidad de la característica introducida (Tiedje *et al.* 1989). La utilización de bacterias del mismo género que Bt permite solventar estos inconvenientes y reducir los problemas asociados a la expresión de los genes *cry* (Perlak *et al.* 1991; Fujimoto *et al.* 1993). Además, se ha visto que cepas transformadas de *Bacillus megaterium* de Bary, 1884; *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) y *Bacillus licheniforme* (Weigmann, 1898) que expresan proteínas Cry específicas de Bt pueden tener una persistencia prolongada y mejorar su eficacia insecticida (Bora *et al.* 1994; Theoduloz *et al.* 2003).

El lepidóptero *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Noctuidae), conocido comúnmente en España como “rosquilla negra”, es una especie polífaga y de distribución mediterránea que causa daños de importancia económica en numerosos cultivos y plantas hortícolas. En Egipto es considerada como la plaga principal del cultivo de algodón (Hosny

¹ Becaria de Investigación. ² Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Grupo de Entomología Agroforestal, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edificio Celestino Mutis, Campus Universitario de Rabanales, Crta. Madrid-Cádiz, km 396-a, 14071, Córdoba, España. z72ibiba@uco.es Autora para correspondencia. ³ Ph. D. ⁴ Department of Microbial Molecular Biology, Agricultural Genetic Engineering Research Institute (ARC), 9 Gamaa Street, 12619, Giza, Egypt.

et al. 1986; Hatem *et al.* 2009) y en España sus poblaciones son abundantes en las regiones del Levante y Andalucía (Gómez de Aizpurúa y Arroyo Varela 1994). Esta especie, como otras del mismo género, mostraron en principio poca susceptibilidad a los primeros productos comerciales de Bt, pero luego se han aislado cepas naturales pertenecientes a las variedades *entomocidus* y *aizawai* (Navon *et al.* 1983; Broza *et al.* 1984) con mayor capacidad tóxica para las larvas de estos noctuidos, y más recientemente se han obtenido cepas transformadas genéticamente que son más activas (Kalman *et al.* 1995). Se sabe que las especies de *Spodoptera* poseen en la membrana de las células columnares del mesenterón un receptor específico de la proteína Cry1C (Sanchis *et al.* 1994) responsable de esta mayor susceptibilidad.

A partir de la bacteria fijadora de Nitrógeno *Paenibacillus polymyxa* (Prazmowski, 1880) que habita la rizosfera del algodón, se ha construido una cepa (NMO10) que expresa la proteína Cry1C y que presenta toxicidad para larvas de *S. littoralis* (Ibrahim *et al.* 2006; Ibrahim y Omar 2009).

Este trabajo estudia la actividad insecticida y la persistencia de la bacteria *P. polymyxa* que expresa la toxina Cry1C de Bt, para conocer su idoneidad como un sistema de aplicación de toxinas Cry que pueda ser utilizado en aplicaciones foliares para el control de *S. littoralis* en el cultivo de algodón. Así mismo, se determina si esta bacteria transformada mantiene su capacidad fijadora de nitrógeno.

Materiales y Métodos

Material biológico. Se usaron *Paenibacillus polymyxa* transformada con *cry1C* de Bt, la cepa natural de *Paenibacillus polymyxa* (ambas obtenidas por la Dra. Nahed Abdel Al-Ghaffar Ibrahim del Agriculture Genetic Engineering Research Institute de Egipto) y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* reaislado del producto comercial Xantari® GD: 15% (15 millones U.I./gr) p/p suministrado por Kenogard, S.A (Barcelona). La técnica de obtención de la cepa de *P. polymyxa* transformada ha sido descrita por Ibrahim *et al.* (2008) y el gen *cry1C* fue obtenido por el laboratorio del Dr. Donald H. Dean (Universidad de Ohio, USA).

Las bacterias se multiplicaron en medio de cultivo T3 [5g/l de peptona, 1,5g/l de extracto de levadura, 0,005g/l de $MnCl_2$ y solución tampón de fosfato sódico 0,5M (pH 6,8)] y para la bacteria transformada se añadió al medio kanamicina (100µg/ml). El periodo de incubación fue de siete días, tras lo cual se confirmó que los cultivos estaban completamente lisados y se procedió a la centrifugación a 10000rpm durante 15min a 4°C en tubos de polipropileno de 30ml. El sedimento se lavó en agua bidestilada y el precipitado final se obtuvo como una suspensión en agua estéril de espora-cristal que se conservó a -20°C hasta su uso. La riqueza de las suspensiones en número de esporas y cristales por ml (esp+cri/ml), se determinó mediante recuentos en cámara Neubauer.

Las larvas de *S. littoralis* proceden de una población mantenida en condiciones de insectario (26±2°C, 60±5% HR y fotoperiodo de 16 horas de luz) que fueron alimentadas con dieta semisintética a base de harina de alfalfa modificada de Poitout y Bues (1974).

Bioensayos de toxicidad. En estos bioensayos se comparó, en condiciones de insectario, la toxicidad de *P. polymyxa* transformada (Ppt) y de *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Bt) que contiene el gen *cry1C* de forma natural. Se emplearon

cinco concentraciones de Ppt, seis concentraciones de Bt y un testigo para cada tipo de bacteria, utilizando 10 larvas de primer estadio (L1) por repetición, con cinco repeticiones para Ppt siendo necesario un mayor número de repeticiones (10) para Bt con el fin de que el ajuste de la recta de regresión fuera estadísticamente aceptable. Las concentraciones de Ppt fueron 6,12x10⁶; 18,40x10⁶; 55,06x10⁶; 165,30x10⁶ y 495,90x10⁶ esp+cri/ml y las de Bt 0,68x10⁶; 2,10x10⁶; 6,16x10⁶; 18,47x10⁶; 55,40x10⁶ y 166,20x10⁶ esp+cri/ml.

El complejo espora-cristal se suministra a las larvas de *S. littoralis* depositando 200µl de la suspensión sobre dieta previamente vertida en el fondo de cajas de plástico de 39mm de diámetro y 25mm de altura. Después de dejar secar, se introducen 10 larvas neonatas por caja. La duración de bioensayo es de siete días.

Bioensayos de supervivencia y persistencia. Como inóculos se utilizaron las bacterias *P. polymyxa* transformada y *P. polymyxa* natural, que procedían de la multiplicación en medio T3 antes descrita y que posteriormente se liofilizaron hasta su uso. Los liofilizados se resuspendieron en agua hasta una concentración final de 1000ppm, a los que se añadió goma arábica (1%) y Tween-20 (0,01%). Estas suspensiones fueron aplicadas en pulverización foliar sobre plantas de algodón de cuatro semanas de edad mantenidas en condiciones de semicampo. Finalmente se dejaron secar 2 horas antes de iniciar la toma de muestras para los bioensayos. Para ello, en diferentes periodos después de la inoculación de las plantas (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 336, 504 y 720 horas) se eligieron al azar dos hojas, de las cuales una de ellas se usaron para la determinación de la supervivencia de la bacteria y la otra para el ensayo de persistencia de la actividad insecticida.

Para determinar la supervivencia de las bacterias en el interior de los tejidos foliares, tras su desinfección superficial con hipoclorito sódico al 10%, se cortaron en pequeños trozos que se sometieron a inmersión y agitación suave en 50ml de una solución estéril de $MgSO_4$ 100mM durante 15min para la liberación de la bacteria fijada al tejido. Con cada líquido resultante (suspensión madre) se hicieron tres diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) y cada suspensión fue cultivada en placa (2 placas/suspensión) con medio LB sólido (triptona 10g/l, levadura 5g/l, cloruro sódico 5g/l y agar 15g/l) y se incubaron a 30°C durante la noche. Finalmente se calculan las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) como valor medio de los recuentos de las placas y se determinan los valores de UFC/g peso seco (Sudha *et al.* 1999).

Para evaluar la persistencia de la toxicidad de *P. polymyxa* transformada, las hojas de algodón seleccionadas se colocaron separadamente en una placa Petri (16cm de diámetro y 3,5cm de altura) en condiciones de insectario y se infestaron artificialmente con 10 larvas neonatas de *S. littoralis*. A las 72 horas se realizó el control de mortalidad larvaria. Para cada tiempo después de la aplicación se realizaron tres repeticiones, utilizando los valores medios de mortalidad para determinar la toxicidad correspondiente.

Contenido de nitrógeno en planta y actividad nitrogenasa en suelo. El nitrógeno total se determinó con plantas tratadas por pulverización foliar con 1000ppm de *P. polymyxa* transformada y de *P. polymyxa* natural. Dos semanas después de la inoculación se tomaron muestras de la parte epigea que se analizaron con el método Micro Kjeldahl, usando una mezcla

Tabla 1. Análisis de regresión Probit y CL_{50} de *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) y *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* (Bt) para larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis*.

Bacteria	χ^2	g.l.	Recta de regresión	CL_{50} (esp+cri/ml)	Límites fiduciales 95%	
					Inferior	Superior
Ppt	1,28	3	$y = 1,83x + 1,62$	$7,04 \times 10^7$	$5,49 \times 10^7$	$9,09 \times 10^7$
Bt	9,46	4	$y = 1,06x + 2,96$	$8,47 \times 10^7$	$4,50 \times 10^7$	$24,01 \times 10^7$

χ^2 = test para la bondad del ajuste.

de $H_2SO_4 + HClO_3$ (1:1) de acuerdo al procedimiento de Page *et al.* (1982). El contenido de N se calculó mediante la fórmula: $mg\ N/planta = \%N \times \text{Peso seco (g)/planta} \times 10$.

Para ambas bacterias se determinó también la actividad nitrogenasa en muestras de suelo que fue artificialmente infestado con 1000ppm de *P. polymyxa* transformada y de *P. polymyxa* natural, siguiendo la técnica de reducción del acetileno (ARA) a partir de muestras de 100gr de suelo activado con dos fuentes de carbono e incubado a 28°C durante 72h. Las muestras se transfirieron a tubos de 300ml y se analizaron por cromatografía de gases según el método descrito por Hardy *et al.* (1973) y Somasegaran y Hoben (1985). A partir de las cantidades de etileno (en μ moles) de las muestras, se determinan los valores expresados en nanomoles de etileno/gr/h.

Análisis estadísticos. Los datos de mortalidad larvaria en los bioensayos de toxicidad se sometieron a análisis de regresión Probit (Finney 1971) para determinar las ecuaciones lineales que relacionan concentración-mortalidad y a partir de ellas se calcularon las concentraciones letales medias (CL_{50}). Para los análisis de regresión y la comparación de las rectas se utilizó el programa POLO (Russell *et al.* 1977). Los datos de cantidad de Nitrógeno y de actividad nitrogenasa fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias se compararon con la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) al 5% de significación.

Resultados y Discusión

Evaluación de la toxicidad. Se determinó la mortalidad de larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* tratadas con *P. polymyxa* transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Tabla 1).

Los valores de la prueba χ^2 indican un buen ajuste de ambas rectas, cuyas pendientes difirieron entre sí (test de paralelismo $\chi^2(1)=14,87$ ($p<0,001$), siendo significativamente mayor la pendiente en el tratamiento con *P. polymyxa* transformada. Esta diferencia se atribuye a la menor heterogeneidad de la población de la bacteria transformada en comparación con la cepa de *B. thuringiensis*.

La toxicidad de *P. polymyxa* transformada se caracterizó por una CL_{50} de $7,04 \times 10^7$ esp+cri/ml para larvas de primer estadio de *S. littoralis*; este valor fue menor que el de *B. thuringiensis* var. *aizawai* de $8,47 \times 10^7$ esp+cri/ml. No obstante, como se deduce por el solape de los intervalos fiduciales, ambos valores no difirieron significativamente. A resultados similares llegaron Ibrahim y Omar (2009) al comparar la toxicidad de *P. polymyxa* transformada con *B. thuringiensis* var. *entomocidus* sobre larvas neonatas de *S. littoralis*.

Bora *et al.* (1994) utilizaron la cepa RS1 de *B. megaterium* aislada de la filosfera de las plantas de algodón para

introducir el gen *cryIAa* de la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. La actividad insecticida del organismo transformado en larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) fue similar a la cepa HD1 pero su efecto persistió durante más tiempo ofreciendo una mejor protección de las plantas. Así mismo, cepas transformadas de *B. subtilis* y *B. licheniforme* que expresan CryIAb y habitan de forma natural en el filopiano de plantas del tomate, muestran una actividad insecticida contra el lepidóptero *Tuta absoluta* (Meyrich, 1917) similar a una cepa de *B. thuringiensis* que expresa de forma natural la proteína (Theodulos *et al.* 2003). La utilización de estas bacterias colonizadoras de plantas, transformadas genéticamente para tener acción insecticida contra plagas, se ha venido desarrollando desde la década de los 90 (Gelernter y Schwab 1993), sin que hasta ahora se hayan encontrado efectos ambientales adversos en la evaluación de su bioseguridad en campo.

Supervivencia de *P. polymyxa*. En las hojas superficialmente esterilizadas se encontraron altos niveles de supervivencia de la bacteria establecida en los tejidos foliares al menos hasta 720 horas después del tratamiento (Tabla 2). Los valores en UFC/g peso fresco mostraron oscilaciones entre periodos

Tabla 2. Supervivencia en el tejido foliar del algodón de *Paenibacillus polymyxa* transformada (con el gen *cry1C*) y *Paenibacillus polymyxa* no transformada, después de pulverización foliar en plantas de algodón.

Horas después de tratamiento	<i>P. polymyxa</i> transformada UFC ($\times 10^3$)/g peso fresco	<i>P. polymyxa</i> UFC ($\times 10^3$)/g peso fresco
2	4,9	6,5
4	1,8	14,0
6	0,6	3,6
8	2,0	5,4
10	0,4	4,4
12	0,6	4,2
24	1,0	1,1
48	3,0	1,4
72	1,1	1,5
96	8,6	5,1
120	1,9	4,0
144	1,5	6,2
168	2,4	8,6
336	17,3	2,4
504	5,9	3,5
720	25,2	2,5

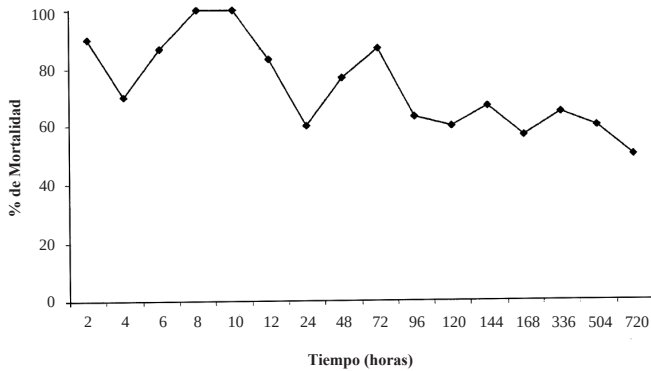


Figura 1. Persistencia de la actividad insecticida de *Paenibacillus polymyxa* transformada (con el gen *cry1C*), sobre larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* después de pulverización foliar en plantas de algodón.

consecutivos, probablemente debido a que las determinaciones procedían de una sola muestra de hoja. No obstante, la supervivencia de la bacteria transformada se extendió durante los 30 días de duración del ensayo, al igual que la bacteria no transformada. Resultados semejantes se han obtenido en caña de azúcar (James y Olivares 1998) y arroz (James *et al.* 2002). En cultivos en invernadero Denise *et al.* (2002) encuentran bacterias endófitas colonizando sus plantas huéspedes originales 42 días después de la inoculación a unos niveles de $3,5\text{--}7,7 \times 10^{10}$ UFC/g peso fresco.

Persistencia de la actividad insecticida. Los porcentajes de mortalidad oscilaron entre 46,7 y 100%, y al final del ensayo la media estuvo alrededor del 50% de las larvas tratadas (Fig. 1). Datos similares han sido señalados por Ibrahim *et al.* (2006) y Sudha *et al.* (1999) con el también lepidóptero *Scirpophaga incertulas* (Walker, 1863) en arroz. La cepa RS1 de *B. megaterium* transformada con el gen *cry1Aa* de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* persiste en la superficie de las hojas de algodón durante más de 28 días, mientras que la cepa de *B. thuringiensis* desaparece completamente siete días después de la inoculación. La actividad insecticida de la cepa transformada en larvas de *H. armigera* persistió a altos niveles durante tres semanas desde la aplicación (Bora *et al.* 1994). Así mismo, cepas transformadas de *B. subtilis* y *B. licheniforme* que expresan Cry1Ab fueron capaces de sobrevivir en las hojas del tomate durante más de 45 días (Theoduloz *et al.* 2003).

Los resultados indican que la toxicidad de la bacteria permanece durante un largo periodo, en contraste con la pérdida mucho más rápida de actividad de las pulverizaciones con Bt convencional que se degrada significativamente en 24-48 horas (Pusztai *et al.* 1990). La mayor persistencia puede ser una cualidad como bioinsecticida cuando se tratan poblaciones larvianas heterogéneas, como las que suelen caracterizar los ataques de *S. littoralis*, aunque la presencia de residuos de bajas dosis en la planta pueden contribuir a la aparición de resistencia (Nester *et al.* 2002). En estas circunstancias, los enemigos naturales pueden influir también en el desarrollo de resistencia a la bacteria por preferir los intoxicados-susceptibles o los saludables-resistentes (Schnepf *et al.* 1998).

Contenido de Nitrógeno y actividad nitrogenasa. En las plantas tratadas con *P. polymyxa* transformada el contenido

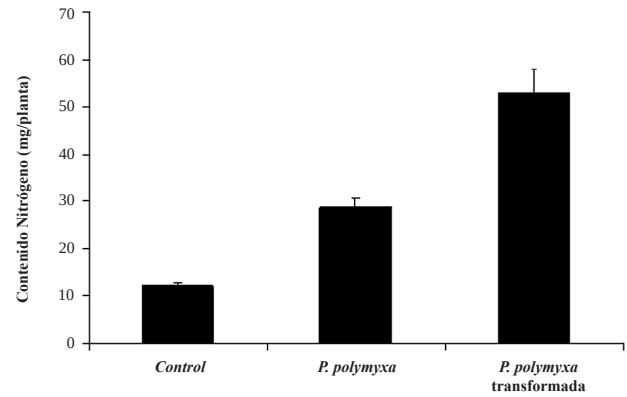


Figura 2. Contenido total de Nitrógeno en plantas de algodón tratadas en pulverización foliar con *Paenibacillus polymyxa* transformada (con el gen *cry1C*) y no transformada.

medio de Nitrógeno fue de 52,93mg/planta, significativamente mayor ($F=34,5$; $gl=2$; $P=0,0005$) que el de 28,79mg en las tratadas con *P. polymyxa* no transformada (Fig. 2). En cuanto a la actividad nitrogenasa (ARA) (Fig. 3), se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($F=75,4$; $gl=2$; $P=0,0001$) de tal forma que en suelos con *P. polymyxa* transformada la actividad fue mayor que en suelos con *P. polymyxa* no transformada. Por tanto, en ambos casos la bacteria transformada mostró mayor actividad fijadora de Nitrógeno en las plantas de algodón que la propia bacteria no transformada, lo cual es un resultado no esperado cuyas causas han de ser investigadas. Gyaneshwar *et al.* (2001) detectaron también actividad nitrogenasa en plantas de arroz inoculadas con la bacteria fijadora de nitrógeno *Serratia marcescens* (Bizio, 1823).

En resumen, los resultados indican buenas aptitudes de la bacteria *P. polymyxa* que expresa la toxina Cry1C de *B. thuringiensis*, como bioinsecticida y que serviría también como biofertilizante en programas de Producción Integrada para el control de *S. littoralis*. Por un lado, la bacteria transformada tiene similar actividad tóxica que *B. thuringiensis* var. *aizawai* sobre larvas de primer estadio de *S. littoralis* y en pulverizaciones foliares presenta alta persistencia y supervivencia al mismo tiempo que favorece la capacidad fijadora de nitrógeno en la planta; por otro lado, su aplicación mejora

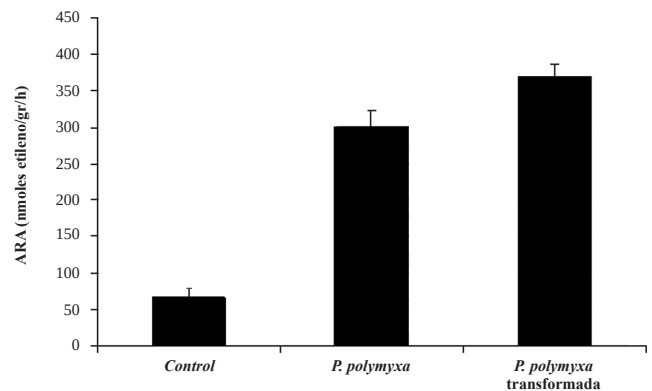


Figura 3. Actividad nitrogenasa en suelo tratado con *Paenibacillus polymyxa* transformada (con el gen *cry1C*) y no transformada.

la actividad nitrogenasa en suelo, en comparación con la bacteria *P. polymyxa* no transformada.

Agradecimientos

A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) por la concesión de una Beca de Doctorado al primer autor.

Literatura citada

- BORA, R.; MURTY, M.; SHENBARGARATHAI, R.; SEKAR, V. 1994. Introduction of Lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phylloplane. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 214-22.
- BRAR, S.; VERMA, M.; TYAGI, R.; VALÉRO, J. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* 41: 323-342.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, T. 1988. *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall, Inc. Englewood, Cliffs. New Jersey. 835 p.
- BROZA, M.; SNEH, B.; YAWETZ, A.; ORON, U.; HONIGMAN, A. 1984. Commercial application of *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* for the control of *Spodoptera littoralis* Boisduval. *Journal of Economic Entomology* 77: 1530-1533.
- CHIANG, A. S.; YEN, D. F.; PENG, W. K. 1986. Germination and proliferation of *Bacillus thuringiensis* in the gut of rice moth larva *Corcyca cephalica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 96-99.
- COHEN, E.; ROZEN, H.; JOSEPH, T.; BRAUN, S.; MARGULIES, L. 1991. Photoprotection of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* from ultraviolet irradiation. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 343-351.
- CRICKMORE, N.; BONE, E.; WILLIAMS, J.; ELLAR, D. 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters* 131: 249-254.
- DENISE, K. Z.; PAT, N. B.; HARRIA, F.; ZHENGYA, K.; DANIEL, H.; PHYLLIS, I. A.; ANNE, V. K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2198-2208.
- DULMAGE, H. T.; AIZAWA, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. (pp. 209-237). En: E. Kurstak (Ed.). *Microbial and Viral Pesticide*. Marcel Dekker. New York.
- FINNEY, D. J. 1971. *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 333 p.
- FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, K.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 11: 1151-1155.
- GELERNTER, W. 1990. Targeting insecticide-resistance markers: new developments in microbial based product. Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies. *American Chemical Society-USA* 4221: 105-117.
- GELERNTER, W.; SCHWAB, G.E. 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems (pp. 89-104). En: P.F. Entwistle, J.S. Cory, J. Bailey and S. Higgs (Eds.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley. New York.
- GÓMEZ DE AIZPURÚA, C.; ARROYO-VARELA, M. 1994. Principales noctuidos actuales de interés agrícola. *Edigur*. Madrid. 145 p.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 183: 2634-2645.
- HARDY, R.; BURNS, R.; HOLSTEN, T. 1973. Application of the acetylene reduction assay for the measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 47-81.
- HATEM, A. E.; ABDEL-SAMAD, S. S. M.; SALEH, H. A.; SOLIMAN, M. H. A.; HUSSIAN, A. I. 2009. Toxicological and physiological activity of plant extracts against *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 35: 517-531.
- HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews* 53: 242-255.
- HOSNY, M. M.; TOPPER, C. P.; MOAWAD, G. M.; EI-SAADANY, G. 1986. Economic damage thresholds of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton in Egypt. *Crop Protection* 5: 100-104.
- IBRAHIM, N. A. A.; OMAR, M. N. A. 2009. Expression of the insecticidal protein gene *cry1C* of *Bacillus thuringiensis* in plant-colonizing nitrogen fixing bacteria. *Pest Technology* 3: 45-49.
- IBRAHIM, N. A. A.; SANNA, A. O.; MOHAMED, S. S.; MAGDY, A. M. 2008. Construction of a potent strain of *Bacillus thuringiensis* against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *German Journal of Agriculture and Forestry Research* 58: 111-123.
- IBRAHIM, N. A. A.; HASSAN, O. S.; OMAR, M. N. A. 2006. Protection of cotton plant (*Gossypium barbadense*) against lepidopteran insects due to colonization with nitrogen fixing bacteria expressing the *Bacillus thuringiensis* toxin gene *Cry1C*. *Egypt Journal of Genetics and Cytology* 35: 305-319.
- JAMES, E. K.; G. PRASAD, M. NATARAJAN, B. L. WILFREDO, L. BARRAQUIO, R. M. PALLAVOLA, O. L. FABIO; L. K. JAGDISH. 2002. Infection and colonization of rice seedling by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 894-906.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. 1998. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 77-119.
- KALMAN, S.; KIEHNE, K. L.; COOPER, N.; REYNOSO, M. S.; YAMAMOTO, T. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3063-3068.
- LAMBERT, B.; PERFEROEN, M. 1992. Insecticide promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience* 42: 112-122.
- LAMPEL, J.; CANTER, G.; DUMOCK, M.; KELLY, J.; ANDERSON, J.; URATANI, B. 1994. Integrative cloning, expression and stability of the *cry1A(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 501-508.
- LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.; DEAN, D. H. 1996. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins *Cry1Aa* and *Cry1Ac* on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 583-586.
- NAVON, A.; WYSOKI, M.; KEREN, S. 1983. Potency and effect of *Bacillus thuringiensis* preparations against larvae of *Spodoptera littoralis* and *Boarmia (Ascotis) selenaria*. *Phytoparasitica* 11: 3-11.
- NESTER, E.; THOMASHOW, L. S.; METZ, M.; GORDON, M. 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment. *American Academy of Microbiology*, Washington, D. C. (www.asmsa.org/acasrc/aca1.htm).
- OBUKOWICZ, M.; PERLAK, F.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.; BOLTEN, S.; WATRUD, L. 1986. Tn5-mediated integration of the deltaendotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing pseudomonads. *Journal of Bacteriology* 168: 982-989.
- PAGE, A. L.; MILLAR, R. H.; KEENY, D. R. 1982. Methods of soil analysis. *American Agriculture Inc.* Madison. 1159 p.

- PERLAK, F. J.; FUCH, R. L.; DEAN, D. A.; MCPHERSON, S. L.; FISCHHOFF, D. A. 1991. Modification of the coding sequences enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 88: 3324-3338.
- POITOUT, S.; BUES, R. 1974. Élevage de chenilles de vingt-huit espèces de lépidoptères Noctuidae et de deux espèces d'Arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de l'élevage selon les espèces. *Annales de Zoologie-Ecologie Animale* 6: 431-441.
- PUSZTAI, M.; FAST, P.; GRINGORTEN, L.; KAPLAN, H.; LES-SARD, T.; CAREY, P. R. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochemistry Journal* 273: 43-47.
- RUSSELL, R. M.; ROBERTSON, J. L.; SAVIN, N. E. 1977. POLO: a new computer program for probit analysis. *Bulletin of the Entomological Society of America* 23: 209-213.
- SANCHIS, V.; CHAUFaux, J.; PAURON, D. 1994. A comparison and analysis of the toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin on *Spodoptera littoralis* and *Bombyx mori*. *FEBS Letters* 353: 259-263.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. 1985. *Methods in legume-Rhizobium technology*. University of Hawaii. Nifal Project and Mircen. Hawaii, 367 p.
- STOCK, C.; MCLOUGHLIN, T.; KLEIN, J.; ADANG, M. 1990. Expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Pseudomonas cepacia* 526. *Canadian Journal of Microbiology* 396: 879-884.
- SUDHA, S. N.; JAYAKUMAR, R.; VAITHILINGAM, S. 1999. Introduction and expression of the *cry1Ac* gene of *Bacillus thuringiensis* in a cereal-associated bacterium, *Bacillus polymyxa*. *Current Microbiology* 38: 163-167.
- THEODULOZ, C.; VEGA, A.; SALAZAR, M.; GONZÁLEZ, E.; MEZA-BASSO, L. 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin *cry1Ab* gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). *Journal of Applied Microbiology* 94: 375-381.
- TIEDJE, J.; COLWELL, R.; GROSSMAN, Y.; HODSON, R.; LENSKI, R.; MACK, R. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70: 298-315.
- WAALWIJK, C.; DULLEMANS, A.; MAAT, C. 1991. Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Letters* 77: 257-64.

Recibido: 18-mar-2011 • Aceptado: 31-oct-2011

Screening of entomopathogenic nematodes to control *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae)

Selección de nematodos entomopatogénicos para el control de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae)

ELDER SIMÕES DE PAULA BATISTA¹, ALEXANDER M. AUAD^{2*}, TIAGO TEIXEIRA DE RESENDE³,
and CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO¹

Resumen: Se seleccionaron aislamientos de nematodos entomopatogénicos (NEPs) contra el salivazo de los pastos, *Mahanarva fimbriolata*. Se desarrolló un experimento en laboratorio donde ninfas de salivazo se expusieron a siete aislamientos (*Steinernema anomali*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravus*, *Heterorhabditis amazonensis* RSC5, *H. bacteriophora* HP88 y *H. baujardi* LPP7) en tres concentraciones (200, 400 y 800 NEP/ninfa). Luego de la selección de los aislamientos más virulentos en laboratorio, se efectuó un experimento en invernadero. El aumento de la concentración no proporcionó incremento en la mortalidad ninfal de *M. fimbriolata* en laboratorio. Las ninfas de salivazo fueron susceptibles a todos los aislamientos, destacándose *S. riobravus* con un 90% de mortalidad, y *S. feltiae* con un 80%. El desempeño en invernadero no fue diferente entre los aislados, alcanzando una mortalidad ninfal de 48% (*S. carpocapsae*) y 72% (*S. feltiae*). Hay disminución de la eficiencia de los nematodos en invernadero comparada con la eficiencia en laboratorio.

Palabras clave: Caña de azúcar. Control microbiano. Salivazo de los pastos. *Heterorhabditis*. *Steinernema*.

Abstract: We aimed to screen entomopathogenic nematodes (EPNs) strains against the root spittlebug, *Mahanarva fimbriolata*. An assay was performed at laboratory in which nymphs of the insect were exposed to seven EPNs strains (*Steinernema anomali*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravus*, *Heterorhabditis amazonensis* RSC5, *H. bacteriophora* HP88 and *H. baujardi* LPP7) under three concentrations (200, 400 and 800 EPNs/nymph). After the laboratory screening a greenhouse assay was carried out using the most pathogenic strains. Increasing concentration didn't increase nymph mortality at laboratory. The root spittlebug nymphs were susceptible to all strains, with 48% (*S. carpocapsae*) and 72% (*S. feltiae*) pathogenicity extremes. A decrease in efficiency was observed in greenhouse tests compared with laboratory tests.

Key words: Sugarcane. Microbial control. Spittlebug. *Heterorhabditis*. *Steinernema*.

Introduction

Brazil is the leading producer of sugarcane and products made from it worldwide, and cane is the third leading crop by area cultivated in the country. Besides sugar, the main products derived from cane are biofuels such as ethanol and biodiesel. The outlook is for greatly expanded production of these fuels because they are more environmentally friendly and sustainable than fossil fuels (Macedo 2005).

The root spittlebug, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), stands out among the pests that attack sugarcane. The gradual replacement of manual harvesting, after burning off the litter, by mechanical harvesting without burning favors increasing populations of these pests, because the leaf trash cover left afterward provides an ideal environment for the development of nymphs, which feed off the sap in the roots of the new cane plants growing from the ratoons (Ravaneli *et al.* 2006). According to Madaleno *et al.* (2008), the feeding of nymphs and adults can reduce sugarcane productivity by 29.8% when the number of nymphs reaches 7.3 per linear meter.

Efforts to control this pest vary widely, often in various combinations, include strategic harvest timing, physical removal of insects and litter, use of resistant genotypes, application of pesticides and biological control by entomopatho-

genic fungi (Dinardo-Miranda *et al.* 2001; Dinardo-Miranda *et al.* 2002; Almeida *et al.* 2003; Batista-Filho *et al.* 2003; Souza *et al.* 2008). Integrated pest management calls have been done for reduced use of chemicals due to the environmental and economic problems caused by their indiscriminate use. The growing concern on the problems of overuse of pesticides has attracted greater attention to the use of plant varieties resistant to root spittlebugs (Auad *et al.* 2007) and the use of biological control agents, of which entomopathogenic fungi have attracted most of the attention (Batista-Filho *et al.* 2003; Loureiro *et al.* 2005). However, these measures have certain limitations, hence the need to develop new strategies to manage this pest.

Some characteristics make entomopathogenic nematodes (EPNs) promising for control of crop pests, such as the speed with which they attack the host, the ease of mass producing them at low cost and the wide spectrum of susceptible host pests (Georgis *et al.* 2006; Grewal *et al.* 2001). They also are compatible with many pesticides, allowing them even to be applied in combination with chemicals in some situations (Koppenhöfer *et al.* 2002; Negrisoli Jr. *et al.*, 2008; Reis-Menini *et al.* 2008). Finally, they are able to seek out hosts that have cryptic habits (Kaya and Gaugler 1993) such as the root spittlebug. In the case of *M. fimbriolata*, the only reports in the literature are the studies by Leite *et al.* (2002) and Leite

¹ M. Sc. Pos-graduation Animal Biology and Behavior, Federal University of Juiz de Fora - Campus Universitário - Martelos, 36036-900 - Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil; elderspb@gmail.com, caiosat@gmail.com. ² Ph. D. Entomology Laboratory, Embrapa Dairy Cattle - Eugênio do Nascimento Street, 610, Dom Bosco, 36038-330, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, amaud@cnpgl.embrapa.br * Corresponding author. ³ Agronomist Entomology Laboratory, Embrapa Dairy Cattle, tiago@cnpgl.embrapa.br

et al. (2005), in which nematodes were shown to be potential control agents.

The life cycle of these nematodes includes three development phases: egg, juvenile and adult (females and males of Steinernematidae and a generation of hermaphrodites in the case of Heterorhabditidae). The juvenile phase is composed of four stages (J1, J2, J3 or Infective Juvenile and J4). The infective juvenile (IJ) stage contains symbiont bacteria and is when the nematode is found on soil. These juveniles locate their hosts by detecting excretion products, CO₂ levels and temperature gradients. The nematodes then penetrate the host through natural openings (mouth, anus or spiracles). Once inside, they migrate to the hemolymph and release bacteria. These produce toxins that kill the host by septicemia in 24 to 48 hours. Then the IJs start to multiply and later feed on the bacteria and tissues decomposed by the bacteria and advance to stage J4. From this stage they become first-generation adults and the females lay eggs, giving rise to the second generation (Kaya and Gaugler 1993). Some EPN species, called “ambushers”, wait on the soil surface for a host to approach, while others, called “cruisers”, are adapted to search for hosts in the soil. EPNs in the second group are very active, relying on chemical trails to find distant hosts, and are thus more suitable to combat sedentary hosts (Campbell and Gaugler 1993; Grewal *et al.* 1994).

There are substantial behavioral differences among ENP strains in relation to penetration in the host and later emergence and the strategy of finding hosts. Besides these, there are also important morphological and physiological differences. Finally, the concentration of these pathogens in the environment and the target host are also factors that influence their action (Lewis *et al.* 2006). This explains the specificity of each strain and requires conducting experiments to choose adequate strains to fight the pest species of interest. Therefore, EPNs can be included in integrated pest management programs, to optimize sugarcane production, since they exploit the same environment as spittlebug nymphs. The study reported here screened different EPN strains for their effectiveness against nymphs of the root spittlebug, *M. fimbriolata*, in laboratory and greenhouse conditions.

Material and Methods

We used *M. fimbriolata* nymphs that had been maintained in a greenhouse on sugarcane plants (*Saccharum* spp. cv. RB739735). The nematodes were multiplied according to the method proposed by Kaya and Stock (1997) on larvae of *Tenebrio molitor* L., 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) as the host. Seven strains were tested: *Steinernema anomali* Kozodoi, 1984; *S. carpocapsae* (Weiser, 1955); *S. feltiae* (Filipjev, 1934); *S. riobravus* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994; *Heterorhabditis amazonensis* RSC5 Andaló, Nguyen & Moino Jr. 2006; *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 Poinar 1976; and *Heterorhabditis baujardi* LPP7 Phan, Subbotin, Nguyen & Moens 2003.

Nymph mortality in laboratory. The experimental units consisted of Petri dishes (9cm in diameter) lined with two sheets of filter paper as substrate, moistened with 2mL of an aqueous solution of EPNs (treatments) or distilled water without pathogens (control). Then, five nymphs of the fourth or fifth instar were placed in each dish, which was sealed with plastic film and placed an incubation chamber at a tempera-

ture of 25±1°C and 80±10% relative humidity. The nematodes were applied at concentrations of 200, 400 and 800 EPNs/nymph. Hence, there were 21 treatments in a factorial setup (seven strains x three concentrations) with five repetitions, for a total of 25 nymphs per treatment. A control group was exposed to distilled water without nematodes to confirm that the nymphs had no previous contact with the pathogens and that the mortality was caused exclusively by the treatments. After seven days the dead nymphs were dissected and observed under stereomicroscope. Those that contained EPNs were considered to have been killed by these pathogens. The mean mortality figures were submitted to variance analysis and compared by the Tukey test at 5% significance, using the SAS 9.2 (SAS institute) statistical software.

Nymph mortality in greenhouse. Five nymphs of the fourth or fifth instar were placed at the base of a sugarcane seedling (cv. RB739735) planted in a 500mL plastic cup containing soil and cattle manure (1:1) as substrate, with the roots previously exposed, and kept in a greenhouse at an average temperature of 25,5±1°C and relative humidity of 94±5%. After 24 hours, when the nymphs were fully protected by their froth, the nematodes that had presented pathogenicity greater than or equal to 80% in the laboratory assay were applied at a concentration of 200 IJs/nymph in a total volume of 2 mL per cup, using a sprayer adjusted to the squirt mode, with the stream directed at the froth.

There were five repetitions with the strains that had shown 80% or better pathogenicity, for a total of 25 nymphs per treatment. As in the laboratory, there was a control group with five repetitions also, to confirm that the substrate and nymphs used were free of nematodes, so that the nymph deaths could be attributed to the EPNs. The nymphs were monitored daily until emergence of the last adult and the dead ones were dissected and observed under stereomicroscope to determine the presence of nematodes inside, in which case this presence was attributed as the cause of death. As before, the mortality data were submitted to variance analysis and the means were compared by the Tukey test at 5% significance, using the SAS (version 9.2) statistical software. The nymph mortality rates caused by the EPNs were also compared between the laboratory and greenhouse through the Tukey test at the same significance level.

Results

Nymph mortality in laboratory. No nymphs were killed by the nematodes in the control group, confirming that there had been no previous contact between hosts and pathogens and that the results were due to the treatments. All the EPN strains caused mortality to the *M. fimbriolata* nymphs, showing its potential to control by this pest.

Irrespective of concentration, *S. riobravus* produced 90% nymph mortality, followed by *S. carpocapsae*, *S. feltiae* and *H. baujardi* LPP7 (80%), *S. anomali* (70%), *H. amazonensis* RSC5 (68%) and *H. bacteriophora* HP88 (38%). This last strain was statistically inferior to the others (Table 1). The concentrations did not significantly affect the efficiency of the treatments. The lowest of them (200 EPNs/nymph) provided a maximum control level, so there appears to be no need to increase the concentration to achieve the desired effects, whereas the lowest concentration reached statistically the same nymph mortality than the greatest (800 EPNs/nymph).

Table 1. Mortality (%) $\pm$ standard error of *Mahanarva fimbriolata* nymphs in each treatment in the laboratory (n=25).

Strains*	Concentrations (EPNs/nymph)			General average	F	P
	200	400	800			
Sa	68 $\pm$ 16 Aa	68 $\pm$ 12 Ba	76 $\pm$ 12 Aa	70 $\pm$ 8 A	0.18	0.8322
Sc	68 $\pm$ 14 Aa	88 $\pm$ 4 Aa	84 $\pm$ 4 Aa	80 $\pm$ 6 A	0.97	0.3847
Sf	88 $\pm$ 4 Aa	80 $\pm$ 16 Aa	72 $\pm$ 12 Aa	80 $\pm$ 6 A	0.55	0.5777
Sr	88 $\pm$ 4 Aa	96 $\pm$ 4 Aa	88 $\pm$ 8 Aa	90 $\pm$ 4 A	0.18	0.8322
RSC5	80 $\pm$ 16 Aa	56 $\pm$ 8 Ba	68 $\pm$ 16 Aa	68 $\pm$ 8 A	1.24	0.8240
HP88	32 $\pm$ 10 Ba	48 $\pm$ 10 Ba	36 $\pm$ 12 Ba	38 $\pm$ 6 B	0.60	0.5521
LPP7	72 $\pm$ 8 Aa	80 $\pm$ 8 Aa	88 $\pm$ 4 Aa	80 $\pm$ 4 A	0.55	0.5777
General average	70 $\pm$ 4 a	74 $\pm$ 4 a	74 $\pm$ 4 a		0.14	0.8712
F values	3.16	2.57	2.84	7.20		
p values	0.0078	0.0250	0.0147	<0.0001		

Numbers followed by different capital letters in the columns and small letters in the rows differ by the Tukey test ($P < 0.05$).

*Strains used: Sa (*Steinernema anomali*), Sc (*Steinernema carpocapsae*), Sf (*Steinernema feltiae*), Sr (*Steinernema riobris*), RSC5 (*Heterorhabditis amazonensis* RSC5), HP88 (*Heterorhabditis bacteriophora* HP88) and LPP7 (*Heterorhabditis baujardi* LPP7).

Steinernema anomali, *H. bacteriophora* HP88 and *H. amazonensis* RSC5, were less efficient at the intermediate concentration (400 EPNs/nymph), than the other strains at this same concentration. This also occurred for *H. bacteriophora* HP88 at the other concentrations, reflecting its substantially lower efficiency in relation to the strains, considering the average of all concentrations tested.

Nymph mortality in greenhouse. All strains were pathogenic to *M. fimbriolata* nymphs in the greenhouse experiment with the nymph mortality caused by *S. feltiae* (72%), *S. riobris* (68%), *H. baujardi* LPP7 (52%) and *S. carpocapsae* (48%) with no statistical difference between them (Table 2). While there were no significant differences between strains performance within the environments, there were significant differences comparing the influence of the environments on nymph mortality, with lower rates of nymph mortality caused by *S. carpocapsae* ($F = 2.899$, $p = 0.008$) and *H. baujardi* LPP7 ($F = 9.391$, $p = 0.004$) in the greenhouse than in the laboratory (Fig. 1).

Discussion

Nymph mortality in laboratory. The concentrations did not significantly affect the efficiency of the treatments, with the lowest of them providing a maximum control level. A similar finding was reported by Leite *et al.* (2007), testing the virulence of EPNs on *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) (Diptera: Sciariidae), where there was no difference in mortality of the larvae between concentrations of 10 and 50 IJs/cm². However, Vasconcelos *et al.* (2004) found that only the highest concentration tested (1200 IJs/female) was able to significantly reduce the egg mass produced by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). Furthermore, Monteiro *et al.* (2010) reported that the six concentrations tested produced different effects on some reproductive parameters of *R. (B.) microplus* but similar effects on other parameters.

Some strains at the intermediate concentration were less efficient than others at this concentration. This difference can reflect a greater sensitivity of these strains regarding the concentration at which they are applied. This also occurred for

H. bacteriophora HP88 at the other concentrations, reflecting their substantially lower efficiency in relation to the strains, considering the average of all concentrations tested. Our data agree with Leite *et al.* (2005), where strains of *Heterorhabditis* sp. (CB-n5), *Steinernema* sp. (CB-n6) and *Heterorhabditis* sp. (CCA) presented 100%, 98% and 96% efficiency, respectively, when applied at a concentration of 2000 IJs/mL under laboratory conditions, showing that *M. fimbriolata* is susceptible to both EPN genera.

The species *S. riobris*, *S. feltiae*, *S. carpocapsae* and *H. baujardi* LPP7 were the most efficient against *M. fimbriolata* and have also been shown to be promising for use against the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae), the mound-building termite, *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae), the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1979) (Coleoptera: Tenebrionidae) and the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae), respectively, demonstrating the broad spectrum of hosts of these pathogens (Cabanillas 2003; Alves *et al.* 2005; Del-Valle *et al.* 2008).

Moreover, Giometti *et al.* (2011) tested the virulence of 17 EPN strains against another sugar cane pest and founded a maximum of 74.3% of *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) adults mortality with an *Heterorhabditis* strain in laboratory conditions. A similar assay

Table 2. Mortality (%) $\pm$ standard error of *Mahanarva fimbriolata* nymphs caused by entomopathogenic nematode strains applied in greenhouse conditions at a concentration of 200 IJs/nymph (n=25).

Strains	Mortality (%)
<i>Steinernema carpocapsae</i>	48 $\pm$ 5 A
<i>Steinernema feltiae</i>	72 $\pm$ 4 A
<i>Steinernema riobris</i>	68 $\pm$ 4 A
<i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7	52 $\pm$ 2 A
F	2.02
p	0.1650

Numbers followed by different capital letters in the columns differ by the Tukey test ($P < 0.05$).

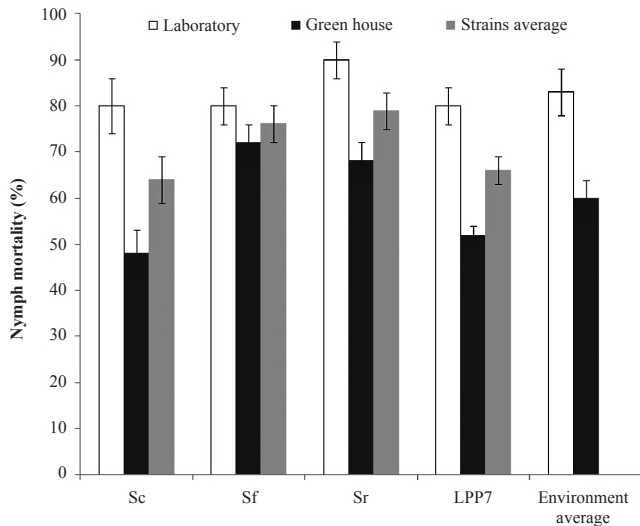


Figure 1. Mortality (%) $\pm$ standard error of *Mahanarva fimbriolata* nymphs caused by entomopathogenic nematodes in the laboratory and greenhouse. Bars followed by capital letters compare the strains average in both environments and small letters compare the mortality reached in each environment by all the strains by the Tukey test ($p < 0.05$) ($n = 25$).

was developed by Tavares *et al.* (2007) with different strains against the same insect and they founded a maximum of 95% of larvae mortality, also with an *Heterorhabditis* strain.

Nymph mortality in greenhouse. No differences were observed between the strains tested in greenhouse. This is possibly because they had been previously selected in the laboratory as being the most virulent. Although they have different foraging strategies (cruisers and ambushers), possibly there was no difference because they were all applied directly on the nymphs' froth, thus minimizing the need either to go find the host or wait for it to approach.

After selecting the most virulent strain against *M. fimbriolata* in the laboratory, Leite *et al.* (2005) tested its efficiency in the field at different concentrations and found that *Heterorhabditis* sp. provided the maximum control of the spittlebugs (70%) irrespective of the concentrations. Both that study and ours thus show the capacity of EPNs for control of root spittlebugs. Furthermore, Tavares *et al.* Machado *et al.* (2005) evaluated EPNs against another sugarcane pest and showed their potential to control *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae) larvae, causing a maximum mortality of 76.43% with a *S. glaseri* strain and even that the nematodes' IJs can penetrate the egg of this coleopteran through its aeropile.

The negative influence of the greenhouse environment can possibly be explained by the fact that the laboratory environment was ideal for them (good substrate for locomotion, constant and optimized temperature/relative humidity, absence of antagonistic organisms, no refuge for the hosts). This was not the case in the greenhouse, where the conditions were chosen to simulate those in the field. Nevertheless, two of the strains tested (*S. feltiae* and *S. riobrave*) maintained high pathogenicity in the greenhouse, indicating they are good candidates for tests in the field. Aiming to know the EPN action against the sugarcane weevil, *S. levis*, Tavares *et al.* (2007), applied two strains in greenhouse after a initial

assay in laboratory, and founded a larvae mortality ranging from 42% to 85%, with these percentages directly related with the EPNs dose. These authors also noted that the laboratory environment provided a higher better condition to the EPNs to show their potential, with higher mortality values in this case. These and our results reinforce the possibility of use of these pathogens to control pests of this crop.

Acknowledgements

The first author wish to thank the Insect Pathology Laboratory of Federal University of Lavras for the entomopathogenic nematodes isolates used in this study, Embrapa Dairy Cattle for the structure to develop this study and Federal University of Juiz de Fora for providing financial support and to Julian Penzi for the spanish version of the abstract.

Cited literature

- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A. S. 2003. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hom., Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. Arquivos do Instituto Biológico 70: 101-103.
- ALVES, L. F. A.; ROHDE, C.; ALVES, V. S. 2005. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotropical Entomology 34: 139-141.
- AUAD, A. M.; SIMÕES, A. D.; PEREIRA, A. V.; BRAGA, A. L. F.; SOBRINHO, F. S.; LÉDO, F. J. S.; PAULA-MORAES, S. V.; OLIVEIRA, S. A.; FERREIRA, R. B. 2007. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42: 1077-1081.
- BATISTA-FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; SANTOS, A. S.; MACHADO, L. A.; ALVES, S. B. 2003. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). Arquivos do Instituto Biológico 70: 309-314.
- CABANILLAS, H. E. 2003. Susceptibility of the boll weevil to *Steinernema riobrave* and other entomopathogenic nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 82: 188-197.
- CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. 1993. Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). Behaviour 126: 3-14.
- DEL VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E. L. S.; SOUZA, R. M.; SAMUELS, R. I. 2008. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae) larvae. Biocontrol Science and Technology 18: 33-41.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; FERREIRA, J. M. G.; CARVALHO, P. A. M. 2001. Influência da época de colheita e do genótipo de cana-de-açúcar sobre a infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae). Neotropical Entomology 30: 145-149.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; GARCIA, V.; PARAZZI, V. J. 2002. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) e de nematóides fitoparasitos na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. Neotropical Entomology 31: 609-614.
- GEORGIS, R.; KOPPENHOFER, A. M.; LACEY, L. A.; BÉLAIR, G.; DUNCAN, L. W.; GREWAL, P. S.; SAMISH, M.; TAN, L.; TORR, P.; VAN TOL, R. W. H. M. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. Biological Control 38: 103-123.

- GIOMETTI, F. H. C.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; SCHMIT, F. S.; BATISTA-FILHO, A.; DELL'ACQUA, R. 2011. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). *Bragantia* 70 (1): 81-86.
- GREWAL, P. S.; LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. F. 1994. Host find behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 108: 207-215.
- GREWAL, P. S.; NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M. M. 2001. Entomopathogenic nematodes: Potential for exploration and use in South America. *Neotropical Entomology* 30: 191-205.
- KAYA, H. K.; GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38: 181-206.
- KAYA, H. K.; STOCK, S. P. 1997. Techniques in insect nematology. In: LACEY LA (ed) *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Academic Press, San Diego. p. 281-234.
- KOPPENHÖFER, A. M.; COWLES, R. S.; COWLES, E. A.; FUZY, E. M.; BAUMGARTNER, L. 2002. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 24: 90-97.
- LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; AGUILLERA, M. M.; RODRIGUES, R. C. D.; NEGRISOLI Jr, A. S. 2002. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Agricultura* 78: 139-148.
- LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; GOULART, R. M.; TAVARES, F. M.; BATISTA-FILHO, A. 2005. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugar cane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology* 34: 785-790.
- LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; BUSSÓLA, R. A.; AMORIM, D. S.; AMBRÓS, C. M.; HARAKAVA, R. 2007. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) contra larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) e persistência de *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992 em substratos orgânicos. *Arquivos do Instituto Biológico* 74: 337-342.
- LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. 2006. Behavioural ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 38: 66-79.
- LOUREIRO, E. S.; BATISTA-FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; PESSOA, L. G. A. 2005. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. *Neotropical Entomology* 34: 791-798.
- MACEDO, I. C. 2005. A energia da Cana-de-açúcar: Doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade. Única - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, São Paulo.
- MACHADO, L. A.; HABIB, M.; LEITE, L. G.; CALEGARI, L. C.; GOULART, R. M.; TAVARES, F. M. 2005. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). *Arquivos do Instituto Biológico* 72: 221-226.
- MADALENO, L. L.; RAVANELI, G. C.; PRESOTTI, L. E.; MUTTON, M. A.; FERNANDES, O. A. MUTTON, M. J. R. 2008. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. *Neotropical Entomology* 37: 68-73.
- MONTEIRO, C. M. O.; PRATA, M. C. A.; FURLONG, J.; FAZA, A. P.; MENDES, A. S.; ANDALÓ, V.; MOINO Jr, A. 2010. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 106: 19-21.
- NEGRISOLI Jr, A. S.; BARBOSA, C. R. C.; MOINO Jr, A. 2008. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. *Nematologia Brasileira* 32: 111-116.
- RAVANELI, G. C.; MADALENO, L. L.; PRESOTTI, L. E.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. 2006. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. *Scientia Agricola* 63: 534-539.
- REIS-MENINI, C. M. R.; PRATA, M. C. A.; FURLONG, J.; SILVA, E. R. 2008. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 103: 15-19.
- SAS Institute Inc. SAS: Version 9.2 for Windows. Cary (NC): SAS Institute, Inc. 2006.
- SOUZA, Z. M.; PAIXÃO, A. C. S.; PRADO, R. M.; CESARIN, L. G.; SOUZA, S. R.; MONTANARI, R. 2008. Produtividade agrícola de variedades de cana-de-açúcar e incidência de broca-comum e cigarrinha da raiz em canavial colhido sem queima. *Bragantia* 67: 413-419.
- TAVARES, F. M.; BATISTA-FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, L. C.; SILVA, A. C.; AMBRÓS, C. M. G. 2007. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e casa-de-vegetação. *Nematologia Brasileira* 31 (1): 12-19.
- VASCONCELOS, V. O.; FURLONG, J.; FREITAS, G. M.; DOLINSKI, C.; AGUILLERA, M. M.; RODRIGUES, R. C. D.; PRATA, M. C. A. 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 94: 201-206.

Received: 23-dec-2010 • Accepted: 12-sep-2011

Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes

Influencia de la temperatura y del tiempo de almacenaje sobre las reservas lipídicas de nemátodos entomopatógenos

VANESSA ANDALÓ¹, ALCIDES MOINO JR.², CLEBER MAXIMINIANO³, VICENTE P. CAMPOS⁴,
and LÚCIA A. MENDONÇA⁵

Abstract: Lipids represent the main source of energy in entomopathogenic nematodes. In the infective juvenile (IJ) phase, the level of such reserves can be influenced by storage, and this may affect their infectivity. The aim of this study was to evaluate the percentage of lipids and the associated infectivity in IJs of *Steinernema carpocapsae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis* sp. JPM4, *Heterorhabditis* sp. CCA and *Heterorhabditis* sp. PI that had been stored under different temperatures (8-28°C) for various times (0 to 180 days). The amounts of lipids present in IJs were evaluated histologically using a colorimetric method, while infectivity was assayed against *Galleria mellonella* larvae. Lipid levels diminished with increasing storage time for all nematodes, but the rates of decrease varied according to storage temperature and species. Lipid reserves were conserved for longer storage periods at 8, 16 and 20°C, while at 24 and 28°C the percentage of lipids decreased rapidly. The infectivities of IJs of *Heterorhabditis* spp. were less tolerant than those of *Steinernema* spp. to temperatures of 8, 24 and 28°C. Thus, while storage at 8°C was optimal for conserving lipid reserves, infectivity was best preserved at temperatures of 16 and 20°C gave rise to the least reduction in infectivities after 180 days of storage. In this way, lipids and infectivity are influenced by different storage temperatures for the species tested. These data are useful for greater success in using entomopathogenic nematodes as biocontrol agents.

Key words: Biological control. Heterorhabditidae. Infectivity. Steinernematidae

Resumen: La principal fuente de energía de los nemátodos entomopatógenos (NEP) en su fase infectiva son los lípidos, el nivel de esas reservas puede estar influenciado por el almacenamiento e interferir en su infectividad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el porcentaje de lípidos en juveniles infectantes (JI) almacenados en diferentes temperaturas y asociar esto con su infectividad. Suspensiones de *Steinernema carpocapsae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis* sp. JPM4, *Heterorhabditis* sp. CCA y *Heterorhabditis* sp. PI fueron incubadas por cero, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días a 8, 16, 20, 24 y 28°C. La cantidad de lípidos se evaluó a través del método colorimétrico. Para cada tratamiento se evaluó la infectividad de los JI en *Galleria mellonella*. Todos nemátodos presentaron reducción de lípidos a lo largo del tiempo, sin embargo, hubo variación de acuerdo con la temperatura. Los nemátodos mantuvieron sus lípidos por mayor tiempo en 8, 16 y 20°C, ya en 24 y 28°C el porcentaje disminuyó rápidamente. Los JI de *Heterorhabditis* se mostraron menos tolerantes a las temperaturas de 8, 24 y 28°C comparados con los del género *Steinernema* en relación a la infectividad. Las temperaturas de 16 y 20°C fueron las que menos afectaron la infectividad al final de los 180 días. De esta manera, los lípidos y la infectividad están influenciados por el almacenamiento a diferentes temperaturas, en las especies experimentadas. Estos datos son de gran utilidad para tener éxito en el uso de nemátodos entomopatógenos como agentes de control biológico.

Palabras clave: Control biológico. Heterorhabditidae. Infectividad. Steinernematidae

Introduction

Entomopathogenic nematodes (EPNs) in the families Steinernematidae and Heterorhabditidae are considered particularly useful in the biological control of insect pests. The ubiquitous distribution of EPNs reflects their ability to adapt and survive under stress conditions, including changes in osmotic tension, temperature or desiccation, and the presence of chemicals and predators (Finnegan *et al.* 1999; Glazer and Salame 2000). The infective juvenile (IJ) of EPNs are specifically adapted to search for insect hosts, and are able to survive in the absence of a host for weeks, or even months through a reliance on energy reserves (Hatab and Gaugler 1999; Qiu and Bedding 2000; Hass *et al.* 2002). Additionally, in order to conserve energy, the IJs of some EPN species become inactive when stored in water (Fitters and Griffin 2004).

The success of EPNs depends largely on their physiology and biochemistry that enables them to achieve efficient control of pests. In this context, the amount of lipid within the body of the IJ greatly influences the viability and infectivity of the nematode (Wright and Perry 2002). Saturated lipids are the most important energy reserves of aerobic nematodes, particularly in IJ, and represent between 11% and 67% of the dry weight of the organism (Barrett and Wright 1998). Neutral fats typically account for more than 70% of the total lipid content of nematodes, with triglycerides being the major storage form (Barrett and Wright 1998; Chitwood 1998). IJs rely on lipids as their sole energy source while searching for a host (Lee and Atkinson 1977; Van Gundy 1985), and a high lipid content therefore allows survival for extended periods. There is evidence that an extended period of storage and a reduction in total lipid content can lead to a decrease

¹ Ph. D, Instituto Federal de Minas Gerais, Department of Agricultural Sciences, C.P. 05, Bambuí, MG, Brazil. E-mail: vanessa.andalo@ifmg.edu.br. Corresponding author. ² Ph. D, Universidade Federal de Lavras, Department of Entomology, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brazil. E-mail: alcino@ufla.br. ³ Ms. Sc., Universidade Federal de Lavras, Nematology Laboratory, Department of Phytopatology, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brazil. E-mail: nema@ufla.br. ⁴ Ph. D, Universidade Federal de Lavras, Nematology Laboratory, Department of Phytopatology, C.P. 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brazil. E-mail: nema@ufla.br. ⁵ Ph. D, Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Rua Marink Veiga, 9, CEP 22221-070, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: luciaamendonca@yahoo.com.br

in the infectivity of IJs (Lewis *et al.* 1995; Hass *et al.* 2002; Fitters and Griffin 2004). Since the levels of storage lipids may be affected by alterations in environmental conditions, it is likely that the supply of different lipids can determine the survival and pathogenicity of IJs (Hatab and Gaugler 1999; Menti *et al.* 2003).

Triglycerides can be analyzed using various chromatographic techniques or by the application of histological methods based on staining with oil red O (Lee 1960; Croll 1972). Chromatographic analysis is time consuming and demands a large number of nematodes, whereas histological assay is straightforward and can be applied to individual specimens. Image analysis has been successfully employed to quantify the degree of oil red O staining, and allows the examination of many samples within a short period (Stamps and Linit 1995). Moreover, results acquired using the staining method has been validated against those obtained by conventional gas chromatography (Patel *et al.* 1997). The method can thus provide specific and conclusive results regarding the utilization of lipid reserves, and was hence selected for application in the present study.

Many of the market difficulties in introducing EPNs are related to low efficacy under unfavorable conditions, application conditions, refrigeration requirements and limited room temperature shelf life (product quality) (Georgis *et al.* 2006). Lipid reserves can affect each of these factors and are therefore an important consideration when developing EPN biological controls. The objective of the present paper was to determine the levels of IJ lipid reserves in different isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* after storage and at different temperatures. Additionally, the association between lipid reserves and IJ infectivity towards larvae of *Galleria mellonella* L., 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) was evaluated.

Materials and Methods

Multiplication of EPNs. Infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mráček, Gerdin & Bedding, 1982 (obtained from North Carolina, USA, soil sample), *Steinernema riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994 (obtained from Texas, USA, soil sample), *Heterorhabditis* sp. JPM4 (from Lavras, MG, Brazil), *Heterorhabditis* sp. CCA (from Araras, SP, Brazil) and *Heterorhabditis* sp. PI (from Piauí, Brazil) were maintained in the form of aqueous suspensions (500 IJs/ml) under biochemical oxygen demand at 16°C.

Multiplication of *G. mellonella* was performed according to the method of Dutky *et al.* (1964). Larvae of *G. mellonella* were bred on a modified artificial diet (Parra 1998). Ten larvae were placed into a Petri dish (9cm diameter) lined with filter paper. An aliquot (1ml) of IJ suspension (diluted in order to provide the equivalent of 20±5 IJ/larvae) was transferred to the filter paper, and the dishes were incubated under BOD at 24±1°C for 72h with a 24h scotophase until the larvae died. The dead larvae were transferred to fresh Petri dishes lined with dry filter paper and maintained for four days following Molina and López (2001) methodology. The larvae were subsequently placed on the inner plate of a modified White trap (White 1927), and the trap was incubated at 24±1°C for 3 to 7 days. Trap water, which contained IJs that had emerged from the host, was collected daily and transferred to a 1L measuring cylinder containing 800ml of distilled water. Adult nematodes and insect fat bodies were separated from the IJs by decanting. The concentration of IJs present in the final suspension was quantified using polystyrene plates normally employed for serological tests, applying 0.1ml of IJ suspension in each well, after ten wells it was obtained the amount of nematodes in 1ml suspension. This process was repeated three times and obtained an average.

Influence of temperature and storage on IJ lipid content and infectivity. The concentrations of neutral lipids present in IJs that had been stored at different temperatures and for various periods were determined using a colorimetric method based on staining with oil red O (Storey 1983). Stain solution was prepared by dissolving 0.5g of the dye in 100ml of absolute alcohol under constant agitation for 15min, followed by filtration through Whatman no. 1 filter paper and storage at 5°C in the dark. Suspensions of IJs (3000 IJs/ml; in 40ml) derived from the various isolates were placed in plastic cups (110 ml) containing distilled water (50 ml) and covered with lids, each perforated with a 2cm diameter hole in order to allow adequate aeration. The cups were then incubated at 8, 16, 20, 24 or 28°C, for 15, 30, 60, 90, 120, 150 or 180 days, under constant darkness. Each treatment was replicated four times. After incubation, the IJ suspension was thoroughly mixed, concentrated to 0.5ml by decantation and transferred to a test tube together with 3 ml of stain solution. The resulting mixture was incubated in a water bath at 60°C for 20min and allowed to cool at room temperature in order to permit the sedimentation of the IJs. The supernatant (*ca.* 2.5ml) was discarded, 3ml of water: glycerine (1:1) solution was added to the concentrated IJ suspension, and the mixture was stored at room temperature until required for histological analysis.

Table 1. Percentage of lipids present during storage of IJs from *Heterorhabditis* sp. CCA for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	87.8 ± 0.51 ABa	88.7 ± 1.27 Aa	83.7 ± 1.58 Ca	84.7 ± 1.35 BCa	73.5 ± 3.63 Da
30	89.8 ± 0.56 Aa	81.6 ± 1.06 Bb	81.7 ± 1.04 Ba	79.9 ± 1.78 Bb	65.8 ± 1.01 Cb
60	81.6 ± 0.40 Ab	76.6 ± 1.16 Bc	68.5 ± 2.34 Cb	61.3 ± 2.45 Dc	52.7 ± 1.56 Ec
90	87.0 ± 1.99 Aa	80.1 ± 1.61 Bbc	70.6 ± 1.93 Cb	28.6 ± 3.58 Dd	21.6 ± 1.67 Ed
120	80.3 ± 1.49 Ab	68.3 ± 1.30 Bd	59.3 ± 1.78 Cc	0.0 ± 0.0 De	0.0 ± 0.0 De
150	68.1 ± 2.54 Ac	58.6 ± 1.65 Be	50.8 ± 0.57 Cd	0.0 ± 0.0 De	0.0 ± 0.0 De
180	55.2 ± 1.55 Ad	51.3 ± 4.9 Bf	47.1 ± 1.67 Cd	0.0 ± 0.0 De	0.0 ± 0.0 De

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

Table 2. Percentage of lipids present during storage of IJs from *Steinernema carpocapsae* for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	85.9 ± 2.67 Aa	82.6 ± 5.56 Aab	82.8 ± 0.46 Aa	68.7 ± 2.04 Ba	70.2 ± 1.46 Ba
30	85.8 ± 3.98 Aab	86.2 ± 2.03 Aa	80.2 ± 1.41 Ba	71.8 ± 1.58 Ca	61.2 ± 3.27 Db
60	78.9 ± 3.00 Acd	68.5 ± 2.37 Bd	65.3 ± 1.62 Bb	49.0 ± 6.62 Cb	37.5 ± 3.26 Dc
90	80.3 ± 1.48 Abc	74.9 ± 2.27 Bc	70.2 ± 1.23 Bb	4.0 ± 0.48 Cc	1.4 ± 2.87 Cd
120	73.5 ± 3.5 Ad	66.7 ± 0.71 Bd	48.2 ± 1.43 Cc	1.7 ± 1.98 Dc	0.2 ± 0.42 Dd
150	63.1 ± 1.85 Be	68.7 ± 2.54 Ad	4.2 ± 7.36 Cd	0.0 ± 0.0 Cc	0.0 ± 0.0 Cd
180	61.3 ± 1.92 Ae	60.5 ± 1.17 Ae	1.2 ± 0.49 Bd	0.0 ± 0.0 Bc	0.0 ± 0.0 Bd

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

Table 3. Percentage of lipids present during storage of IJs from *Heterorhabditis* sp. JPM4 for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	80.9 ± 0.44 ABa	86.6 ± 2.79 Aa	85.5 ± 3.02 ABa	81.4 ± 7.01 ABa	78.4 ± 4.33 Ba
30	80.5 ± 0.94 ABa	84.0 ± 1.75 Aa	80.2 ± 0.43 ABab	76.2 ± 4.37 Ba	73.7 ± 3.11 Ba
60	77.4 ± 1.82 ABa	79.0 ± 1.36 Aab	71.4 ± 7.33 BCc	66.6 ± 3.84 CDb	63.2 ± 3.89 Db
90	61.9 ± 9.01 Ab	65.2 ± 4.37 Ac	69.0 ± 2.50 Ac	30.6 ± 4.48 Bc	5.7 ± 4.44 Cc
120	59.5 ± 2.12 Abc	55.2 ± 2.07 ABd	50.0 ± 1.40 Bd	7.5 ± 7.30 Cd	0.0 ± 0.0 Dc
150	50.8 ± 3.66 Ad	42.4 ± 3.22 Be	40.3 ± 0.84 Be	0.0 ± 0.0 Cd	0.0 ± 0.0 Cc
180	52.5 ± 2.61 Acd	40.1 ± 1.71 Be	21.2 ± 2.68 Cf	0.0 ± 0.0 Dd	0.0 ± 0.0 Dc

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

For each treatment repetition, three stained nematodes, taken randomly from the stored suspension, were placed onto a glass slide and observed and photographed using a trinocular microscope Olympus SZ40. The total IJ body area and the areas corresponding to the red-stained lipids were estimated from the digitized images with the aid of Image Tool for Windows version 3.0 (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas), from which it was possible to determine the percentage of triglycerides in relation to body area.

The effects of storage on the infectivity of IJs towards larvae of *G. mellonella* were evaluated by placing five larvae into a Petri dish (5cm diameter) lined with filter paper and adding a 0.5ml aliquot of IJ suspension that had been treated as described above. Dishes were incubated at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ for 3 days, after which the mortality rates of the larvae were

determined. Each treatment was replicated four times. *Galleria mellonella* larvae were tested as control applying water, without IJ.

The percentage data corresponding to lipid concentration and infectivity of the stored IJs were submitted to variance analysis and to the Tukey test ($p > 0.01$) for comparisons between the means.

Results

Concentration of lipids in IJs after storage at different temperatures. The concentrations of neutral lipids, expressed as percentages of the total body areas of the IJs, varied between the species tested. Maximum values were detected in newly emerged IJs. The average of neutral lipids for newly emerged IJ just before storage were 97.4% for *S.*

Table 4. Percentage of lipids present during storage of IJs from *Heterorhabditis* sp. PI for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	81.2 ± 1.3 Aa	85.7 ± 2.9 Aa	81.3 ± 1.88 Aa	78.6 ± 2.87 Aa	68.1 ± 2.63 Ba
30	79.8 ± 2.08 ABa	81.9 ± 2.93 Aab	77.6 ± 2.54 ABa	73.9 ± 3.74 BCa	68.5 ± 2.06 Ca
60	76.5 ± 2.35 Aa	77.5 ± 1.87 Abc	74.5 ± 3.63 Aab	59.6 ± 1.92 Bb	54.0 ± 2.17 Bb
90	75.7 ± 7.76 Aab	70.4 ± 5.83 Ac	68.8 ± 6.47 Ab	36.3 ± 9.98 Bc	34.3 ± 5.12 Bc
120	68.0 ± 4.54 Abc	44.9 ± 2.9 Bd	39.4 ± 1.46 Bc	4.6 ± 9.27 Cd	0.0 ± 0.0 Cd
150	60.7 ± 3.84 Ac	42.5 ± 2.51 Bde	38.0 ± 1.94 Bc	0.0 ± 0.0 Cd	0.0 ± 0.0 Cd
180	52.0 ± 4.5 Ad	35.0 ± 2.76 Be	13.5 ± 2.66 Cd	0.0 ± 0.0 Dd	0.0 ± 0.0 Dd

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

Table 5. Percentage of lipids present during storage of IJs from *Steinernema riobrave* for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	84.7 ± 1.27 Aa	89.6 ± 2.83 Aa	88.1 ± 3.14 Aa	85.3 ± 4.60 Aa	71.3 ± 8.20 Ba
30	83.4 ± 1.36 Aa	87.6 ± 2.53 Aab	86.3 ± 2.52 Aa	73.4 ± 4.05 Bb	71.4 ± 2.07 Ba
60	83.0 ± 3.90 Aa	81.5 ± 2.31 Ab	78.8 ± 1.32 Ab	69.0 ± 1.19 Bb	58.5 ± 1.61 Cb
90	82.5 ± 0.96 Aa	81.9 ± 0.93 Ab	81.7 ± 2.19 Aab	57.6 ± 2.65 Bc	32.9 ± 2.87 Cc
120	80.5 ± 2.71 Aab	61.5 ± 1.31 Bc	43.1 ± 10.6 Cc	29.3 ± 3.54 Dd	26.8 ± 1.91 Dc
150	78.4 ± 2.96 Aab	53.6 ± 2.38 Bd	35.2 ± 3.06 Cd	8.7 ± 1.79 De	0.0 ± 0.0 Ed
180	75.0 ± 1.41 Ab	38.4 ± 4.47 Be	32.3 ± 3.25 Cd	9.8 ± 0.52 De	0.0 ± 0.0 Ed

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

riobrave, 90.3% for *S. carpocapsae*, 89.2% for *Heterorhabditis* sp. PI, 88.6% for *Heterorhabditis* sp. CCA and 90.7% for *Heterorhabditis* sp. JPM4.

The intensity of the lipid stain was stronger in the area of the intestine and lighter in the anterior portion, with irregular spots distributed throughout the body (Fig. 1). For all of the nematodes studied, the percentage of lipids generally diminished with time, although there were variations in the rate of decrease depending on the temperature of storage on the EPN. At temperatures between 8 and 20°C, the IJs conserved lipid reserves longer, whereas between 24 and 28°C, the percentage of lipids diminished rapidly. After 180 days at 24 and 28°C the reserves of lipids were reduced to < 50% in 90 days, and were almost completely depleted after 120 days (Tables 1-5). Between 8 and 16°C, the IJs were motionless, and for *S. carpocapsae* it was possible to observe that the typical "J" form. In contrast, between 20 and 28°C, the IJs were in constant motion. Hence, the maintenance of lipid reserves was more efficient when IJs were stored at 8 or 16°C, independent of species or strain, even when the IJs were dead.

Infectivity of IJs after storage at different temperatures.

For all of the nematodes studied, the IJs stored for 0 days showed the highest mortality rates towards larvae of *G. mellonella*. For *Heterorhabditis* sp. PI, *S. carpocapsae* and *S. riobrave* these mortality rates were 100%, for *Heterorhabditis* sp. CCA was 95% and for *Heterorhabditis* sp. JPM4

was 97.5%. The percentage infectivity of IJs diminished upon storage, but the rate of reduction varied according to storage temperature and EPN. At temperatures of 24 and 28°C, the ability of all nematodes to infect insect larvae typically diminished after just 15 days storage. On the other hand, the infectivities of IJs from *S. carpocapsae* and *S. riobrave* were unaffected by storage at 8°C for up to 90 days, although those of IJs from the *Heterorhabditis* species were greatly reduced after 15 days of incubation under such conditions. Indeed, IJs from *Heterorhabditis* sp. CCA were no longer able to infect *G. mellonella* larvae after 60 days of storage at 8°C. Thus, the IJs from *Heterorhabditis* isolates were less tolerant to both the lowest (8°C) and the highest (24 and 28°C) temperatures tested in comparison with those from *Steinernema* species.

The most favorable temperature for the maintenance of EPN infectivity was estimated to be between 16 and 20°C, since the percentage infectivities after an incubation period of 180 days were 72.5% for *S. carpocapsae*, 70.0% for *S. riobrave* and 62.5% for *Heterorhabditis* sp. CCA with storage at 16°C, and 40% for *Heterorhabditis* sp. PI, 60.0% for *Heterorhabditis* sp. CCA and 67.5% for *Heterorhabditis* sp. JPM4 with storage at 20°C (Tables 6-10).

Correlation between lipid content and infectivity. In the case of IJs from the two *Steinernema* species, a direct correlation could be established at all storage temperatures between

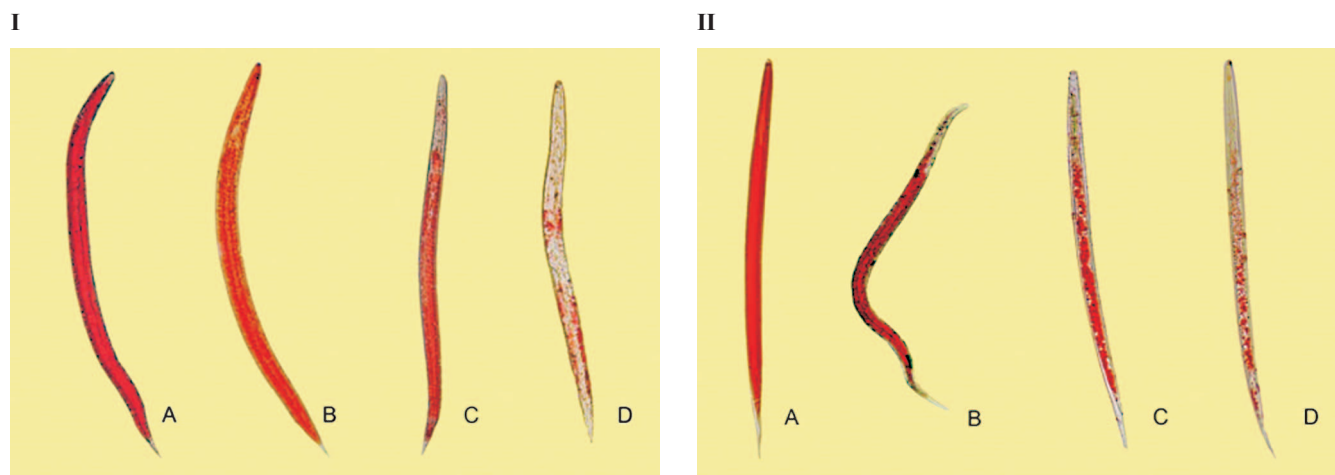


Figure 1. Variations in the concentration of lipids present in infective juveniles of *Heterorhabditis* sp. JPM4 **I** and *Steinernema riobrave* **II**, as determined by oil red O staining, after storage at **A**, 15 days at 8°C; **B**, 180 days at 8°C; **C**, 15 days at 28°C; and **D**, 180 days at 28°C.

Table 6. Percentage infectivity to larvae of *Galleria mellonella* during storage of IJs from *Heterorhabditis* sp. CCA for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	92.5 ± 5.0 Aa	97.5 ± 5.0 Aab	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
30	0.0 ± 0.0 Bb	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
60	0.0 ± 0.0 Bb	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
90	0.0 ± 0.0 Cb	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	70.0 ± 8.16 Bb	0.0 ± 0.0 Cb
120	0.0 ± 0.0 Bb	87.5 ± 12.5 Ab	82.5 ± 12.5 Ab	0.0 ± 0.0 Bc	0.0 ± 0.0 Bb
150	0.0 ± 0.0 Bb	67.5 ± 9.57 Ac	70.0 ± 11.5 Ac	0.0 ± 0.0 Bc	0.0 ± 0.0 Bb
180	0.0 ± 0.0 Bb	62.5 ± 9.57 Ac	60.0 ± 8.16 Ac	0.0 ± 0.0 Bc	0.0 ± 0.0 Bb

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

lipid content and infectivity, i.e. as the percentage of lipids in the nematode body diminished, the infectivity to *G. mellonella* larvae tended to decrease. With respect to the *Heterorhabditis* isolates, however, there was an inverse correlation at 8°C, thus, despite a high lipid content infectivity was lost after 60 days of storage.

After 180 days of incubation at 16°C all IJs, except for those derived from *Heterorhabditis* sp. PI, induced > 50% mortality in *G. mellonella* larvae. For *S. carpocapsae* and *S. riobrave*, the percentage infectivities were < 50% when the lipid reserves fell below 20% and 32%, respectively. After incubation at 8°C, all *Heterorhabditis* isolates presented low infectivities even when the lipid content was high. Thus, IJs from *Heterorhabditis* spp. PI, CCA and JPM4 that had been stored for 180 days at 8°C could not induce mortality in *G. mellonella* larvae although their lipid contents were 70%, 80% and 77%, respectively. At storage temperatures > 8°C, infectivities of around 50% were attained by IJs from *Heterorhabditis* spp. PI, CCA and JPM4 that exhibited lipid contents of < 46%, 15% and 15%, respectively. Hence, although the lipid reserves of *Heterorhabditis* nematodes were adequately preserved at 8°C, the infectivities of the IJs were not.

Discussion

According to Grewal (2000), *S. carpocapsae* is able to survive longer in water at 5°C than other nematodes because it adopts a “J” form, thus becoming quiescent and conserving energy. The differential thermo-adaptation of some nematodes is associated with the accumulation of trehalose lipid,

a non-reducing disaccharide that plays a role in the maintenance of virulence during acclimatization to low (5°C) or high (35°C) temperatures (Jagdale and Grewal 2003). The amount of trehalose accumulated by different nematodes varies with temperature, and this may confer specific advantages to certain species, as revealed in the present study for *Steinernema* sp. in which lipid reserves were preserved for longer periods at all temperatures tested.

Some IJs become inactive in water in order to conserve energy, and this ability also varies with species. Several studies have shown that the percentage of inactive IJs in water is greater for *S. carpocapsae* than for *S. glaseri* or *H. bacteriophora* (Lewis *et al.* 1995; Fitters and Griffin 2004). Additionally, a significant increase in infectivity towards *G. mellonella* larvae was reported for *H. megidis* IJs in the first two weeks of storage in water, after which infectivity declined (Fitters and Griffin 2004).

Molecular studies of genetic modulation have revealed that IJ stress response is associated with proteins involved in desiccation that are differentially regulated by more than 30 genes, thus determining a differential capacity for adaptation to extreme environments such as excessive salt concentrations, excessive temperature oscillations and low humidity. The response to stress selects for IJ populations that are genetically adapted to survive under severe conditions (Serwe-Rodriguez *et al.* 2004; Bornstein-Forst *et al.* 2005), as is the case for some *Steinernema* species that are well adapted to resist large oscillations of temperature.

The levels lipids in *Heterorhabditis* isolates varied less than in *Steinernema* isolates, and some of the lipids found in

Table 7. Percentage infectivity to larvae of *Galleria mellonella* during storage of IJs from *Steinernema carpocapsae* for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
30	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
60	95.0 ± 5.77 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
90	90.0 ± 8.16 ABab	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	82.5 ± 5.0 Bb	27.5 ± 9.57 Cb
120	80.0 ± 8.16 Bb	95.0 ± 5.77 Aab	90.0 ± 8.16 ABa	0.0 ± 0.0 Cc	0.0 ± 0.0 Cc
150	65.0 ± 12.9 Bc	82.5 ± 17.0 Abc	50.0 ± 8.16 Cb	0.0 ± 0.0 Dc	0.0 ± 0.0 Dc
180	52.5 ± 17.0 Bc	72.5 ± 17.0 Ac	47.5 ± 5.0 Bb	0.0 ± 0.0 Cc	0.0 ± 0.0 Cc

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

Table 8. Percentage infectivity to larvae of *Galleria mellonella* during storage of IJs from *Heterorhabditis* sp. JPM4 for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	77.0 ± 8.71 Ba	95.0 ± 10.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
30	7.5 ± 9.57 Bb	100.0 ± 0.0 Aa	95.0 ± 10.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
60	0.0 ± 0.0 Bb	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
90	0.0 ± 0.0 Cb	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	87.5 ± 9.57 Bb	0.0 ± 0.0 Cb
120	0.0 ± 0.0 Bb	65.0 ± 5.77 Ab	70.0 ± 8.16 Ab	0.0 ± 0.0 Bc	0.0 ± 0.0 Bb
150	0.0 ± 0.0 Bb	60.0 ± 8.16 Ab	67.5 ± 15.0 Ab	0.0 ± 0.0 Bc	0.0 ± 0.0 Bb
180	0.0 ± 0.0 Cb	55.0 ± 12.9 Bb	67.5 ± 9.57 Ab	0.0 ± 0.0 Cc	0.0 ± 0.0 Cb

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

the latter were typically either not present or present only in small amounts in the former. Additionally, *Steinernema* nematodes survived longer than *Heterorhabditis* species from which the lipids were depleted more rapidly. In all species of *Steinernema*, a reduction in lipid reserves was observed from the fourth week onwards with storage at 23°C, and from the fifth week onwards with storage at 20°C (Lewis *et al.* 1995; Patel *et al.* 1997; Fitters *et al.* 1999). The levels of lipids reserves observed in the newly-emerged IJ populations were similar (i.e. between 80% and 96%) to those reported for *S. feltiae* and *H. megidis* in which IJs of the former survived for 16 to 20 weeks whilst those of the latter survived for only 12 weeks and with declining viability (Patel and Wright 1997). The present study thus corroborates these previous reports since the percentage of lipids in *Heterorhabditis* isolates stored at 24°C diminished from the 30th day onwards at a rate that was much higher than that observed for *Steinernema* species. It has been reported that *S. carpocapsae* can regulate the water content of its membranes depending on the temperature (Fodor *et al.* 1994), whilst *S. riobrave* accumulates large proportions of unsaturated fatty acids at high temperatures (Hatab and Gaugler 1999), characteristics that contribute to the thermo-tolerance of these species.

According to Patel *et al.* (1997), the survival of *S. carpocapsae* and *S. riobrave* varies between 120 and 135 days, the infectivities of *S. riobrave*, *S. feltiae* and *S. glaseri*, decline as the lipid reserves are depleted. Moreover, the sizes of the IJs and the initial amounts of lipid present in their bodies appear to be related to survival and the manner in which the organisms use energy reserves. Thus smaller nematodes, like those

S. carpocapsae and *S. riobrave*, utilize their lipids more rapidly than larger IJs like those of *S. feltiae* and *S. glaseri* (Patel *et al.* 1997). In the present study, however, the infectivity of *S. carpocapsae* IJs was maintained even when lipid reserves were low, suggesting that nematode populations are quite heterogeneous and are able to use such reserves for different purposes. Furthermore, the present findings demonstrated the importance of locomotive activity of IJs during storage in water and the significance of the quiescent form for minimizing the use of energy.

Steinernema carpocapsae IJs exhibited a rapid decline in infectivity after 90 days of storage, which is similar to the findings of Wright *et al.* (1997). These authors emphasized that the use of glycogen as energy reserve ceases earlier on whilst the lipid reserves continue for a much longer period, perhaps explaining the initial rapid decrease in the infectivity of *S. carpocapsae*. In *Heterorhabditis* IJs, a direct relationship between infectivity and the percentage of lipids was also observed, as previously reported by Hass *et al.* (2002).

As stated by Wright and Perry (2002) the efficacy of the selection of EPN isolates that are already adapted for commercial use depends on a comprehensive knowledge of their physiological and biochemical attributes. Clearly the quality and quantity of lipids present in the IJs are of utmost importance, since such energy reserves critically influence the viability and infectivity of EPNs.

Conclusions

Thus, this paper presents the importance of lipid reserves for IJs, showing that temperature directly influences its variation

Table 9. Percentage infectivity to larvae of *Galleria mellonella* during storage of IJs from *Heterorhabditis* sp. PI for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	87.5 ± 15.0 Ba
30	70.0 ± 11.5 Bb	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	90.0 ± 14.1 Aa
60	0.0 ± 0.0 Cc	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	92.5 ± 9.57 ABa	85.0 ± 12.6 Bab
90	0.0 ± 0.0 Bc	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	87.5 ± 12.6 Aa	0.0 ± 0.0 Bc
120	0.0 ± 0.0 Bc	67.5 ± 9.57 Ab	70.0 ± 8.16 Ab	0.0 ± 0.0 Bb	0.0 ± 0.0 Bc
150	0.0 ± 0.0 Cc	47.5 ± 5.0 Bc	62.5 ± 9.57 Ab	0.0 ± 0.0 Cb	0.0 ± 0.0 Cc
180	0.0 ± 0.0 Bc	30.0 ± 8.16 Ad	39.2 ± 12.9 Ac	0.0 ± 0.0 Bb	0.0 ± 0.0 Bc

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

Table 10. Percentage infectivity to larvae of *Galleria mellonella* during storage of IJs from *Steinernema riobrave* for 15 to 180 days at different temperatures.

Day	Temperature (°C)				
	8	16	20	24	28
15	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa
30	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	97.5 ± 5.0 Aab	95.0 ± 10.0 Aa
60	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	92.5 ± 9.57 Aab	90.0 ± 14.1 Aa
90	97.5 ± 5.0 ABa	100.0 ± 0.0 Aa	100.0 ± 0.0 Aa	82.5 ± 9.57 Bb	40.0 ± 8.16 Cb
120	87.5 ± 9.57 Aa	90.0 ± 8.16 Aab	80.0 ± 8.16 Ab	60.0 ± 8.16 Bc	47.5 ± 15.0 Bb
150	67.5 ± 12.5 Ab	80.0 ± 14.1 Abc	70.0 ± 18.2 Abc	32.5 ± 12.5 Bd	0.0 ± 0.0 Cc
180	62.5 ± 12.5 Ab	70.0 ± 14.1 Ac	62.5 ± 9.57 Ac	0.0 ± 0.0 Be	0.0 ± 0.0 Bc

Means followed by the same small letter within columns and same capital letter within lines are not significantly different by the Tukey test ($p > 0.01$).

and correlates the decline of the reserve to a decrease in infectivity for all species tested. By using this information it is possible to handle properly the situations for greater success in using EPNs.

Cited Literature

- BARRETT, J.; WRIGHT, D. J. 1998. Intermediary metabolism. p. 331-353. En: Perry, R. N.; Wright, D. J. (eds.). The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. CAB International. Wallingford. 448 p.
- BORNSTEIN-FORST, S.; KIGER, H.; RECTOR, A. 2005. Impacts of fluctuating temperature on the development and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* A10. Journal of Invertebrate Pathology 88 (2): 147-153.
- CHITWOOD, D. J. 1998. Biosynthesis. p. 303-330. En: Perry, R. N.; Wright, D. J. (eds.). The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. CAB International. Wallingford. 448 p.
- CROLL, N. A. 1972. Energy utilization of infective *Ancylostoma tubaeforme* larvae. Parasitology 64 (3): 355-368.
- DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. Journal of Insect Pathology 6 (4): 417-422.
- FINNEGAN, M.; DOWNES, M. J.; O'REGAN, M.; GRIFFIN, C. T. 1999. Effect of salt and temperature stresses on survival and infectivity of *Heterorhabditis* spp. infective juveniles. Nematology 1 (1): 69-78.
- FITTERS, P. F. L.; GRIFFIN, C. T. 2004. Spontaneous and induced activity of *Heterorhabditis megidis* infective juveniles during storage. Nematology 6 (6): 911-917.
- FITTERS, P.; PATEL, M. N.; GRIFFIN, C. T.; WRIGHT, D. J. 1999. Fatty acid composition of *Heterorhabditis* sp. during storage. Comparative Biochemistry and Physiology 124 (1): 81-88.
- FODOR, A.; DEY, I.; FARKAS, T.; CHITWOOD, D. J. 1994. Effects of temperature and dietary lipids on phospholipid fatty acids and membrane fluidity in *Steinernema carpocapsae*. Journal of Nematology 26 (3): 278-285.
- GEORGIS, R.; KOPPENHÖFER, A. M.; LACEY, L. A.; BÉLAIR, G.; DUNCAN, L. W.; GREWAL, P. S.; SAMISH, M.; TAN, L.; TORR, P.; VAN TOL, R. W. H. M. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. Biological Control 38 (1): 103-123.
- GLAZER, I.; SALAME, L. 2000. Osmotic survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. Biological Control 18 (3): 251-257.
- GREWAL, P. S. 2000. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). International Journal for Parasitology 30 (14): 995-1000.
- HASS, B.; DOWNES, M. J.; GRIFFIN, C. T. 2002. Persistence of four *Heterorhabditis* spp. isolates in soil: role of lipid reserves. Journal of Nematology 34 (2): 151-158.
- HATAB, M. A.; GAUGLER, R. 1999. Lipids of in vitro cultured *Heterorhabditis bacteriophora*. Biological Control 15 (3): 113-118.
- JAGDALE, G. B.; GREWAL, P. S. 2003. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. International Journal for Parasitology 33 (2): 145-152.
- LEE, D. L. 1960. The distribution of glycogen and fat in *Thelastoma bulhøsi* (Magalhães, 1900), a nematode parasitic in cockroaches. Parasitology 50: 247-259.
- LEE, D. L.; ATKINSON, H. J. 1977. Physiology of nematodes. Columbia University, New York. 215 p.
- LEWIS, E. E.; SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. 1995. Changes in foraging behaviour during the infective stages of entomopathogenic nematodes. Parasitology 110: 583-590.
- MENTI, H.; PATEL, M. N.; WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. 2003. Lipid utilisation during storage of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* from Greece and the UK. Nematology 5 (1): 31-37.
- MOLINA, J. P.; LÓPEZ, N. J. C. 2001. Producción in vivo de tres entomoparásitos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. Revista Colombiana de Entomología 27 (1-2): 73-78.
- PARRA, J. R. P. 1998. Criação de insetos para estudos com patógenos. p. 1015-1037. En: Alves, S. B. (ed.). Controle microbiano de insetos. FEALQ. Piracicaba. 1163 p.
- PATEL, M. N.; WRIGHT, D. J. 1997. Phospholipid fatty acid composition in steinernematid entomopathogenic nematodes. Comparative Biochemistry and Physiology 118 (3): 649-657.
- PATEL, M. N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D. J. 1997. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. Parasitology 114: 489-496.
- QIU, L.; BEDDING, R. 2000. Energy metabolism and its relation to survival and infectivity of infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under aerobic conditions. Nematology 2: 551-559.
- SERWE-RODRIGUEZ, J.; SONNENBERG, K.; APPLEMAN, B.; BORNSTEIN-FORST, S. 2004. Effects of in host desiccation on development, survival, and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. Journal of Invertebrate Pathology 85 (3): 175-181.
- STAMPS, T. W.; LINIT, M. J. 1995. A rapid and simple method for staining lipid in fixed nematodes. Journal of Nematology 27 (2): 244-247.
- STOREY, R. M. J. 1983. The initial neutral lipid reserves of juveniles of *Globodera* spp. Nematologica 29 (2): 144-150.
- VAN GUNDY, S. D. 1985. Ecology of *Meloidogyne* spp.- emphases on environmental factors affecting survival and pathogenicity. p. 177-182. En: Sasser, J. N.; Carter, C. C. (eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. North Carolina State University Graphics. Raleigh. 111 p.
- WHITE, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66 (1709): 302-303.
- WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. 2002. Physiology and biochemistry. p. 145-168. En: Gaugler R. (ed.). Entomopathogenic nematology. CAB International. Wallingford. 388 p.
- WRIGHT, D. J.; GREWAL, P. S.; STOLINSKI, M. 1997. Relative importance of neutral lipids and glycogen as energy stores in dauer larvae of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae*. Comparative Biochemistry and Physiology 118 (2): 269-273.

Received: 21-ene-2011 • Accepted: 9-jun-2011

Dispersión de *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitando *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) en tomate bajo invernadero

Dispersion of *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitizing *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) on greenhouse tomato crops

DIANA ELIZABETH PÉREZ M.¹, FERNANDO CANTOR R.², DANIEL RODRÍGUEZ C.³ y JOSÉ RICARDO CURE²

Resumen: Hacia el año 2003 el número de hectáreas sembradas con tomate en Colombia era de 16.000. Con el aumento del área sembrada también aumentó el efecto de plagas como la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*, capaz de causar pérdidas en el rendimiento hasta de 50%. Los métodos más usados para el control de esta plaga son el uso de insecticidas, prácticas culturales como el deshoje, trampas de pegante amarillas y el uso de enemigos naturales como *Encarsia formosa*. Aunque se ha demostrado la eficiencia de este parasitoide, no se ha determinado la distancia máxima en la que el parasitismo alcanza niveles efectivos. Con este propósito se efectuó un ensayo de liberación de *E. formosa* con base en la respuesta funcional, distribución y densidad de la plaga en cada uno de los puntos de muestreo del cultivo. En zonas donde se encontraron focos con densidades mayores de mosca blanca se liberaron más parasitoides y en consecuencia los porcentajes de parasitismo fueron superiores al resto del área. El radio de acción de este parasitoide es de 8 a 10 m con un parasitismo máximo de 47,27%.

Palabras clave: Mosca blanca de los invernaderos. Control biológico. Parasitismo.

Abstract: In 2003 the number of hectares with tomato crops in Colombia, was over 16,000. With the increase of the cultivated area, the number of plagues such as the white fly of the greenhouses, *Trialeurodes vaporariorum*, also increased. The most common methods for the control of the white fly are the use of insecticides, cultural practices like defoliation, yellow sticky traps and, the use of natural enemies like *Encarsia formosa*. Although the efficiency of this parasitoid has been demonstrated, the determination of the maximum distance in which the parasitism reaches effective levels, was needed. In order to reach this objective, *E. formosa* was released based on its functional response, and according to the distribution and density of the plague in each sampling point. In those areas where higher densities of white fly were found, more parasitoids were released. As a result the percentage of parasitism was higher compared with the rest of the area. A radio of action between 8 to 10 m was found for this parasitoid, with a maximum parasitism of 47.27%.

Keywords: White fly. Biological control. Parasitism.

Introducción

El tomate *Solanum lycopersicon* L., 1753 es una de las hortalizas más cultivadas y actualmente Colombia ocupa el lugar 41 en producción con 16.000 hectáreas 20% de las cuales se producen bajo cubierta (FAO 2007). Con el aumento del área sembrada de esta hortaliza también se ha incrementado el número e incidencia de plagas de importancia económica para este cultivo. Dentro de las plagas más importantes se encuentran la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Pedigo y Rice 2006) es una de las principales plagas del cultivo de tomate (Suárez y López 1992; De Vis 2001) debido a que los adultos e inmaduros succionan la savia de las hojas lo que debilita la planta e impide el desarrollo normal de los frutos (Escobar y Lee 2001; Rodríguez y Cardona 2001). Adicionalmente los inmaduros generan una sustancia azucarada llamada mielecilla que propicia el desarrollo del hongo negro conocido como fumagina (Salmeron 1991). Cuando las hojas son cubiertas por esta sustancia se reduce el área fotosintéticamente activa (Rodríguez *et al.* 1996). Si se alcanzan densidades elevadas de esta plaga el hongo alcanza los frutos, reduciendo la actividad del enemigo natural (Madrigal 2001) por lo cual requieren un manejo post cosecha que incrementa el precio del producto y reduce la calidad del fruto.

Esta plaga es controlada comúnmente con insecticidas y se ha demostrado que su uso en Colombia ha sido excesivo; cerca del 70% de los agricultores de nuestro país usan este método como única alternativa (Cardona *et al.* 2005). Las aplicaciones de insecticidas se hacen de forma regular teniendo en cuenta umbrales de acción definidos en cultivos como habichuela (Cardona *et al.* 1993) y en muchos casos hasta tres veces por semana, esto tiene implicaciones en la salud humana y los recursos naturales (Dent 2000), además de reducir el efecto de enemigos naturales y aumentar la probabilidad de aparición de resistencia de la plaga a las sustancias activas de los insecticidas (Cardona *et al.* 2005; Dent 2000).

Las hembras de *E. formosa* controlan las poblaciones del insecto inmaduro pues parasitan ninfas de tercer instar (Hussey y Scopes 1985) y entre tres o cuatro semanas después emerge el adulto del parasitoide. Adicionalmente el adulto de *E. formosa* se alimenta de ninfas de segundo instar (Soto *et al.* 2001; Martin 1999; Van Lenteren 2003). El control biológico de *T. vaporariorum* con *E. formosa* está bien descrito en la literatura y su efectividad se ha demostrado en países de Europeos (Hoddle *et al.* 1998; Salmeron 1991). Sin embargo, los criterios de liberación reportados en dichas localidades no son necesariamente aplicables a las condiciones de establecimiento de mosca blanca de los invernaderos en países como Colombia. Un criterio relevante en la práctica es la distancia

¹ Bióloga Facultad de Ciencias Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia. diana.perez@unimilitar.edu.co Autora para correspondencia. ² Ph.D. Docentes Facultad de Ciencias Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia. ecologia@unimilitar.edu.co. ³ M.Sc. Docente Facultad de Ciencias Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia. ecologia@unimilitar.edu.co.

máxima a la cual los individuos son efectivos luego de la liberación, pues una misma cantidad de parasitoides podría tener diferentes niveles de efectividad dependiendo de su distribución en el campo. Teniendo en cuenta estos aspectos, se determinó el radio de dispersión de *E. formosa* como uno de uno de los parámetros de liberación para mejorar el modo de acción de este parasitoide en un cultivo comercial de tomate en Boyacá, Colombia.

Materiales y Métodos

El presente trabajo se desarrolló en un invernadero de 4.500 m² sembrado con tomate, ubicado a 1 km de Sutamarchán, en el Departamento de Boyacá (Colombia), entre los meses de febrero y abril de 2008. Para la toma de datos se usó una cuadrícula imaginaria de 840 m² con 180 puntos de muestreo separados entre sí cada uno a 2m (Fig. 1). En cada punto se marcó una planta en la que se estimó la densidad de ninfas de tercer instar de mosca blanca y el porcentaje de parasitismo de *E. formosa* durante todo el desarrollo del ensayo.

En este trabajo se hizo una modificación de la metodología descrita por Bernal *et al.* (2008), para el monitoreo directo de ninfas de tercer instar de mosca blanca de los invernaderos, con el fin de evaluar la mayor cantidad de muestras posibles en una sola fecha de muestreo, se muestrearon dos hojas por estrato por planta por punto de muestreo. Semanalmente se contó el número promedio de ninfas de tercer instar y el número de hojas presentes en cada uno de los estratos. Los datos se ingresaron al modelo diseñado por Bernal *et al.* (2008) con el fin de estimar el número de ninfas en toda la planta.

Para el análisis de los datos se usó el software GS+ (Gamma Design Software 2002) versión 5.0 (Demo) (Liebhold *et al.* 1993). Este programa genera un mapa de distribución espacial de la densidad de mosca blanca teniendo en cuenta la semivarianza del número de ninfas de mosca blanca por planta ingresados (Ludwig y Reynolds 1988). El tamaño de los focos se estableció usando las coordenadas en X y Y de los cuatro puntos más extremos, asumiendo para los mismos una forma rectangular. La densidad de la plaga fue determinada usando el valor de la variable Z (ninfas/planta) mostrada por el programa en el foco, Z fue multiplicada por la densidad de siembra del cultivo (3,3 plantas/m²) y el área del foco. Con esta información y teniendo en cuenta

la máxima capacidad parasítica de *E. formosa* (1:17, Parasitoide: plaga) (Aragón *et al.* 2008) se estimó el número de parasitoides que fueron llevados a campo. Los parasitoides fueron liberados en grupos de 120 pupas dispuestas en dispensadores en los que se garantiza la emergencia de 100 adultos.

Tres días después de establecer la densidad de ninfas en cada foco se liberaron los parasitoides y de cuatro a cinco semanas después se contó el número de ninfas de mosca blanca melanizadas (oscuras) y el número de ninfas totales para determinar el porcentaje de parasitismo promedio en cada punto. Estas evaluaciones se hicieron teniendo en cuenta las recomendaciones de Aragón *et al.* (2008) quienes encontraron que 26 días después de la liberación se evidencia un bajo porcentaje de parasitismo (Cerca del 30%), mientras que 70 días después de la misma liberación se encuentran valores máximos de 72% de parasitismo. Los datos de esta variable también fueron analizados en el programa GS+ para determinar su distribución espacial. Por último con ayuda del mismo programa se generaron cuatro semivariogramas a partir de los cuales se obtuvo la distancia máxima de parasitismo.

Resultados y Discusión

Para la primera semana las densidades de mosca blanca fueron inferiores a las tres semanas siguientes (Figs. 2A, 3), por lo cual fue usada una escala diferente. Así las máximas densidades de la plaga para esta semana se encontraron en los bordes del invernadero con valores entre 529 y 562 ninfas de tercer instar/planta. En la misma figura también se observa que en toda el área muestreada se encontraron seis focos que fueron las zonas donde se hicieron las liberaciones para la primera semana.

Para la segunda semana de evaluación (Figs. 2B, 3) las densidades de la plaga alcanzaron hasta los 4,500 individuos/planta en las afueras de los focos uno y dos con áreas de 7,14m² y 2,06m² respectivamente. Para los puntos tres, cuatro y cinco se encontró que las densidades de ninfas de tercer instar de mosca blanca no superan las 3,500 ninfas/planta. Adicionalmente se observó que los bordes del invernadero son las zonas donde se encontraron las densidades de ninfas de *T. vaporariorum* más elevadas. Para esta semana se hizo la liberación de 6,500 y 1,500 pupas/foco de *E. formosa* en los puntos uno y dos respectivamente.

La figura 2C muestra un aumento importante en la densidad en tres de los focos para la tercera semana de evaluación. Por ejemplo, en el foco uno la densidad de mosca blanca pasó de 4,500/planta ninfas de tercer instar de mosca blanca en la semana dos a 17,6204 ninfas en la tercera semana (aumento del 62%) (Fig. 5). Para el foco dos se observa que pasa de una densidad de 5,000 a casi 14,000 ninfas/planta.

Por último en la cuarta semana de muestreo se ven tres focos de mosca blanca, los focos uno y tres son los mismos de las semanas dos y tres, mientras que el foco número dos se encuentra un poco más hacia el interior del invernadero. Para la cuarta semana la densidad de mosca blanca en el foco uno fue de 12,9128 ninfas/foco mientras que para la semana anterior fue de 17,6204 ninfas/foco y fueron liberadas 7,599/foco y 10,364/foco pupas del parasitoide, respectivamente. Esta diferencia en las densidades de mosca blanca entre semanas se pudieron haber originado por movimientos de adultos de la plaga hacia el interior del invernadero en semanas anteriores (Fig. 2D).

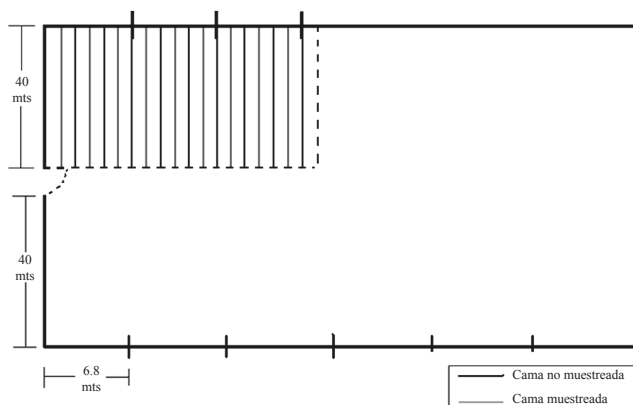


Figura 1. Esquema del invernadero donde se realizó el ensayo. La línea punteada indica el área del cultivo que fue muestreada, y las líneas indican las camas muestreadas y las no muestreadas.

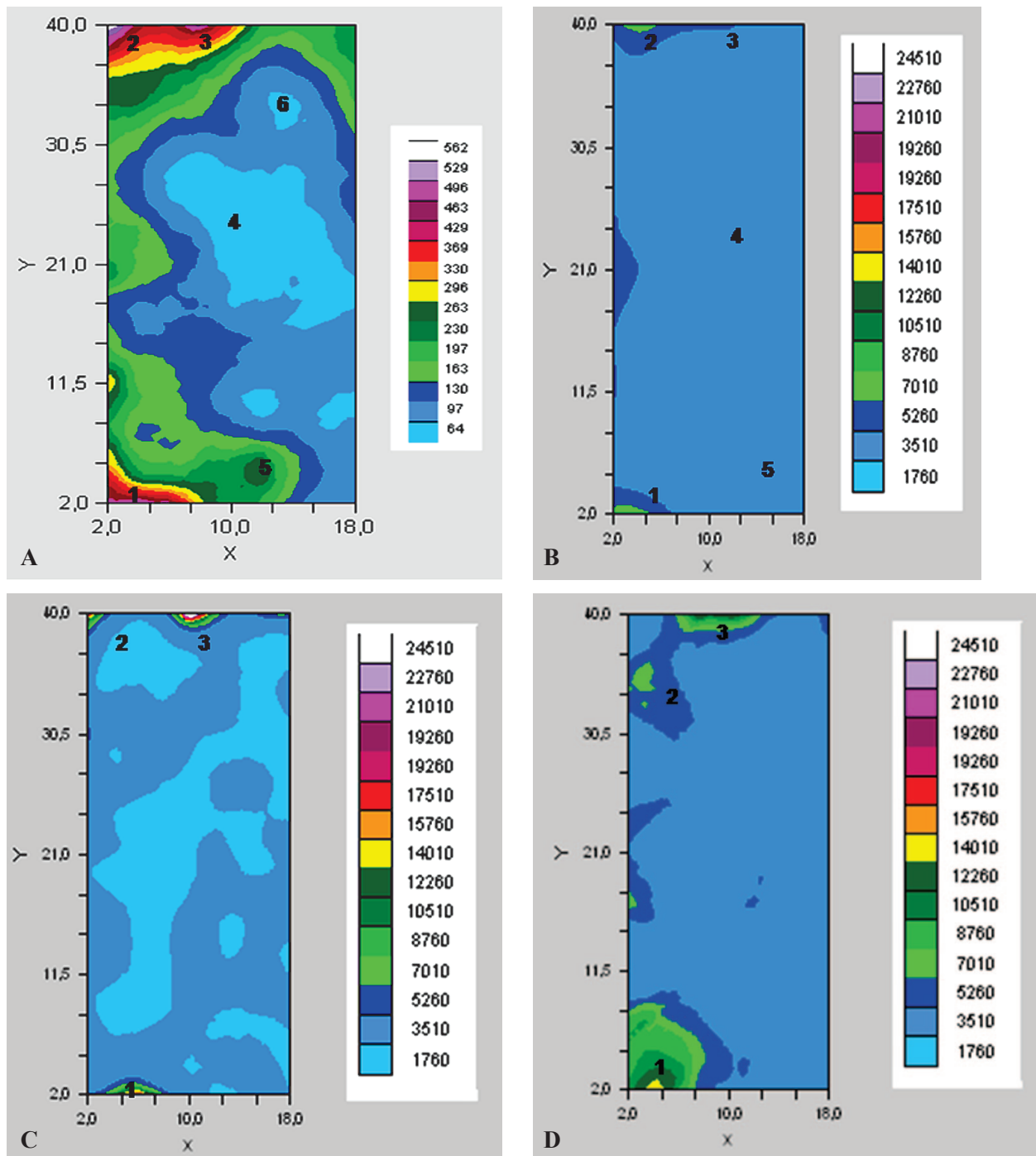


Figura 2. Variación de la densidad de población de mosca blanca en las cuatro semanas de muestreo (A, B, C, D). Durante las cuatro semanas de muestreo se encontró que las mayores densidades de la paga se encuentran en las áreas de ventilación del invernadero, y a través del tiempo estas densidades son más altas.

Los mapas generados por el programa Gs+ muestran que la distribución espacial de mosca blanca de los invernaderos es agregada (Fig. 2). Bernal *et al* (2008) mediante el índice Varianza/media encontraron que la distribución de ninfas de mosca blanca es agregada durante todo el ciclo de cultivo aunque prácticas culturales como el despunte influyen significativamente en que la distribución sea de esta forma. Esto coincide con lo planteado por Basso *et al.* (2001) quienes encontraron que la distribución de la plaga era agregada, mediante el uso de la distribución de probabilidad binomial negativa.

Para las cuatro semanas de muestreo se observa que las mayores densidades de mosca blanca se encuentran hacia los bordes del invernadero y en casos como el foco dos, se nota un desplazamiento de las poblaciones de ninfas de tercer instar en la semana cuatro que probablemente fue ocasionada por el movimiento de los adultos en busca de nuevo recurso de nuevo. Adicionalmente la densidad de ninfas de mosca blanca en la semana uno es similar en todos los focos, pero para las semanas posteriores en los focos uno, dos y tres las poblaciones de mosca blanca aumentan, mientras que en los

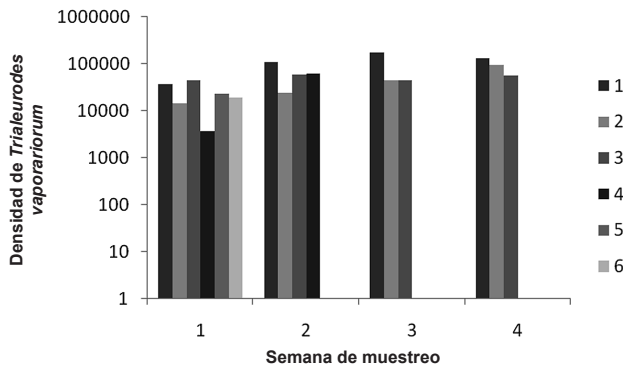


Figura 3. Densidad promedio de mosca blanca/foco en cuatro semanas de muestreo. Los seis números corresponden a los focos donde se hicieron las liberaciones del parasitoide.

focos cuatro, cinco y seis las densidades se mantienen similares a aquellas encontradas en la semana uno, por lo cual no se libera el parasitoide en estos puntos.

Encarsia formosa ha sido objeto de amplios estudios para determinar su efectividad como controlador de *T. vaporariorum*. Dentro de estos trabajos se encuentra el realizado por De Vis *et al.* (2002) quienes recomiendan iniciar las liberaciones del parasitoide cuando las poblaciones de mosca blanca son menores a 0,05 adultos por planta para que el control sea efectivo. La cantidad de individuos a liberar sugerida por estos autores es de 5 individuos/m² semanalmente, e introducir pupas de *E. formosa* preferiblemente en lugar de adultos. En el mismo trabajo de también se encontró que bajo condiciones de invernadero los porcentajes de parasitismo alcanzaron valores superiores al 80%. De igual forma Aragón *et al.* (2008) presentan porcentajes de parasitismo hasta del 80% en condiciones de confinamiento y afirma que estos valores pueden ser superiores. Sin embargo la forma de liberación en el primer trabajo es diferente a la del segundo ya que Aragón *et al.* (2008) liberaron adultos recién emergidos de *E. formosa*, mientras que De Vis *et al.* (2002) liberaron pupas del parasitoide.

A diferencia de los trabajos anteriormente mencionados, los porcentajes máximos de parasitismo encontrados en este trabajo fueron del 40% y representaron casos extremos de puntos específicos de muestreo, mientras que el promedio general mostró porcentajes máximos del 23% (Fig. 4) en algunos de los focos. Estos resultados concuerdan en algunos aspectos con los encontrados por Aragón *et al.* (2008), quienes afirman que para los 35 días después de la liberación de *E. formosa* se pueden observar las primeras ninfas de *T. vaporariorum* con síntomas de parasitismo (melanización), sin embargo, para este momento no todas las ninfas del herbívoro que han sido parasitadas presentan estos síntomas. Las condiciones en las que se desarrolló el trabajo no permitieron la evaluación de esta variable hasta los 70 días después de la liberación debido a dificultades de carácter logístico. Tomando en cuenta los datos reportados en este trabajo, se esperaría que los porcentajes de parasitismo siguieran la misma tendencia para los 40 días de evaluación restantes.

De esta forma para la primera semana de muestreo se encontró que las zonas uno, dos y tres presentaron porcentajes de parasitismo cercanos al 17% en comparación con los puntos cuatro, cinco y seis cuyos porcentajes fueron menores (6%) (Fig. 4). Estos resultados demuestran que las diferencias

en los porcentajes de parasitismo de cada uno de los puntos pueden estar relacionados con las liberaciones del parasitoide en puntos donde las densidades de la plaga son mas o menos altas según corresponda.

Para la segunda semana de evaluación el porcentaje de parasitismo de *E. formosa* aumenta en las zonas cercanas a los bordes del invernadero, donde se liberaron los parasitoides. En la zona de liberación uno el porcentaje de parasitismo es del 17% al 20%, mientras que en los puntos dos y tres el parasitismo alcanza el 10% (Fig. 4B). Este valor es mucho menor que el encontrado para los mismos puntos en la primera semana de evaluación, lo que se le atribuye a una labor de deshoje realizada en la misma semana. De igual forma se observa que hacia el interior del invernadero los valores de parasitismo no alcanzan el 1%, lo cual corresponde a zonas donde no se hizo ninguna liberación.

Para la tercera semana (Fig. 4C) se observa que el porcentaje de parasitismo se eleva hasta cerca del 23%, en el punto de liberación uno. Este aumento se puede explicar como una acumulación de ninfas de mosca blanca que han sido parasitadas por más de tres liberaciones de *E. formosa* que se efectuaron en el mismo punto.

Finalmente en la cuarta semana (Fig. 4D) se observó que el porcentaje máximo de parasitismo es del 20% en los puntos uno, dos y tres, mientras que zonas como el punto cuatro de las semanas anteriores presentan porcentajes de parasitismo inferiores al 1%. Por otra parte el punto 5 encontrado en las dos primeras semanas aparece de nuevo en la cuarta semana mostrando un valor cercano al 6% de parasitismo, esto sugiere que las poblaciones de parasitoides liberadas en las primeras semanas ya comienzan a tener efecto incluso en puntos donde las liberaciones no se hicieron de forma permanente.

Para la zona uno el porcentaje de parasitismo promedio de *E. formosa* aumenta de 5%, en la primera semana a 15% en la cuarta semana. En este punto se encontraron las densidades más altas de ninfas de mosca blanca/planta y valores máximos de parasitismo cercanos al 40%. Por otra parte se observa una disminución en el porcentaje de parasitismo en el punto dos, de la primera y segunda semana (19,5%) a la tercera semana (5%), mientras que las zonas tres y cuatro los valores de esta variable se mantienen constantes (2%). Las zonas cinco y seis solo se evaluaron hasta la segunda semana ya que los porcentajes de parasitismo fueron cercanos al 4% y se mantuvieron por debajo de este valor a lo largo del periodo de evaluación.

Aragón *et al.* (2008) encontraron que al liberar 30 avispas de *E. formosa* por planta con una población de 500 ninfas de *T. vaporariorum* es el tratamiento que mejor porcentaje de parasitismo presentó (77,1%) en comparación con los demás tratamientos. Adicionalmente Tello *et al.* (2007) encontraron que para controlar la plaga en plantas de tomate infestadas con 15 a 45 ninfas de mosca blanca es necesario liberar seis avispas en tres momentos, con lo que se obtienen porcentajes de parasitismo cercanos al 50%. En ambos trabajos el parasitoide recién emergido fue liberado directamente en las unidades experimentales y bajo condiciones de confinamiento, mientras que en el presente trabajo la liberación de *E. formosa* se hizo en forma de pupas empacadas en dispensadores y con una frecuencia de liberación de dos veces por semana. Esta diferencia en las condiciones de experimentación explica los bajos índices de parasitismo encontrados durante el desarrollo del trabajo.

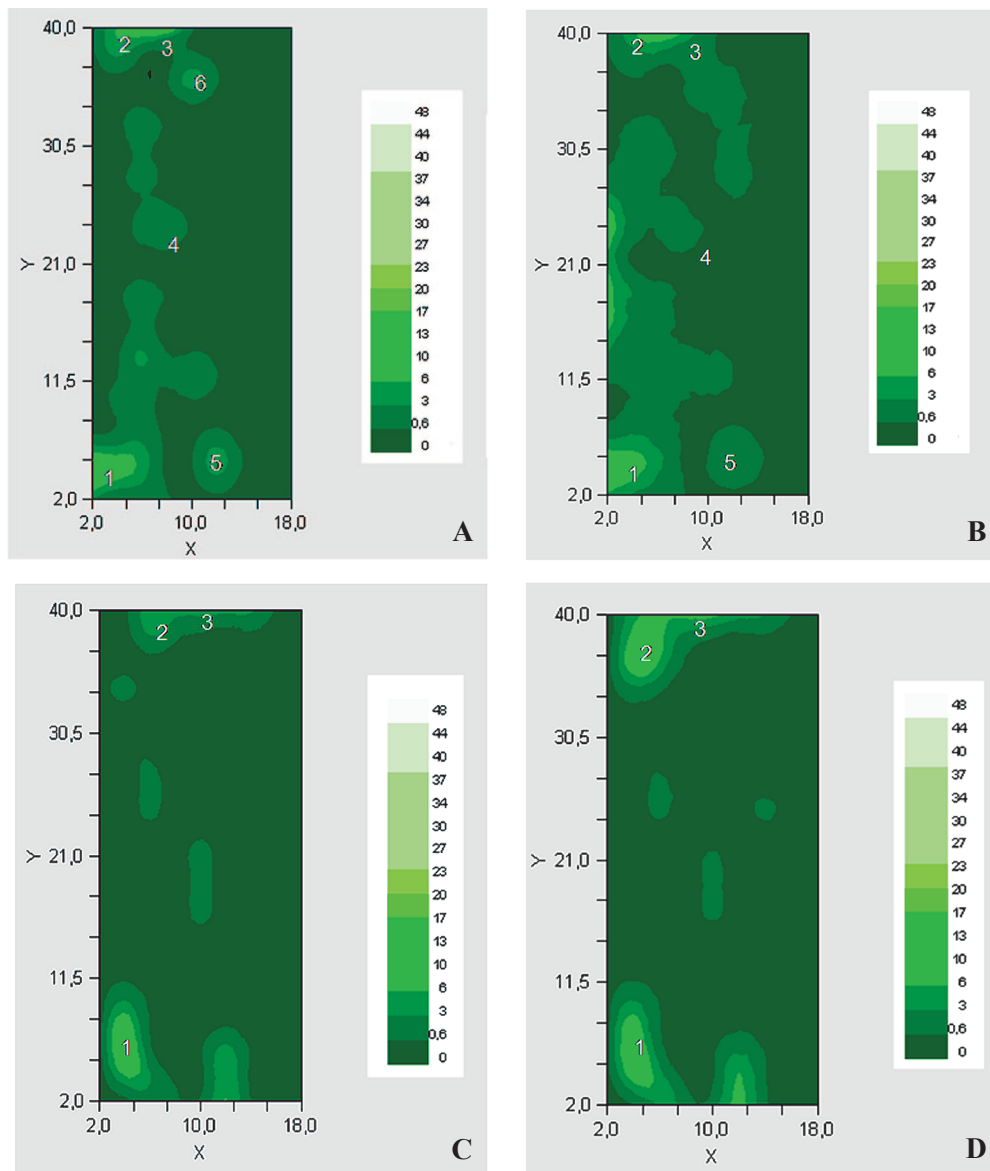


Figura 4. Variación espacial del porcentaje de parasitismo para las cuatro semanas de muestreo (A, B, C, y D). Los mayores porcentajes de parasitismo se observan en las áreas de ventilación donde se encontraron las mayores densidades de la plaga y donde se hicieron las liberaciones permanentemente, esto indica que el parasitoide permaneció cerca del recurso alimenticio y su hospedero.

Aspectos como la presencia de hongos, la aplicación de químicos para el control de otras plagas (tal es el caso de *Tuta absoluta* con Tracer) dificultan la capacidad de búsqueda del parasitoide. Según Koppert Biological Systems (2008) este producto reduce hasta en un 75% la población de adultos de *E. Formosa* y no tiene ningún efecto sobre pupas de este enemigo natural. Aunque las liberaciones del parasitoide se hicieron en forma de pupa se podría pensar que la aplicación de Tracer no tendrían ningún efecto. Sin embargo el mismo producto tiene dos días de efecto residual tiempo durante el cual pudo afectar los primeros adultos que emergieron en los días posteriores a la liberación.

Por otra parte y siguiendo las recomendaciones hechas por Tello *et al.* (2007), las liberaciones de pupas de *E. formosa* se hicieron fraccionadas pero sólo en dos momentos, debido a facilidades en el transporte, almacenamiento y movilidad de los dispensadores. Según lo encontrado por estos autores si no

se siguen estas recomendaciones es probable que el fenómeno de interferencia intraespecífica se vea reflejado en menores porcentajes de parasitismo (Coiller y Hunter 2001) (López *et al.* 2005). Otro factor que pudo afectar los porcentajes de parasitismo es el almacenamiento y transporte. Las avispas eran almacenadas en una nevera de icopor y mantenidas a una temperatura de 5°C, sin embargo en estas condiciones no podían permanecer más de cinco días porque la viabilidad del parasitoide era reducida por efecto del frío. En las dos primeras liberaciones los dispensadores del parasitoide estuvieron sometidos a estas condiciones por cinco días, lo que redujo los porcentajes de parasitismo en las semanas uno y dos (Fig. 4).

Para determinar el radio de dispersión de *E. formosa* se generaron cuatro semivariogramas correspondientes a las cuatro semanas de evaluación de esta variable y usando el modelo Gaussiano que fue el que presentó el valor de ajuste más alto ($r \approx 0,84$). Para las cuatro semanas se encontró que

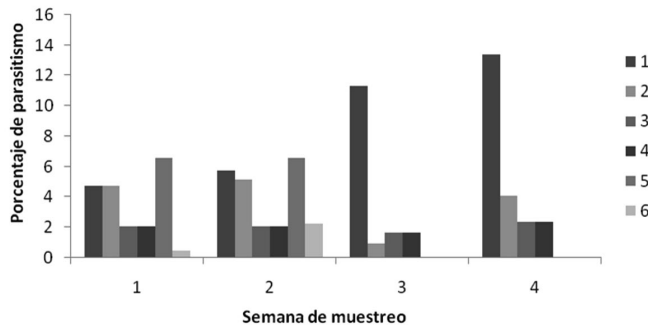


Figura 5. Porcentaje de ninfas de *T. vaporariorum* parasitadas en cada uno de los puntos de liberación de *E. formosa* durante cuatro semanas de evaluación.

la pendiente de los semivariogramas es mayor a 5,33m y de esa distancia hasta 8m la curva se estabiliza lo que se conoce con el nombre de rango (Tabla 1). En la misma tabla también se muestra el nugget que es el punto donde el valor de la distancia de separación es cero y la meseta que es donde el porcentaje de parasitismo se estabiliza. Según estos resultados a distancias superiores de 8m del punto de liberación de *E. formosa* los porcentajes de parasitismo observados no presentan correlación con la distancia, lo que sugiere que a distancias mayores no cabe esperar porcentajes de parasitismo importantes.

Esta distancia encontrada está relacionada con la característica sinovigenica de *E. formosa* (Van Roermund 1997). A diferencia de los parasitoides pro-ovigénicos, los parasitoides sinovigénicos tienen la tendencia a mantenerse en el foco de infestación donde se encuentra su hospedero. Este fenómeno fue reportado por Cantor (2001) al comparar diferentes parámetros biológicos, entre esos la capacidad de dispersión de tres parasitoides de la broca del café. Estas características permiten que *E. formosa* sea considerado un buen controlador biológico de *T. vaporariorum* en comparación con otros enemigos naturales en condiciones del altiplano de Bogotá, tal es el caso de *Amitus fuscipennis* (MacGown and Nebeker, 1978) el cual tiene una mayor frecuencia de oviposición, emplea menos tiempo en la manipulación de la presa y en otras actividades diferentes al parasitismo (Fuentes 2001; de Vis et al. 2002); sin embargo, *E. formosa* presenta mayores porcentajes de control con menor número de parasitoides liberados. Este aspecto representa una ventaja para su uso en cultivos comerciales de tomate donde la cantidad de individuos requeridos es elevada (De vis 2001).

Para el caso de otras especies sinovigénicas como *Cephalonomia stephanoderis* Betrem se encontró que la dispersión del parasitoide presentó dependencia espacial hasta los 20 metros de distancia con respecto al punto de liberación, zona en donde se encontraron porcentajes de parasitismo del 10%

Tabla 1. Valores de los parámetros del modelo Gaussiano que fue empleado para determinar el radio de dispersión de *E. formosa* (Rango).

Semana	Meseta	Rango	Nugget	R ²
1	0.49	8.00	0.049	0.76
2	0.860	8.00	0.1400	0.84
3	0.295	8.00	0.0144	0.80
4	0.468	8.00	0.0230	0.74

al 50% (Aristizabal 1995), mientras que a distancias mayores a 20 metros la concentración de avispa y el porcentaje de parasitismo fueron menores. Esta diferencia entre las distancias de dispersión y su correlación con el porcentaje de parasitismo para cada uno de los parasitoides se puede explicar por el tamaño de los mismos ya que *E. formosa* es un microhimenoptero que mide 0,6mm aproximadamente mientras que *C. stephanoderis* mide de 1,6 a 2,0 mm, si el tamaño del parasitoide es más grande el radio de dispersión del mismo será más grande. Esta distancia también es comparable con la encontrada por Vergara (1998) para el parasitoide de la broca del café, *Phymastichus coffea* La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), el cual mostró una mayor concentración de avispa a una distancia máxima a 23 metros con un porcentaje de parasitismo del 94,74%. En el mismo trabajo también se encontró que distancias de 23 a 60 metros presentaron parasitismos del 31,29%.

Conclusiones

Los porcentajes de parasitismo sobre ninfas de tercer instar de *T. vaporariorum* cercanos al 40% y evaluados 35 días después de la primera liberación demuestran que *E. formosa* es capaz de controlar los focos de la plaga y permanecer en los mismos durante su periodo como adulto. Por otra parte, la distancia de dispersión de los adultos de *E. formosa* a 8m del punto de liberación indican que este parasitoide forrajea inicialmente en el punto donde fue liberado, allí parasita los hospederos que encuentra y permanece hasta que su recurso se agota. Cuando esto sucede se decide ir en busca de mas hospederos no muy lejos de la zona donde fue liberado. Estos resultados pueden usarse como punto de referencia para hacer liberaciones de *E. formosa* como estrategia de control preventiva en cultivos comerciales de tomate donde se tengan en cuenta los focos de *T. vaporariorum*.

Literatura citada

- ARAGÓN, S.; RODRÍGUEZ, D.; CANTOR, F. 2008. Criterios para la liberación y evaluación de la efectividad de *Encarsia Formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) para el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae) en cultivos comerciales de tomate bajo invernadero. *Agronomía Colombiana* 26(2): 275-286.
- ARISTIZABAL, L. F. 1995. Efecto del parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* (Betrem) (Hymenoptera: Bethyilidae) sobre una población de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) en condiciones de campo. *Manizales (Colombia)*, Universidad de Caldas. Facultad de Agronomía. 129 p.
- BASSO, C.; FRANCO, J.; GRILLE, G.; PASCAL, C. 2001. Distribución espacial de *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) en plantas de tomate. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 27: 475-478.
- BERNAL M., L. A.; PESCA, B. L. A. RODRÍGUEZ, D.; CANTOR, F. Y CURE, J. R. 2008. Estandarización de un método de monitoreo directo de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) en un cultivo comercial de tomate bajo invernadero. *Agronomía Colombiana*. 26 (2): 266-276.
- CANTOR, F. 2001. Análise de fatores que afetam o potencial de ação de parasitoides em programas de controle biológico: o caso dos parasitoides da broca-do-café. Tese de Doutorado em Entomologia, Universidade Federal de Vicosa (Brasil).
- CARDONA, C.; LÓPEZ-AVILA, A.; RENDÓN, F.; RODRÍGUEZ, I.; VALAREZO, O. 2005. Sección cuatro: Whiteflies as pests of annual crops in the tropical highlands of Latin America p.

- 269-300. En: Anderson, P.K.; Morales, F. (eds.). Whitefly and whitefly-borne viruses in the tropics: Building a knowledge base for global action. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 345 p.
- CARDONA, C.; RODRIGUEZ, A.; PARADA, P. C. 1993. Umbral de Acción para el Control de la Mosca Blanca de los Invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), en Habichuela. Revista Colombiana de Entomología 19 (1): 23-33.
- COILLER, T. R.; HUNTER, M. S. 2001. Lethal interference competition in the whitefly parasitoids *Eretmocerus eremicus* and *Encarsia sophia*. Oecologia 129: 147-154.
- DENT, D. 2000. Insect Pest Management. CABI Publishing, Wallingford UK, 410 p.
- DE VIS, R.M.J. 2001. Biological control of whitefly on reehouse tomato in Colombia: *Encarsia formosa* or *Amitus fuscipennis*? Tesis doctoral. Universidad de Wageningen, Wageningen, Alemania. 166 p.
- DE VIS, R. M. J.; FUENTES, L. E.; VAN LENTEREN. 2002. Life history of *Amitus Fuscipennis* (Hym., Platygasteridae) as parasitoid of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hom., Aleyrodidae) on tomato as function of temperature. Journal of Applied Entomology 126 (24-23).
- ESCOBAR, H.; LEE, R. 2001. Producción de Tomate Bajo Invernadero. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Colciencias, Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales (CIAA). 66 p.
- FAO.2007. Faostat Estadística Databases, Agricultura, Cultivos Primarios, Tomate (Www.Fao.Gov.Co) Fao (2007). Faostat Estadística Databases, Agricultura, Http://Faostat. Fao.Org/Site/340/Default.aspx
- FUENTES, L. E. 2001. Ciclo de vida de *Amitus fuscipennis* MacGown y Nebeker parasitoide de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) a 15, 20, 25 y 30° C en tomate. Trabajo de grado. Universidad Nacional De Colombia. Facultad De Agronomía. Bogotá Colombia. Pp 54.
- GAMMA DESIGN SOFTWARE. 2002. Geostatistics for the environmental Sciences. Version 5.3 1 Demonstration.
- HODDLE, M.S.; VANDRIESCHE, R.G.; SANDERSON, J. 1998 Biology and use of the Whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. Annual Review of Entomology 43:645-69.
- HUSSEY, N. W.; SCOPES, N. 1985. Biological pest control the glasshouse experience. Cornell University Press. Ithaca, New York. 240 p.
- KOPPERT BIOLOGICAL SYSTEMS. 2008. Web site. www.koppert.com. http://efectos-secundarios.koppert.nl/#. Fecha último acceso: [4 abril 2011].
- LÓPEZ, S. N.; VISCARRET, M. M.; ANDORNO, A. V.; BOTTO, E. 2005. Estudio de la interacción entre *Encarsia formosa* y *Eretmocerus corni* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoides de la mosca blanca de los invernáculos *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Revista de Investigaciones Agropecuarias 34 (3): 73-82.
- LIEBHOLD, A. M.; ROSSI, R. E.; KEMP, W. P.1993. Geostatics and Geographic information Systems in Applied insect Ecology. Annual Review of Entomology 38: 303-27.
- LUDWIG, J.A.; REYNOLDS, J. F. 1988. Statistical ecology: a primer of methods and computing. Wiley Press, New York, New York. 337 p.
- MADRIGAL C., A. 2001. Fundamentos de control biológico de plagas. 453 p.
- MARTIN, N.A. 1999. Whitefly natural enemies of the whitefly and their biology. New Zealand Institute for the crops & Research Limited a Crow Research Institute. Web site. http://www.crop.cri.nz/home/products-services/publications/broadsheets/92.pdf. Fecha último acceso: [24 enero 2011].
- PEDIGO, L. P.; RICE, M. E. 2006. Entomology and Pest Management. Fifth Edition. Pearson / Prentice Hall Upper Saddle River. New Jersey, Columbus Ohio 259-264.
- RODRÍGUEZ, I.; CARDONA, C. 2001. Problemática de *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) como plagas de cultivos semestrales en el Valle del Cauca. Revista Colombiana de Entomología 27 (1): 21-26.
- RODRIGUEZ G., A.; HILLER, M.; WILLIAMS, E. 1996. Umbrales de Acción para la Mosca Blanca de Los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), en Tomate. Revista Colombiana de Entomología 22 (1): 87-92.
- SALMERÓN, A. 1991. Plagas del Tomate: Bases Para el Control Integrado. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección general de Sanidad de Producción Agraria. Madrid, España: 37-51.
- SOTO, A., NORENO, A., APABLAZA, J., Y ESTAY, P. 2001. Requerimientos térmicos para el desarrollo de *Encarsia formosa* (hymenoptera: aphelinidae) criado en *trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Ciencias e Investigación Agraria 28 (2). 103-106.
- SUÁREZ G., M R.; LÓPEZ A. 1992. Estudio para la cría masiva de *Encarsia formosa* Gahan bajo condiciones de invernadero en la sabana de Bogota. Trabajo de grado Universidad Nacional De Colombia Facultad de Agronomía. Bogota Colombia. 96 p.
- TELLO, P. CANTOR, F.; RODRIGUEZ, D.; CURE, J. R. 2007. Densidades y frecuencias de liberación de *Encarsia Formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) sobre *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) en tomate. Agronomía Colombiana 25 (2): 314-319.
- VAN LENTEREN, J.C. 2003. Quality control and Production ob biological control agents, Theory and testing procedures. CABI publishing. United Kingdom. 327 p.
- VAN ROERMUND, H. J. W.; VAN LENTEREN, J. C.; RABINGE, R. 1997. Analysis of Foraging Behavior of the Whitefly Parasitoid *Encarsia formosa* on a Leaf: A Simulation Study. Biological Control 8: 22-36.
- VERGARA O., J. D. 1998. Biología y comportamiento de *Phymastichus coffea* La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), Parasitoide de la broca del café en condiciones de campo. Trabajo de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 125 p.

Recibido: 20-dic-2009 • Aceptado: 18-may-2011

Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae)

Pathogenicity of isolates of entomopathogenic fungi against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae)

CIPRIANO GARCÍA G.¹, MARÍA BERENICE GONZÁLEZ M.² y NÉSTOR BAUTISTA M.³

Resumen: Con la finalidad de contar en Durango, México, con aislamientos nativos de hongos entomopatógenos con patogenicidad contra *Spodoptera frugiperda* y *Epilachna varivestis*, principales plagas de maíz y frijol, respectivamente, se evaluaron 97 aislamientos de los cuales se seleccionaron a Bb42 y Bb18 de *Beauveria bassiana* y Ma91 de *Metarhizium anisopliae*, la actividad insecticida de éstos se midió mediante bioensayos con un diseño completamente al azar aplicando diferentes concentraciones de esporas sobre larvas jóvenes de ambos insectos, los datos de mortalidad de larvas se analizaron con un ANOVA y una prueba de Tukey, la DL_{50} y TL_{50} se determinó con el programa Polo PC. El aislamiento Bb42 obtenido de larvas de *S. frugiperda* fue evaluado contra larvas del segundo estadio ocasionando una mortalidad de 96,6 % a una concentración de $1,0 \times 10^9$ esporas mL^{-1} y tuvo una CL_{50} de $5,92 \times 10^3$ esporas mL^{-1} con un tiempo letal de 3,6 días, siendo la más virulenta de las seleccionadas. De igual forma el aislamiento Bb18 obtenido de frijol fue el más virulento contra *E. varivestis*, ya que causó una mortalidad de larvas neonatas del 93,3%, a $1,0 \times 10^9$ esporas mL^{-1} a los 3 días, con una CL_{50} de $1,20 \times 10^6$ esporas mL^{-1} y tiempo letal de 5,1 días (Tukey; $p \leq 0,05$). Con base en estos resultados se concluyó que la patogenicidad de los aislamientos fue mayor cuando se obtuvieron directamente del insecto que de suelos cultivados con maíz y frijol, así como cuando provienen del respectivo cultivo en el que se encuentra la plaga.

Palabras clave: Conchuela del frijol. Gusano cogollero. *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*.

Abstract: In order to obtain native isolates of entomopathogenic fungi in Durango, Mexico, with pathogenicity against *Spodoptera frugiperda* Fall Armyworm and *Epilachna varivestis* Mexican Bean Beetle, main pests of maize and beans, respectively, 97 isolates were evaluated, Bb42 and Bb18 of *Beauveria bassiana* and Ma91 of *Metarhizium anisopliae*. A bioassay using neonate larvae under completely randomized design of treatments per dose (ANOVA) and Tukey's test were used to measure the insecticidal activity in both insects, mortality data were used to calculate LC_{50} and LT_{50} . The isolation Bb42 obtained from larvae of *S. frugiperda* and evaluated against second instar larvae of the same insect showed the highest virulence 96.6% of mortality to rate of 1×10^9 spores mL^{-1} , with LC_{50} of 5.92×10^3 spores mL^{-1} , and lethal time of 3.6 days; isolation Bb18 from beans was highly virulent against neonate larvae of *E. varivestis*, 93.3% of mortality to 1×10^9 spores mL^{-1} with an LC_{50} of 1.20×10^6 and lethal time of 5.1 days (Tukey, $p \leq 0.05$). In conclusion, the pathogenicity of the isolates was greater when were obtained directly from the insect hosts than from maize and beans soil samples, as well as when it's are obtain from their respective host culture where was find the pest insect.

Key words: Mexican Bean Beetle. Fall Armyworm. *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*.

Introducción

En el Estado de Durango, México, se cultivan anualmente 231.497,61 ha de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y 146.587,00 ha de maíz (*Zea mays* L.) siendo los cultivos de mayor importancia económica, ya que cubren el 71,43% del total de la producción agrícola (SAGARPA 2009). Los insectos plaga que causan los mayores daños a estos cultivos son el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) y la conchuela del frijol *Epilachna varivestis* (Mulsant, 1850) (Coleoptera: Coccinellidae). Una alternativa viable para el control biológico de estos insectos son los hongos entomopatógenos (HE): *Beauveria bassiana* (Balsamo-Vuilleimin, 1912), *Metarhizium anisopliae* (Metsch-Sorokin, 1883) y *Nomuraea rileyi* (Farlow-Samson) (Lezama *et al.* 2005; Molina *et al.* 2003; García *et al.* 1999; Morales y Röchling 1998).

Debido a la importancia de contar con aislamientos nativos con patogenicidad para el control de estos insectos, adaptados a las condiciones climáticas de una región, Lezama *et*

al. (2000) colectaron larvas de *S. frugiperda* logrando aislar cepas de *B. bassiana*, *N. rileyi* e *Hirsutella* sp., de cultivos de maíz y sorgo en Michoacán, Colima y Jalisco, mientras que en suelo encontraron a *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria fumosorosea* (Wize 1904). Con este mismo fin, Molina *et al.* (2003) tomaron muestras de suelo y colectaron larvas de *S. frugiperda* en campos cultivados con maíz, sorgo *Sorghum vulgare* (Pers.) y pasto Sudán *Sorghum sudanense* Piper (Stapf, 1917) en seis Estados de la República, donde también encontraron larvas infectadas con *N. rileyi* e *Hirsutella* sp., mientras que del suelo aislaron sólo *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Respecto a *E. varivestis*, García *et al.* (1999) evaluaron la susceptibilidad de 10 cepas de colección sobre larvas de tres días de desarrollo, las cepas fueron aisladas de insectos de diferentes órdenes y las más patogénicas fueron obtenidas de coleópteros: *Diabrotica* sp., *Geraeus senilis* (Casey, 1920) (Coleoptera: Curculionidae), *Diabrotica balteata* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), *Hippodamia convergens* (Guerin-Meneville, 1842) (Coleoptera: Coccinellidae) e *Hypothe-*

¹ Ph.D. CIIDIR-IPN COFAA. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. C.P. 81101. Guasave, Sinaloa, México. cgarciag@ipn.mx Autor para correspondencia.

² M. Sc. CIIDIR-IPN COFAA Unidad Durango. Sigma No. 119. Fracc. 20 de Nov. II. C. P. 34220. Durango. mbgonzalez@ipn.mx. ³ Ph.D. Colegio de Posgraduados. Instituto de Fitosanidad. Carr. México-Texcoco Km. 36.5 Montecillo Texcoco. Edo. de México C.P. 56230. nestor@colpos.mx.

nemus hampei (Ferrari, 1867) (Coleoptera:Scolytidae). De éstas la que generó mayor mortalidad fue la que se aisló de *Diabrotica* sp., con 96.6 % de mortalidad a una dosis de $1,27 \times 10^7$ esporas/mL en comparación con las que no fueron aisladas de coleópteros, lo que sugiere que existe cierto grado de especificidad de cepas dependiendo de la ubicación taxonómica del insecto (Srisukchayakul *et al.* 2005); la que mostró menor toxicidad (66 %) fue la cepa aislada de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae).

Por otro lado, Behle *et al.* (2006) evaluaron la efectividad tóxica de blastosporas y esporas de *I. fumosorosea* utilizando dos tipos de bioensayos; uno por aplicación tópica y otro por contaminación de dieta natural (hojas de frijol) a una concentración de 1×10^8 esporas mL^{-1} sobre larvas del tercer estadio de *E. varivestis*, se demostró que las blastosporas fueron más efectivas que las esporas, además el bioensayo por aplicación tópica tuvo una mejor CL_{50} ($2,34 \times 10^8$ esporas mL^{-1} y $9,88 \times 10^6$ blastosporas mL^{-1}) que el bioensayo por contaminación de dieta ($9,39 \times 10^8$ esporas mL^{-1} y $3,47 \times 10^7$ blastosporas mL^{-1}), tanto para blastosporas como para esporas.

En relación con la patogenicidad de HE sobre *S. frugiperda*, Lezama *et al.* (1996) evaluaron seis cepas sobre huevecillos y larvas a una concentración de 1×10^8 esporas mL^{-1} ; y observaron que resultaron más efectivas las cepas de *M. anisopliae* y la combinación de *I. fumosorosea* y *P. javanicus* (Friedrichs & Bally) (94 y 100 %), los valores de CL_{50} fueron de $9,8 \times 10^5$ y $5,6 \times 10^6$ conidias mL^{-1} para huevecillos y de $3,9 \times 10^6$ y $1,5 \times 10^4$ conidias mL^{-1} para larvas, con un tiempo letal medio (TL_{50}) de 1,3 y 3,3 días, respectivamente. Por la importancia de obtener aislamientos nativos de HE para el control biológico de estas plagas, se realizó el presente trabajo cuyo objetivo fue: Evaluar la patogenicidad de aislamientos provenientes de suelo e insectos colectados en cultivos de maíz y frijol, contra larvas del gusano cogollero y conchuela del frijol.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron 39 muestras de suelos cultivados con maíz y frijol en los municipios de Guadalupe Victoria (GV) ($24^{\circ}27'31,6''\text{N}$ $104^{\circ}05'37,3''\text{W}$) con altitud de 1997 m.s.n.m., y Francisco I. Madero (FIM) ($24^{\circ}24'16,5''\text{N}$ $104^{\circ}20'45,2''\text{W}$), con altitud de 1958 m.s.n.m, en el Estado de Durango, México (Tabla 1).

Se colectaron larvas de *E. varivestis* y *S. frugiperda* con manifestación de micosis, aspecto momificado o esporulación del hongo. Los insectos se colectaron directamente de las plantas y se pusieron en vasitos de plástico con capacidad de 10mL, etiquetados por localidad y mantenidos refrigerados en laboratorio. Los muestreos de larvas y suelos se realizaron semanalmente del 4 de julio al 26 de septiembre del 2008.

Para el aislamiento de HE de suelo se utilizó como insecto trampa a larvas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) que son altamente susceptibles a hongos (Vanninen 1997). Cada una de las muestras de suelo se tamizaron y se tomaron 300g, el cual se humedeció y se colocó dentro de un recipiente de plástico junto con siete larvas de *G. mellonella* del último estadio de desarrollo, el recipiente con el suelo y las larvas se tapó y se invirtió. Las muestras se incubaron por siete días a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Bedding y Akurst 1975). Pasado este tiempo, las larvas se recuperaron del suelo y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito

de sodio al 1%, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril; se removió el exceso de agua y se colocaron en cajas de Petri con papel filtro con el fin de mantener la humedad relativa elevada, para favorecer el desarrollo de los hongos las larvas se incubaron a 25°C durante siete días (Hatting *et al.* 1999), luego se aisló el HE por diferentes técnicas como transferencia directa de hifas, impronta y maceración del insecto, dependiendo del desarrollo del HE en el cuerpo del insecto, hasta obtener cultivos puros.

La identificación de los hongos se hizo considerando la forma y el color de las hifas, esporas, células conidiógenas y fiálides, mientras que las características macroscópicas se basaron en la forma y color de la colonia, el crecimiento del sinema y la apariencia del hongo sobre su hospedero (Humber 1998; Samson 1988).

La selección de los aislamientos se hizo con base en su rápida esporulación y alta viabilidad durante los primeros 15 días. Las colonias de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* se sembraron por estrías en cajas petri con el medio de cultivo de referencia para cada hongo, para que el porcentaje de germinación no se viera disminuido. La viabilidad se determinó mediante microcultivos según Jiménez (1992), con un microscopio de contraste de fases (objetivo 40 X); las esporas se consideraron viables si el tubo germinativo era dos veces el diámetro de la espора, contando 400 esporas/repetición, la viabilidad debió ser superior al 90% para que los aislamientos fueran considerados como efectivos (Milner *et al.* 1991).

Los aislamientos seleccionados se propagaron en medio de cultivo líquido como se describe a continuación, para obtener un inóculo que se utilizó para la producción de esporas aéreas en sustrato sólido, éstas fueron usadas para su evaluación contra las larvas de *E. varivestis* y de *S. frugiperda*.

Una vez conservados los aislamientos en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se preparó una suspensión de los hongos adicionando 20mL de agua destilada estéril en el tubo de ensayo, se raspó la superficie del medio de cultivo con ayuda de una asa bacteriológica y dicha suspensión se colocó en 200mL de medio de cultivo líquido a base de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y sulfato de

Tabla 1. Origen de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (2008).

Clave	Origen		Localidad
	Suelo	Insecto	
Bb17	<i>G. mellonella</i> *		FIM
Bb18	<i>G. mellonella</i>		FIM
Ma85	<i>G. mellonella</i>		GV
Ma63		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Bb09		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Bb34	<i>G. mellonella</i>		GV
Bb56		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Ma62		<i>S. frugiperda</i>	GV
Bb12	<i>G. mellonella</i>		GV
Bb42		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Bb52		<i>S. frugiperda</i>	FIM
Ma91		<i>S. frugiperda</i>	GV

Bb = *B. bassiana*, Ma = *M. anisopliae*, FIM = Francisco I. Madero, GV = Guadalupe, Victoria. *G. mellonella** = insecto trampa.

amonio como fuente de nitrógeno, posteriormente se colocó en una incubadora-agitadora por 48h, a 27°C y agitación de 200rpm, hasta que el hongo alcanzó el 80% de la fase logarítmica de crecimiento, luego se inocularon en bolsas con 250g de arroz previamente tratadas (lavado, estilado, esterilizado), las bolsas se almacenaron en un cuarto a 27°C, 70% de HR, durante 15-18 días (García *et al.* 2006). Una vez que las esporas germinaron se separaron del arroz con ayuda de un tamizador automático, posteriormente se redujo el contenido de humedad (<10%) con ayuda de un deshumidificador, luego las esporas se formularon en Celite® en proporción 1:1, 1g de esporas/1g de Celite®, las esporas se contaron en una cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad de esporas formuladas mediante la técnica descrita anteriormente.

Cría de insectos. Se recolectaron larvas y adultos de *E. varivestis* en cultivos de frijol para establecer la cría masiva del insecto en laboratorio (25±2°C, 60% de HR y 14:10 HL). Los insectos se colocaron sobre plantas de frijol “Flor de Mayo” sembradas en macetas hasta obtener larvas neonatas de la tercera generación de la colonia, las cuales se utilizaron en la ventana de respuesta biológica y en los bioensayos para la determinación de la CL₅₀ y TL₅₀.

Se colectaron larvas de gusano cogollero en un cultivo de maíz, las cuales se criaron individualmente en laboratorio con dieta artificial (Ashby 1972), se usaron recipientes de plástico con capacidad de 10mL con tapa y en su interior se colocaron 8g de dieta. Las pupas se pasaron a una cámara de emergencia con arena húmeda, y una vez que alcanzaron el estado adulto se colocaron en una bolsa de papel y dentro de ésta se colocó un recipiente de 5cm de diámetro con arena, miel y agua, para alimentar a los adultos y obtener los huevecillos, mismos que se pasaron a una caja Petri dentro de la cámara de cría (27±2°C, 80±10% de HR y fotoperiodo 14:10 HL) hasta la emergencia de larvas, las cuales se usaron en las pruebas de patogenicidad.

Bioensayos de actividad insecticida. Con base en los mejores resultados de patogenicidad en las pruebas descritas se obtuvieron ocho aislamientos de *B. bassiana* y cuatro de *M. anisopliae*; se preparó una solución base de cada uno a una concentración de 1×10^9 esporas mL⁻¹. A partir de ésta se preparó una serie de diluciones para obtener las dosis requeridas para causar el 0 y 100% de mortalidad de larvas. Para lograrlo, se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril sobre el crecimiento del tubo de ensaye y 0,1% de Tween® 80 como dispersante raspando la superficie con un asa, después las esporas se contaron en una cámara de Neubauer. Se emplearon veinticinco larvas por tratamiento de cada insecto, por triplicado y agua destilada como testigo. La aplicación de los tratamientos se realizó sumergiendo las larvas por 30 segundos en cada suspensión, posteriormente las larvas de *S. frugiperda* se mantuvieron con dieta artificial y las de *E. varivestis* con dieta natural, se incubaron bajo las condiciones de cría previamente descritas. A las 72h se determinó el número de larvas muertas en cada aislamiento.

Análisis estadístico. Los resultados de mortalidad de larvas en los insectos se analizaron mediante un diseño completamente al azar de tratamientos por dosis (ANOVA) donde los tratamientos fueron los aislamientos Bb18, Bb42 y Ma91 y las seis diluciones las dosis; se usó el programa SAS, ver 9.0.,

además de una prueba de Tukey para la comparación de medias entre los diferentes aislamientos y concentraciones (Pr < F = 0,05).

Selección de aislamientos. De esta manera se seleccionaron los aislamientos Bb18, Bb42 de *B. bassiana* y Ma91 de *M. anisopliae*, debido al mayor porcentaje de mortalidad de larvas (>90%) y menor tiempo letal (≤72h).

Para determinar la CL₅₀ y TL₅₀, se utilizaron los aislamientos Bb18, Bb42 y Ma91 contra larvas neonatas de *E. varivestis*. Para lograrlo, se preparó una suspensión adicionando 10mL de agua destilada estéril a un tubo de ensayo con el hongo más 0,1mL de Tween® 80, de ésta se tomó 1mL y se adicionó en 9 mL de agua destilada estéril, hasta obtener seis diluciones seriadas (10^{-9} a 10^{-4}); en el bioensayo se utilizaron 25 larvas neonatas de *E. varivestis*, las cuales se sumergieron 30 s por separado en cada concentración, se dejaron secar y luego se colocaron en macetas con frijol para que se alimentaran, cada 24h se observó el número de larvas muertas/tratamiento.

Para los bioensayos con *S. frugiperda* se utilizaron los mismos aislamientos, se obtuvo una suspensión de esporas raspando el contenido del HE con ayuda de una asa adicionando 10mL de agua estéril mas 0,1mL de Tween® 80 (dispersante), se hicieron seis diluciones seriadas (10^{-9} a 10^{-4}). De cada concentración se adicionó 1mL/8g de dieta artificial antes de que solidificara, también se utilizaron 25 larvas con tres repeticiones, las cuales se incubaron de la misma forma que para la cría y cada 24h se reviso de mortalidad de larvas. A estos datos se les aplicó un análisis Probit (POLO PC 1996) para conocer la relación de las concentraciones con el número de insectos muertos (DL₅₀ y TL₅₀) a lo largo de las horas, respecto al control.

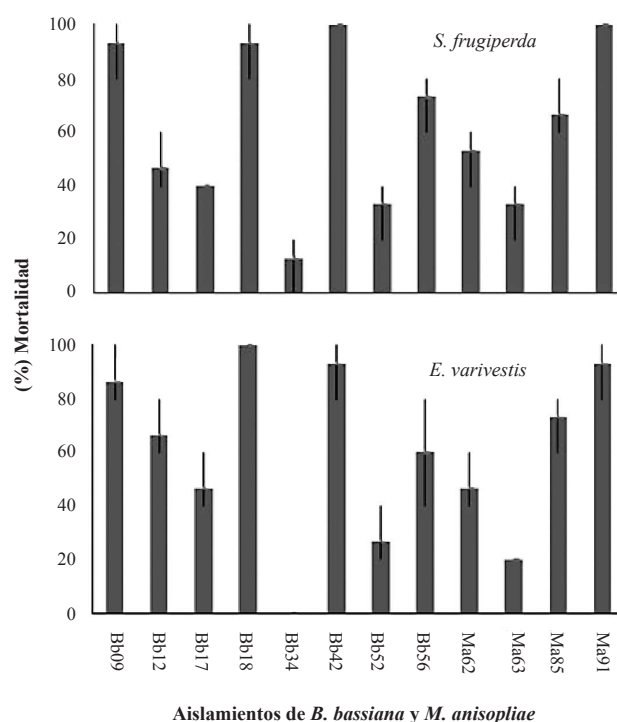


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de *S. frugiperda* y *E. varivestis* a las 72h de inoculación (±error estándar de la media).

Tabla 2. Mortalidad de larvas de *S. frugiperda* y *E. varivestis* en seis aislamientos a diferente concentración de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Conc. Esporas mL ⁻¹	<i>S. frugiperda</i>			<i>E. varivestis</i>		
	Bb18	Bb42	Ma91	Bb18	Bb42	Ma91
1x10 ⁹	69,3a*	96,66a	78,66a	93,33 ^a	57,33a	20,00a
1x10 ⁸	61,3a	81,33ab	62,66b	74,66b	36,00b	12,00b
1x10 ⁷	48,0b	72,00abc	52,00c	65,33b	29,33c	9,33bc
1x10 ⁶	41,3b	68,00bc	36,00d	52,00c	21,33c	4,00cd
1x10 ⁵	33,3c	54,66bc	25,33e	36,00d	18,66c	4,00cd
1x10 ⁴	12,0d	50,66c	20,00e	20,00e	12,00d	4,00cd
Testigo	2,66e	4,00d	4,00f	2,66f	2,66e	0,00d

* Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0,05$).

Resultados y Discusión

Aislamientos nativos de HE. De las muestras de suelo y larvas en cultivos de maíz y frijol se obtuvieron 97 aislamientos, de los cuales 57 fueron de *M. anisopliae* (58,7%), 36 de *B. bassiana* (37,11%) y cuatro de *I. fumosorosea* (4,12%); de 63 larvas de *S. frugiperda* colectadas en campo, se encontró *M. anisopliae* en 37 y *B. bassiana* en 23, pero no se encontraron aislamientos de HE en larvas o adultos de *E. varivestis* provenientes de campo. Respecto a esto último, Ceryngier (2000) y Beyene *et al.* (2007) señalan que la infección natural de HE en coccinélidos es menor a 20%. En el gusano cogollo nuestros resultados concuerdan con los reportados por Lezama *et al.* (2000) quienes encontraron que *M. anisopliae* fue dominante (10,9 %), seguido por *B. bassiana* (4,7 %) e *I. fumosorosea*, aislados del suelo y asociados a poblaciones de *S. frugiperda* en diferentes localidades de México.

Selección de aislamientos nativos de HE. Del total de aislamientos encontrados se seleccionaron ocho cepas de *B. bassiana* y cuatro de *M. anisopliae* ya que fueron patógenos, tuvieron un adecuado desarrollo en medio de cultivo, un alto porcentaje de esporulación a los 15 días, y una viabilidad superior al 90%. Con los aislamientos Bb18 y Bb42 de *B. bassiana* y Ma91 de *M. anisopliae* se presentó un rango alto de mortalidad de larvas de *E. varivestis* y *S. frugiperda* del 93,2 al 100% (1x10⁹ esporas mL⁻¹) a las 72h. Con base en la actividad insecticida observada se seleccionaron sólo los aislamientos Bb18 de suelo cultivado con frijol y Bb42 y Ma91, aisladas de larvas infectadas en maíz,

como las más efectivas para el control de *E. varivestis* y *S. frugiperda* (Fig. 1).

De acuerdo con la Prueba de Tukey ($\alpha=0,05$), los aislamientos más patógenos para el control de *S. frugiperda* fueron Bb42 a las seis concentraciones y Ma91 moderadamente (1x10⁷-1x10⁹), también para *E. varivestis* (Bb18) a las tres concentraciones más altas; al comparar los valores medios y bajos de mortalidad de larvas a las distintas concentraciones se comprobó que los otros aislamientos fueron menos patógenos a las concentraciones probadas (Tabla 2).

Actividad insecticida El aislamiento que tuvo la más alta patogenicidad sobre larvas de *E. varivestis* fue Bb18 de *B. bassiana*, aislada de cultivos con frijol, con una mortalidad de 93,3 % a dosis de 1,0x10⁹; la CL₅₀ fue de 1,20x10⁶ esporas mL⁻¹ y el TL₅₀ fue de 5,1 días (Tabla 3). En los insectos tratados se observó que el inicio de la infección fue a los 3 días, quedando cubiertos totalmente por el micelio a los 13 días después de haber aplicado las diferentes concentraciones.

El aislamiento que causó mayor mortalidad fue el obtenido de larvas infectadas de *S. frugiperda* en campo (Bb42), con una mortalidad máxima de 96,6 % a 1x10⁹ esporas mL⁻¹, CL₅₀ de 5,92x10³ y TL₅₀ de 3,6 días (valor más bajo). Este resultado coincide con el TL₅₀ reportado por Lezama *et al.* (1996) de 3,3 días para el control de larvas de *S. frugiperda*.

El aislamiento Bb18, el cual fue aislado de suelos cultivados con frijol causó una mortalidad de 69,3 % en larvas de *S. frugiperda*. No obstante, al evaluarlo contra larvas de *E. varivestis* causó una mayor mortalidad (93,3 %) a la misma

Tabla 3. Valores de CL₅₀ y TL₅₀ de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra *S. frugiperda* y *E. varivestis*.

Clave	CL ₅₀	Límites fiduciales al 95%	Pendiente	TL ₅₀
Bb18 <i>S. frugiperda</i>	8,93x10 ⁶	1,77x10 ⁶ -5,01x10 ⁷	0,304 ± 0,039	6,1 ± 0,288
<i>E. varivestis</i>	1,20x10 ⁶	3,24x10 ⁵ -4,19x10 ⁶	0,428 ± 0,043	5,1 ± 0,288
Bb42 <i>S. frugiperda</i>	5,92x10 ³	3,05x10 ² -4,07x10 ⁴	0,295 ± 0,042	3,6 ± 0,288
<i>E. varivestis</i>	3,96x10 ⁸	5,56x10 ⁷ -7,06x10 ⁹	0,274 ± 0,044	5,8 ± 0,288
Ma91 <i>S. frugiperda</i>	8,18x10 ⁶	1,84x10 ⁶ -3,85x10 ⁷	0,355 ± 0,042	4,5 ± 0
<i>E. varivestis</i>	0	—	0,220 ± 0,060	8,1 ± 0,577

concentración, mientras que el aislamiento Ma91 proveniente de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *M. anisopliae* en campo causó una menor mortalidad (78,6 %) en larvas de *S. frugiperda* que *B. bassiana*. Sin embargo, para el control de *E. varivestis* la mortalidad fue menor (20%).

Polanczyk y Alves (2005) aplicaron 100 µL de una suspensión de *B. bassiana* de 1×10^8 esporas/mL en la superficie de placas con dieta artificial para evaluar su toxicidad sobre larvas de *S. frugiperda*, obteniendo una mortalidad del 30 al 45 %, la que fue mayor cuando se aplicó en combinación con *Bacillus thuringiensis* Berlinier (58 %), esto indica la patogenicidad del hongo probada en nuestro ensayo con este insecto.

En relación con la selección de cepas, Kaur y Padmaja (2008) evaluaron 32 cepas de *N. rileyi* de diferente origen geográfico y huésped para el control de *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) encontrando tres cepas altamente tóxicas, donde el grado de variación entre aislamientos se relacionó con la muda del insecto. De forma similar, en nuestro estudio también observamos que el mayor número de larvas muertas de *E. varivestis* se dio durante la muda del insecto.

Al evaluar las diferencias entre el grado y la rapidez de la infección de aislamientos de *I. fumosorosea* en lepidópteros, Altre y Vandenberg (2001) encontraron que las blastosporas del aislamiento 4461 fueron capaces de penetrar a la cutícula y proliferar en la hemolinfa de *S. frugiperda* a las 22h después de la inoculación, mientras que el aislamiento 1576 no fue efectivo, es decir que no hubo penetración de las hifas del HE en el insecto. Así mismo, Srisukchayakul *et al.* (2005) sugieren que la germinación de esporas en aislamientos nativos depende del insecto hospedero, debido quizás a la variación del integumento, la penetración de los HE a través de la cutícula es a veces precedida por la formación de un apresorio que se fija a la epicutícula y proporciona el punto de apoyo para los procesos mecánicos y enzimáticos. Lo anterior sugiere que el origen de los aislamientos determina el grado de patogenicidad, esto apoya el porqué los aislamientos de frijol fueron más efectivos contra *E. varivestis* y los de maíz contra *S. frugiperda*, pues las quitinasas poseen el dominio de unión a la quitina, componentes genéticos del insecto huésped, lo que aumenta la capacidad de penetración de aislamientos nativos de HE (Fan *et al.* 2007). También podrían ser hongos endófitos localizados en diversos cultivos propiciando la infección en diversas plagas (Vera 2008).

En síntesis se encontraron abundantes aislamientos nativos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en campos cultivados con frijol y maíz en la región de estudio, siendo posible aislar a los dos hongos sólo de gusano cogollero con potencial para biocontrol. Fue evidente una mayor patogenicidad y virulencia de los dos hongos dependiendo de su origen; el aislamiento Bb42 aislado de larvas de *S. frugiperda* en maíz fue el más virulento, mientras que para *E. varivestis* lo fue el Bb18 aislado del frijol.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional (SIP 20070543), el apoyo económico otorgado al Proyecto de Investigación: Búsqueda e identificación de hongos y nematodos entomopatógenos en suelos cultivados con frijol y maíz en Durango.

Literatura citada

- ALTRE, J. A.; J. D. VANDENBERG. 2001. Penetration of cuticle and proliferation in hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* isolates that differ in virulence against lepidopteran larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 78(2): 81-86.
- ASHBY, G. 1972. The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals, eds. Worden, A. N. and Lane-Petter, W. The Universities Federation for Animal Welfare, London. 582-587 p.
- BEDDING, R. A.; R. J. AKURST. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematológica* 21:109-116.
- BEHLE, R. W., C. GARCIA G., P. TAMEZ G., M. R. MCGUIRE., M. A. JACKSON. 2006. Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist* 31(4): 289-295.
- BEYENE, Y., T. HOFVSANG., F. AZEREFEGNE. 2007. Population dynamics of tef *Epilachna* (*Chnootriba similis* Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae) in Ethiopia. *Crop Protection* 26: 1634-1643.
- CERYNGIER, P. 2000. Overwintering of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) at different altitudes in the Karkonosze Mts, SW Poland. *European Journal of Entomology* 97: 323-328.
- FAN, Y., W. FANG., S. GUO., X. O. PEI., Y. ZHANG., Y. XIAO., D. LI., K. JIN., M. J. BIDOCHKA., Y. PEI. 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1): 295-302.
- GARCÍA G., C., H. MEDRANO R., J. MORALES C., V. HERNÁNDEZ V. 1999. Toxicological assessment of *Beauveria bassiana* against Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Southwestern Entomologist* 24(3): 255-260.
- GARCÍA G. C., P. TAMEZ G., H. MEDRANO R., Y M. B. GONZÁLEZ MALDONADO. 2006. Mercado de bioinsecticidas en México. En: Cipriano García Gutiérrez e Hiram Medrano Rolán (Eds). *Biotecnología Financiera Aplicada a Bioplaguicidas*. 17-40 pp.
- HATTING, J.L., R.A.HUMBER., T. J. POPRAWSKI, R.M.MILLER. 1999. A survey of fungal pathogens from South Africa with special reference to cereal aphid. *Biological Control* 16:1-12.
- HUMBER, R., A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA Workshop. November 7, 1998. APS/ESA Joint Annual Meeting. Las Vegas, NV. 26.
- JIMÉNEZ J., A. 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Cenicafé* 43: 84-98.
- KAUR, G., V. PADMAJA. 2008. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR. *African Journal of Microbiology Research* 2: 299-307.
- LEZAMA G., R., R. ALATORRE R., L. F. BOJALIL J., J. MOLINA O., M. ARENAS V., M. GONZÁLEZ R., Y O. REBOLLEDO D. 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia (México)* 3: 35-40.
- LEZAMA G., R., J. J. HAMM., J. MOLINA O., M. LÓPEZ E., A. PESCADOR R., M. GONZÁLEZ R., L. E. STYER. 2000. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomologist* 84(1): 23-28.
- LEZAMA G., R., J. MOLINA O., M. LÓPEZ., A. PESCADOR., E. GALINDO., C. A. ÁNGEL Y A. C. MICHEL. 2005. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. *Avances de Investigación Agropecuaria (México)* 9(1): 1-6.

- MILNER, R. J., R. HUPPATZ.; B. SWARIS B. 1991. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 121-123.
- MORALES, E.; H. RÖCHLING. 1998. Water-dispensable granule of spores or live *Beauveria bassiana*. United States Patent. Patent Number 5, 9730, 973. US005730973A.
- MOLINA O., J., R. LEZAMA G., M. GONZÁLEZ R., M. LÓPEZ E., M. A. RODRÍGUEZ V.; A. PALACIOS F. 2003. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. *Florida Entomologist* 86(3):244-253.
- POLANCZYK, R. A., S. B. ALVES. 2005. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda* (Coleoptera: Melolonthidae) bajo. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 74: 24-33.
- POLO PC. 1996. A user's guide to Probit or Logit analysis. LeOra Berkeley, CA.
- SAGARPA. 2009. Anuario estadístico de datos del sitio web: <http://www.oeidrus-durango.gob.mx/> Fecha última revisión: 28 de febrero 2008. Fecha último acceso: [19 de abril 2009].
- SAMSON, R. A., H. C. EVANS, AND J. P. LATGÉ. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 187 p.
- SRISUKCHAYAKUL, P., C. WIWAT., AND S. PANTUWATANA. 2005. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. *Sci enceAsia* 31: 273-276.
- SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 Edition, SAS Institute Inc, Cary (1988). 1028.
- VANNINEN, I. 1997. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat and soil type. *Mycological Research* 91:93-101.
- VERA, F. E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 277-279.

Recibido: 3-mar-2010 • Aceptado: 20-oct-2011

Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

Actividad larvica y variación estacional del extracto de *Annona muricata* en *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

ROSEANE CRISTINA PRÉDES TRINDADE^{1,3,*}, JOSIANE DE SOUZA LUNA², MARIA RAQUEL FERREIRA DE LIMA³, PAULO PEDRO DA SILVA¹, and ANTÔNIO EUZÉBIO GOULART SANT'ANA³

Abstract: The diamondback moth *Plutella xylostella* is an important pest of cruciferous plants, particularly of cabbage (*Brassica oleracea* var. *acephala*). The activity of an ethanolic leaf extract of *Annona muricata* on the development of the larvae and pupae of a laboratory culture of *P. xylostella* was evaluated, together with the seasonal variation of this activity. Neonate larvae were fed with kale leaf discs that had been treated by immersion in solutions of *A. muricata* extracts, and the effects on the duration and viabilities of the larval and pupal phases of the insect were determined. The activities of the extracts varied significantly according to the time of collection of the leaf material and were maximal for leaves collected during the dry period of the year (October-February). At the highest concentration tested (5 mg.ml⁻¹), the most active extract caused 100% larvae mortality; at lower concentrations, the duration of the larval phase was increased by up to 2.6 days and the larvae survival was significantly reduced. The pupal phase was affected far less by exposure to the extracts, although such duration was increased by up to 1 day in the presence of non-lethal concentrations. The significance of these results with respect to the use of extracts of *A. muricata* for their insecticidal activity is discussed.

Key words: Natural Insecticide. Diamond back moth. *Brassica oleracea*.

Resumen: *Plutella xylostella* es una importante plaga de las crucíferas, sobre todo de la col (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Es estudiaron los efectos estacionales del extracto de las hojas de *Annona muricata* en el desarrollo de las larvas y pupas de *P. xylostella* provenientes de laboratorio. Las larvas recién eclosionadas se alimentaron con hojas de col tratadas por inmersión con soluciones de los extractos de las hojas. Se determinaron los efectos en la duración y viabilidad del desarrollo de las fases de larva y pupa del insecto. La actividad de los extractos varió significativamente según el momento de recolección de las hojas; la máxima actividad se obtuvo en el período seco del año. En la mayor concentración probada (5mg.mL), hubo un 100% de mortandad de las larvas en el extracto más activo; en las concentraciones más bajas, la duración de la fase larvaria, se incrementó hasta 2,6 días y la viabilidad se redujo de forma significativa. La fase de pupa fue menos afectada por la exposición a los extractos aunque su duración se haya incrementado hasta en un día en presencia de concentraciones no letales. Se discute la importancia de estos resultados frente al uso de los extractos de *A. muricata* como insecticida.

Palabras clave: Insecticida Natural. Polilla espalda de diamante. *Brassica oleracea*.

Introduction

The cabbage or diamondback moth *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758): Lepidoptera, Plutellidae, known in Brazil as “traça-das-crucíferas”, is one of the main pests of *Brassica* crops and is to be found throughout the country (Castelo Branco y Quimaraes 1990). The larvae of this insect feed on the epidermis of *Brassica* leaves, particularly of kale and cabbage (Gallo *et al.* 2002), and, depending on the region and on the time of planting, can cause a considerable reduction in the commercial value of the crop (Villas Bôas *et al.* 1990). Commonly employed tactics for the control of this pest require the application of synthetic insecticides at a frequency of up to three times a week (Castelo Branco 1998). More acceptable methods of insect control are, however, available and include the use of natural insecticides extracted from plants (Jacobson 1989), particularly within the context of an integrated pest management program.

Numerous plant extracts have been screened for their lethal, repellent, ovicidal, anti-feedant and anti-fertility activities against insects, and, perhaps most significantly, for their

effects on insect hormonal systems (Hill 1990). The results obtained, however, have shown divergence not only with plant species but also with the part of the plant assayed, the age of the specimen when harvested, the time of collection and the precise form of extraction. Thus, Kumar *et al.* (2000) found a large variation in the insecticidal activity against the second instar of *P. xylostella* of seeds obtained from 38 Neem trees growing in six localities. Such variations could be directly attributed to qualitative and quantitative differences in the chemical compositions of the seeds.

Along with their importance as sources of food materials and of popular medicaments, many members of the Annonaceae are also valued as insecticides (Leatemia and Isman 2004b; and Isman 2006; Seffrin *et al.* 2009). Indeed, according to Hernández and Angel (1997), about 29 species of Annonaceous plants exhibit insecticidal properties. Components with insecticidal activity have been isolated from both the leaves and the fruits of annonaceous plants and have typically been found to be acetogenins and alkaloids (González Esquinca *et al.* 2002; Isman 2006). Compounds with insecticidal activity are particularly abundant in the genus *Annona*,

¹Centro de Ciências Agrárias - CECA, Universidade Federal de Alagoas, 57100-000, Rio Largo-AL, Brazil; correspondence to: rcpt@ceca.ufal.br or roseane.predes@uol.com.br or pps@qui.ufal.br. ²Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia - Campus Satuba, 57120-000 - Satuba-AL, Brazil; jsl@qui.ufal.br. ³Instituto de Química e Biotecnologia - IQB, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Maceió-AL, Brazil; mrfl@qui.ufal.br; aegs@qui.ufal.br.

having been detected in no fewer than 13 species. In this context, the species *Annona muricata* L. (Annonaceae), commonly known as graviola, originates from Central America and is widely cultivated because of the commercial value of its edible fruit (Bories *et al.* 1991).

There have been very few studies concerning plants that exhibit potential for the control of the cabbage moth, and none that have examined the variability of such insecticidal activity through the growing season. For this reason, the aim of the present work was to evaluate the larvicidal potential of extracts of leaves of *A. muricata* in the control of *P. xylostella*, and to determine seasonal variation activity of the leaf material through the calendar year.

Material and Methods

Plant material and preparation of plant extracts. Specimens of *A. muricata* were harvested from a commercial plantation located at the Sítio Aldeia Verde in Maceió (Alagoas, Brazil) and identified by Cícero Barros (Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas - IMA, Maceió, Alagoas, Brazil). A voucher specimen was deposited in the herbarium at IMA with the identification number 8530. Samples consisting of both young and mature leaves were collected in October 2001 for the larvicidal study, and on the 17th day of each month between April 2002 and March 2003 for the seasonal evaluation of extracts. Data concerning the levels of precipitation during this period were obtained from the meteorological station of the Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, Alagoas, Brazil (9°27'S 35°27' W 127 m.a.s.l.).

A crude extract of the leaves of *A. muricata* was prepared by steeping freshly comminuted material (200g) in 95% ethanol (1L) in a glass flask maintained at room temperature (26±1°C) for 72h. The ethanolic mixture was filtered and concentrated under reduced pressure using a Buchi (Flawil, Switzerland) model R-114 rotary evaporator, and stored in a labelled screw-capped bottle at 4°C until required for bioassay in 2009. If water remained in the concentrated crude extract, the material was stored in a vacuum desiccator over silica gel. For the larvicidal assay, an accurately weighed aliquot (5g) of the crude extract was dissolved in 10ml of dimethyl sulphoxide (DMSO; Merck, Darmstadt, Germany) and the volume made up to 1L with distilled water. This stock solution was diluted with an appropriate volume of distilled water to yield test solutions containing 1, 2, 3, 4 and 5mg concentrated extract.mL⁻¹.

Determination of larvicidal activity. A population of second generation of *P. xylostella* in the Laboratory of Ecology and Insect Behaviour (UFAL) under standard culture conditions (26±1°C; 60±10% relative humidity; 12h photoperiod).

Seeds of cabbage [*Brassica oleracea* var. *acephala* (Brassicaceae)] were germinated in expanded polystyrene trays containing a commercial soil/compost mixture (top soil: coconut fibre: sugarcane bagasse, 2:1:1) and maintained for 35 days in the greenhouse. Seedlings were transplanted into seedbeds at the Institute of Chemistry and Biotechnology (Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Maceió, Alagoas, Brazil) using standard procedures prescribed for the cultivation of this species (Filgueira 2003) but in the absence of insecticides.

Discs (10cm diameter) were cut with a scalpel blade from around the midrib of leaves harvested from kale plants that

had been cultivated for 40-55 days following transplantation. The discs were then immersed in an aqueous solution of the test extract for 30s and air dried. Twelve newly hatched larvae were placed onto the leaf discs contained in a Petri dish and incubated under standard conditions. Larval lethality was assessed at the start of the incubation period, again on day three and then each day thereafter until the commencement of the pupal phase (*ca.* 12 days). Leaf discs that were completely consumed were replaced with fresh discs that had been treated with the test extract in the same manner as the originals.

Effects of the test extract on larval development, the duration of the larval and pupal stages and the survival of larvae and pupae were evaluated. The experimental design consisted of six randomized treatments with five replicates per treatment each involving observations of 12 larvae. In all cases appropriate control experiments were conducted employing kale leaf discs that had been immersed for 30s in distilled water containing 1% (v/v) DMSO. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA), and means were compared using the Tukey test: statistical analyses were carried out using SANEST software (version 3) (Machado y Zonta 1991).

Seasonal variation in larvicidal activity. Variations in the larvicidal activities of leaves of *A. muricata* were measured using the assay previously described. In each case, an appropriate amount of crude extract was dissolved in DMSO and diluted with distilled water to give a test solution with a final concentration of 5 mg.mL⁻¹. The experimental design consisted of 13 randomised treatments (12 months + control) with five replicates per treatment, each involving observations of 12 larvae. In all cases appropriate control experiments were conducted employing kale leaf discs that had been immersed for 30s in distilled water containing 1% (v/v) DMSO. Data were submitted to ANOVA, and means were compared using the X² test: statistical analyses were carried out using SISVAR software (Ferreira 2008).

Results and Discussion

Larvicidal activity of leaves of *A. muricata*. Larvae of *P. xylostella* suffered 100% mortality when exposed for up to 12 days to kale leaf discs that had been treated with a crude ethanolic extract of freshly harvested leaves of *A. muricata* at a concentration of 5 mg.mL⁻¹ (Table 1). The mortality of the larvae was also significantly increased (to 37.8, 46.2 and 64.8 %, respectively) following exposure to graviola leaf extracts at concentrations of 4, 3, and 2mg.mL⁻¹. Application of the leaf extract at a concentration of 1 mg.mL⁻¹ gave rise to 23% larval mortality although this was not statistically significantly different from the control.

The larvae that were killed by graviola extracts were dark in colour and of small size. Many of the larvae died during ecdysis because they could not liberate the exuvia, which typically remained attached to the posterior part of the abdomen and gave rise to the dark colouration observed. Such morphological aberrations may result from the effect of chemical components on the hormonal system of the insect.

When applied at concentrations of 4 or 3 mg.mL⁻¹, the graviola leaf extracts increased the duration of the larval phase by 2.6 days compared with the control (Table 1). In contrast, exposure to extracts at 2 or 1mg.mL⁻¹ produced

Table 1. Mortality of larvae and pupae, and duration of larval and pupal stages of *Plutella xylostella* exposed to ethanolic extracts of the leaves of *Annona muricata*.

Concentration of extract (mg.mL ⁻¹)	Larval mortality (%) [*]	Duration of larval phase (days) [*]	Duration of pupal phase (days) [*]
5	100.0 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4	58.0 ± 2.04 ^b	10.6 ± 0.45 ^a	5.2 ± 0.18 ^a
3	53.0 ± 7.26 ^{bc}	10.6 ± 0.22 ^a	5.6 ± 0.26 ^a
2	34.8 ± 8.08 ^{cd}	8.8 ± 0.46 ^b	5.4 ± 0.18 ^a
1	23.0 ± 5.53 ^{de}	8.2 ± 0.09 ^b	5.2 ± 0.16 ^a
Control	1.6 ± 1.67 ^e	8.0 ± 0.04 ^b	4.0 ± 0.05 ^b

^{*} Mean values ($n = 5$) ± standard error: within each column, values labelled with different upper case letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

no significant prolongation of the larval phase. Increases in the duration of the larval stage may be associated with the observed lower rates of ingestion of food occasioned by toxic components in the extract. Reduced consumption by larvae would be expected to lead to a reduction in the damage caused by the insect to the host plant (Rodríguez 1995). Moreover, under field conditions, the longer the duration of the larval stage the greater the chance that the larvae would be attacked by predators, parasitoids or entomopathogens.

For those treatments that produced a decrease in the growth rate of the larvae, an inverse correlation ($r = -0.81$; $P = 0.01$) between the duration of larval stage and the viability of the larvae could be demonstrated, even where the mean values of the measurements themselves were not statistically significantly different. Accordingly, it is proposed that leaf extracts of *A. muricata* exhibit, at lower concentrations, insectistatic characteristics although such extracts may not exhibit an acute response against the insect, they would give rise to an overall reduction in the adult population.

The pupal phase of *P. xylostella* was far less affected by exposure to the extracts in comparison with the larval phase. No statistically significant differences were observed in the survival of the pupae between any of the treatments and the control. Furthermore, although exposure to the extracts apparently increased the duration of the pupal phase by one day in comparison with the control (Table 1), no correlation between the extent of this increase and the concentration of extract was observed. It is clear that the larvae are more ex-

posed to the chemical constituents present in the extracts by virtue of their feeding habits.

Seasonal variation in larvicidal activity. Percentages of larvae killed following application of ethanolic extracts (at a concentration of 5mg.mL⁻¹) of leaves of *A. muricata* collected monthly over one year are shown in Fig. 1, together with the monthly precipitation record for the same period. Extracts exhibiting the greatest bioactivity were those obtained in the period during which there was minimal or no rainfall. The extract obtained in October 2002 proved to be 100% lethal to larvae when applied at a concentration of 5mg.mL⁻¹, significantly different from the values recorded for extracts obtained in the four subsequent months up until February 2003. In contrast, mortalities induced by extracts obtained from leaves harvested during other months of the year were variable and generally rather low, with mean values ranging from 49.6% in May to 14.6% in August.

The yields of ethanolic extracts obtained from leaves of *A. muricata* over the 12 month collection period are shown in Table 2. There appear to be no association between yields of extracts and larvicidal activity or level of precipitation.

The influence of the time of collection of plant material on the profile and amount of secondary compounds present has been the subject of a number of studies. Veselá *et al.* (1999) reported that bark extracts of *Taxus baccata* L (Taxaceae) collected at various times during 1993 and 1994 exhibited significant variations in the concentrations of five

Table 2. Yields of extracts obtained from leaves of *Annona muricata* collected during different months of the year.

Month / year of collection	Fresh weight of leaf material (g)	Weight of dried extract (g)	Yield (%)
April / 2002	290.00	38.69	13.34
May / 2002	300.00	17.31	5.77
June / 2002	260.00	17.47	6.72
July / 2002	320.00	26.62	8.32
August / 2002	300.00	34.53	11.51
September / 2002	280.00	31.36	11.12
October / 2002	300.00	32.96	10.99
November / 2002	330.00	40.52	12.28
December / 2002	360.00	60.95	16.93
January / 2003	230.00	33.70	14.65
February / 2003	280.00	20.36	7.27
March / 2003	310.00	40.18	12.96

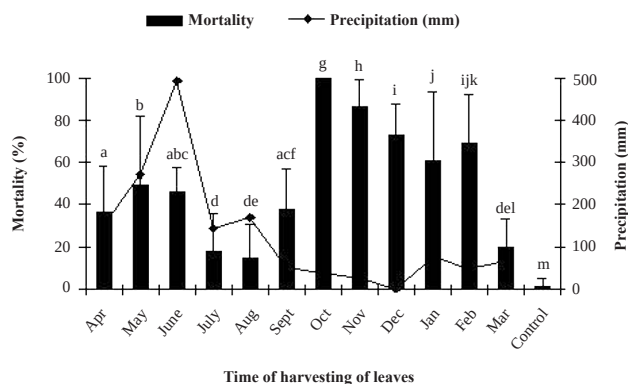


Figure 1. Observed mortalities of *Plutella xylostella* larvae exposed to kale leaves treated with ethanolic extracts of leaves of *Annona muricata* collected between the months of April 2002 and March 2003. The levels of precipitation recorded in the field during the months of collection of plant material are shown. Bars labeled with the different lower case letters are significantly different from each other ($P \leq 0.05$) as determined by the X^2 test.

taxanes. These authors concluded that diterpenes were accumulated in highest concentrations in October and in lowest amounts in January. Gu *et al.* (1999) reported that the evaluation of annonaceous acetogenins varied quantitatively in monthly samples of paw paw (*Asimina triloba*). They observed that the concentrations of the three major and most active annonaceous acetogenins, bullatacin, asimicin and trilobacin increased significantly in May and June. Other workers have also shown that the seasonal variation in bioactive products can give rise to alterations in the biological activity of plant material (Elsohly *et al.* 1997; Park *et al.* 1998; Dorn 2003).

The seasonal variation in the insecticidal activity of the leaves of *A. muricata* revealed in the present study probably reflects a significant variation in the accumulation of secondary compounds during the different seasons of the year. Further studies need to be carried out, however, in order to determine the role of climate change on the accumulation of these metabolites. In practical terms, the uniformly high larvicidal activities exhibited by the leaves during the dry season suggest that the most advantageous time of the year for the collection of plant material for its insecticidal properties is from October to February. Furthermore, the significant qualitative and quantitative variations in the biological activity exhibited by the leaf material imply important ramifications with respect to the strategy involved in using the plant for the control of the cabbage moth and for future studies concerning the isolation and determination of the active principles.

In common with *A. muricata*, a number of Annonaceous species contain toxic components that impart powerful insecticidal activity to the plant and indicate their potential use in the control of insect pests. Thus, Prates *et al.* (1999) reported that extracts of seeds of araticum (*A. crassiflora*), supplied at a concentration of 10mg.mL⁻¹, were 100% fatal to larvae of the maize pest *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (fall armyworm; "largarta-do-cartucho do milho"; Lepidoptera: Noctuidae) within 12 days of hatching. *A. squamosa* (Annonaceae) has also been shown to possess potentially valuable insecticidal properties (Gritsanapan 1997; Catarino y Ezequiel 1999). Through activity-monitored fractionation of seed extracts of *A. squamosa*, Londershausen *et al.* (1991)

established that two of the active principles were the acetogenins annonin I and annonacin A.

Cited literature

- BORIES, C., Loiseau, P.; Cortes, D.; Myint, S.H.; Hocquemiller, R.; Gayral, P.; Cavé, A.; Laurens, A.. 1991. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds, *Planta Medica* 57: 434-436.
- CASTELO BRANCO, M.; GUIMARÃES, A.L. 1990. Controle da traça das crucíferas em repolho. *Horticultura Brasileira* 8: 24-25.
- CASTELO BRANCO, M. 1998. Inseticidas para o controle de traça-das-crucíferas: Avaliação da eficiência, resistência e impacto sobre inimigos naturais: Embrapa-CNPq, Brasília, pp. 1-7.
- CATARINO, P.S.; EZEQUIEL, M.D. 1999. Control de moscas de la fruta com extractos de annona *Annona squamosa* L. (Annonaceae), In Proceedings of the 2nd congresso internacional de Anonáceas, Universidad de Chiapas, Chiapas, pp. 85-86.
- DORN, A.H.S. 2003. Monitoring seasonal variation in apple fruit volatile emissions *in situ* using solid-phase micro-extraction, *Phytochemistry Analysis* 14:232-240.
- ELSOHLY, H.N.; CROMM JR, E.M.; KOPYCKI, W.J.; JOSHI, A.S.; MCCHESENEY, J.D. 1997. Diurnal and seasonal effects on the taxane content of the clippings of certain *Taxus* cultivars, *Phytochemistry Analysis* 8:124-129.
- FERREIRA, D.F. 2008. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium (Lavras)* 6: 36-41.
- FILGUEIRA, F.A.R. 2003. Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças, 2 edn, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp. 275-291.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; Omoto, O. 2002. *Entomologia agrícola*, FEALQ, Piracicaba. 920p.
- GONZÁLEZ ESQUINCA, A.R.; PÉREZ AMADOR, M.C.; LUNA CÁZARES, L.M.; DE LA C RUZ CHACÓN, I. 2002. Análise comparativa de alcalóides em três espécies de *Annona*, In Proceedings of the 3rd congresso internacional de Anonáceas, Quilota, Chile, pp. 3.
- GRITSANAPAN, W. 1997. Insecticidal activity of *Annona squamosa* L. In Proceedings of the 1st congresso internacional de Anonáceas, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, pp 187-192.
- GU, Z.; ZHOU, D.; LEWIS, N.J.; WU, J.; JOHNSON, H.A.; MCLAUGHLIN, J.L.; GORDON, J. 1999. Quantitative Evaluation of Annonaceous Acetogenins in Monthly Samples of Paw Paw (*Asimina triloba*) Twigs by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/ Tandem Mass Spectrometry. *Phytochemistry Analysis* 10: 32-38.
- HERNÁNDEZ, C.R.; ANGEL, D.N. 1997. Anonáceas con propiedades insecticidas, In Anonáceas produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia), ed by São José AR, Souza IVB, Moraes OM and Rebouças TNH, DFZ/UESB, Vitória da Conquista, pp. 229-239.
- HILL, D.S. 1990. Pests of store products and their control, British Library, London. 274 p.
- ISMÁN, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world *Annual Review of Entomology* 51: 45-66.
- JACOBSON, M. 1989. Botanical pesticides: past, present and future, In *Insecticides of plant origin*, ed by Arnason JT, Philogene BJR and Morand P., American Chemical Society, Washington, pp. 1-7.
- KUMAR, A.R.V.; JAYAPPA, J.; CHANDRASHEKARA, K. 2000. Relative insecticidal value: An index for identifying Neem trees high insecticidal yield. *Current Science* 79:1474-1478.
- LEATEMIA, J.A.; ISMAN, M.B. 2004a. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp, *Lansium domesticum* and

- Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. Phytoparasitica 32:30-37.
- LONDERSHAUSEN, M.; LEICHT, W.; LIEB, F.; MOESCHLER, H. 1991. Molecular mode of action of annonins. Pesticide Science 33:427-438.
- MACHADO, A.A.; ZONTA, E.P. 1991. Manual do SANEST: Sistema de análise estatística para microcomputadores. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 102p.
- PARK, M.K.; PARK, J.H.; KIM, N.Y.; SHIN, Y.G.; CHOI, Y.S.; LEE, J.G.; KIM, K.H.; LEE, S.K. 1998. Analysis of 13 phenolic compounds in *Aloe* species by high performance liquid chromatography. Phytochemistry Analysis 9:186-191.
- PRATES, H.T.T.; VIANA, P.A.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. ; OLIVEIRA, A.B. 1999. Avaliação da atividade inseticida de extratos vegetais para o controle de *Spodoptera frugiperda* em laboratório, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, pp. 1-3.
- RODRÍGUEZ, HC. 1995. Efeito de extratos aquosos de Meliaceae no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) Tese Doutorado de Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 100p.
- SEFFRIN, R.C.; SHIKANO, I.; AKHTAR, Y.; ISMAN, M.B. 2009. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. Crop Protection 29: 20-24.
- VESELÁ, D.; SAMAN, D.; VALTEROVÁ, I.; VANEK, T. 1999. Seasonal variations in the content of taxanes in the bark of *Taxus baccata* L. Phytochemistry Analysis 10:319-321.
- VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M.; GUIMARÃES, A.L. 1990. Controle químico da traça das crucíferas no Distrito Federal. Horticultura Brasileira 8: 10-11.

Received: 11-nov-2010 • Accepted: 23-may-2011

Relación entre *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae) y el virus de la mancha anular del papayo (PRSV-p)

Relationship between *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae) and the papaya ringspot virus (PRSV-p)

JOSÉ ÁNGEL ALCANTARA J.¹, MA. TERESA SANTILLÁN-GALICIA², GABRIEL OTERO-COLINA², ANTONIO MORA A.², M. ALEJANDRA GUTIÉRREZ E.³ y ELÍAS HERNÁNDEZ C.⁴

Resumen: *Polyphagotarsonemus latus* es una especie cosmopolita que afecta diferentes cultivos tanto en áreas templadas como tropicales. El principal daño ocasionado por esta especie es la reducción o deformación de hojas jóvenes, brotes, frutos y flores. Cuando *P. latus* se alimenta de hojas de papayo, éstas presentan clorosis y las hojas se enrollan. En México, el daño causado por este ácaro es conocido como “mano de chango” porque el área de las hojas de papayo se reduce casi hasta las nervaduras. Este daño es similar al causado por el *Virus de la mancha anular del papayo* (PRSV-p). Debido a que *P. latus* y PRSV-p causan daños similares a las hojas de papayo, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de *P. latus*, PRSV-p y su posible interacción en la reducción del área foliar en plantas de papayo. El diagnóstico de PRSV-p se realizó mediante RT-PCR. Los efectos producidos por *P. latus* fueron similares a los producidos por PRSV-p; sin embargo, éstos pueden diferenciarse por la zona que es atacada. Los daños de los ácaros sólo se encontraron en las hojas más jóvenes, la clorosis siempre comenzaba de la vena central hacia la parte terminal de los folíolos, a diferencia de la producida por el virus que podía presentarse en cualquier parte de la lámina foliar. La altitud y el diámetro de los tallos pueden verse afectados por la infestación de los ácaros, lo cual no sucede con la presencia del virus.

Palabras clave: Papayo. Área foliar. Relación ácaro-virus.

Abstract: *Polyphagotarsonemus latus* is a cosmopolitan species that affects several crops in tropical and temperate areas. The main damage caused by the infestation of this species is the reduction or deformation of young leaves, buds, fruits and flowers. When *P. latus* feeds on young papaya leaves, these present chlorosis and down curled distorted areas. In Mexico, the damage caused by this mite is called “monkey’s hand” because the area of the young papaya leaves is reduced leaving only the veins visible. This damage is similar to the symptoms caused by the infection of *Papaya ringspot virus-p* (PRSV-p). As *P. latus* and PRSV-p may cause similar damage to papaya leaves, the aim of this investigation was to determine the effect of *P. latus*, PRSV-p and their possible interaction in the reduction of foliar area. The diagnosis of PRSV-p was done by RT-PCR. The results showed that the effect produced by *P. latus* and PRSV-p were similar; however, the mites were found only on the younger leaves. As a result, the damage was observed only on these leaves, the chlorosis produced by the mites started in the central vein towards the end of the leaves; on the contrary, the damage of the virus can be found in any part of the leaves. The height and diameter of the stems in the plants were affected only by the infestation of the mites, as no difference was found on plants inoculated with PRSV-p.

Key words: Papayo. Leaf area. Virus-mite relationship.

Introducción

El ácaro blanco *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) (Acari: Tarsonemidae) es una especie de importancia económica por ser polífaga y cosmopolita, ya que puede alimentarse de diversos cultivos como papa (*Solanum tuberosum* Linneo, 1753), frijol (*Phaseolus vulgaris* Linneo, 1753), pimiento (*Capsicum annuum* Linneo, 1753), pepino (*Cucumis sativum* Linneo, 1753), berenjena (*Solanum melongena* Linneo, 1753), calabaza (*Cucurbita pepo* Linneo, 1753), tomate (*Lycopersicon esculentum* Linneo, 1753), papaya (*Carica papaya* Linneo, 1753), melón (*Cucumis melo* Linnaeus, 1753), maracuyá (*Passiflora edulis* Linnaeus, 1753), guayaba (*Psidium guajava* Linnaeus, 1753), mango (*Mangifera indica* Linnaeus, 1753) y cítricos, entre otros (Cross y Bassett 1982; Gerson 1992; Peña y Bullock 1994; De Coss-Romero y Peña 1998). *P. latus* se alimenta de las yemas en formación, de ho-

jas o frutos de sus huéspedes (Jeppson *et al.* 1975). Los daños que ocasiona a la planta se manifiestan por una variedad de síntomas que se le atribuyen a la toxicidad de su saliva (Gerson 1992) y a la susceptibilidad de la variedad de planta de la que se está alimentando (Peña y Bullock 1994). En general, se le encuentra en el envés de las hojas jóvenes, en donde perfora la epidermis de la lámina foliar donde succiona su contenido celular (Jeppson *et al.* 1975). Se ha sugerido que esta acción da como resultado la formación de manchas descoloridas en las hojas que aumentan conforme aumenta la intensidad de alimentación de la población de *P. latus*. Así mismo, la lámina foliar comienza a distorsionarse hasta deformarse o sus orillas se enroscan hacia adentro (Cross y Bassett 1982; Gerson 1992; Peña y Bullock 1994; De Coss-Romero y Peña 1998). En infestaciones severas se inhibe el crecimiento del tallo y la producción de frutos (Collier *et al.* 2004).

¹ Estudiante de Doctorado. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Av. Guerrero No. 81, Iguala, Gro. México, C.P. 4000. ² Profesor Investigador. Ph.D. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo Edo. de México, México, C.P. 56230 teresa.santillan.galicia@gmail.com. Autora para correspondencia. ³ Profesor Investigador. Ph. D. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo Edo. de México, México, C.P. 56230. ⁴ Profesor Investigador. Ph. D. Universidad Autónoma de Guerrero, Calle Corregidora No. 55 “a”, Barrio de San Mateo, Gro. México, C.P. 39055.

En México, el cultivo de papayo tiene una gran importancia socioeconómica ya que en los últimos cuatro años ha ido en aumento la superficie cultivada. Durante 2007 se cultivaron 22.451 ha de las que se produjeron 821.540 toneladas de fruta. Como resultado de dicha producción México ocupó el tercer lugar a nivel mundial en producción de papaya y el primer lugar como exportador de dicho producto (37%) (FAO 2007).

En papayo, se ha observado que *P. latus* puede ocasionar una reducción de la lámina foliar casi hasta las nervaduras y deformación de hojas (Aubert *et al.* 1981; Acuña *et al.* 2005; Acuña y Agostini 2004; De Coss 2006), síntomas que también se han atribuido a la infección por el *Virus de la mancha anular del papayo* (PRSV-p), por sus siglas en inglés (Jensen 1949; Téliz *et al.* 1991; Gonsalves 1998). Este virus, al infectar plantas de papayo, también puede causar aclaramiento de venas en las hojas más nuevas, amarillamiento, manchas aceitosas en hojas, tallos y peciolas y deformación de hojas. En frutos se observan manchas anulares, reducción de tamaño y deformación (Riding 1978; Téliz *et al.* 1991; Sánchez y Martínez 1976; Kiranmai *et al.* 1998).

De manera general, siempre se menciona a cada uno de estos organismos (*P. latus* y PRSV-p) como los agentes causales de la deformación de las hojas de papayo, pero no se ha considerado la interacción que puede existir entre ellos. Es importante determinar el agente causal de dicha malformación para poder establecer una estrategia de manejo adecuada, ya que la atribución errónea de cierta sintomatología a un agente causal puede ocasionar mala selección de un método de control y un manejo deficiente. No existen, hasta donde sabemos, estudios que comparen directamente los daños causados por *P. latus* y PRSV-p. Considerando lo anterior, se realizó la siguiente investigación con el objetivo de determinar el efecto de *P. latus*, PRSV-p y su posible interacción en la reducción del área foliar en plantas de papayo.

Material y Métodos

Todos los experimentos se llevaron a cabo dentro de una cámara de cría con temperatura entre 28 y 30°C, humedad relativa de 60 a 70%, intensidad lumínica de 6300 lux (103 VE M² l⁻¹) y un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad. Los experimentos se realizaron durante 2007 y 2008 en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, México.

La colonia de *P. latus* se inició con individuos colectados de una plantación de chile (*Capsicum* sp) de la comunidad del Papayo, Costa Grande de Guerrero, México. Una vez confirmada la especie mediante claves taxonómicas para la familia Tarsonemidae (Lindquist 1986), se colectaron las hembras adultas y se depositaron en hojas jóvenes de plantas de frijol (var. Jamapa). En cuanto maduraban las hojas de frijol infestadas, se cortaban y se colocaban sobre plantas de frijol jóvenes para que los ácaros se movieran a éstas. La siembra de frijol se realizó en un sustrato esterilizado de Growing Mix y Agrolita (1000:100 g). Las semillas se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 6% durante 15 minutos, posteriormente se secaron y se sembraron en macetas de 1L con el sustrato previamente mencionado. A los siete días de la emergencia de las plantas, se amarraron para evitar que se doblaran durante su manipulación. La siembra de frijol se hizo cada siete días para mantener constante la colonia de ácaros. Las plantas se regaron cada dos días.

Se obtuvieron semillas certificadas de papaya variedad Maradol a las cuales se les dio un tratamiento pre-germinativo que consistió en remojarlas durante tres días en agua, renovando ésta cada ocho horas (especificaciones recomendadas por el proveedor). Al tercer día se les aplicó 1g de N-triclorometilto-4 ciclohexeno-1,2-dicarboximida (Captan[®] 50 PH) para evitar la contaminación por hongos. Posteriormente, las semillas se sembraron en recipientes de germinación, y una semana después de germinadas se trasplantaron individualmente a vasos de unicel de 150 mL usando como sustrato Growing Mix y Agrolita estéril. Las plantas se regaron cada dos días con una solución nutritiva universal (Steiner 1968). Las plantas utilizadas en todos los experimentos estaban en la etapa fenológica de cuatro y cinco pares de hojas verdaderas, alcanzada dos meses después de su germinación.

Para la detección de PRSV-p en las plantas usadas en los experimentos, se cortó una hoja de cada planta antes y después de realizar cada experimento. Debido a que este virus es sistémico, se supone que en caso de estar presente está distribuido en toda la planta, por lo que las hojas se seleccionaron de manera aleatoria. Las hojas se mantuvieron a -20°C y posteriormente se analizaron mediante transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El ARN total de cada hoja se extrajo con Trizol (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Antes de la reacción de transcripción inversa, se verificó la integridad del ARN de cada muestra mediante un gel desnaturante de formaldehído y la concentración de ARN se determinó mediante un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

En la reacción de transcripción inversa se utilizaron 5 µg de RNA y 30 pmol/µl del primer oligonucleótido 3' (Ruiz-Castro y Silva-Rosales 1997) en un volumen final de 14,5 µL, los cuales se incubaron por 10 min a 70°C y 2 min a 4°C. Posteriormente se le agregó una mezcla de dideoxinucleótidos a una concentración de 10 mM más 0,5 µL de la enzima transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, United States), 5 µL de 5X del "First strand buffer" y 10 mM de DTT (incluida con la SuperScript II). La síntesis de ADN se realizó por 60 min a 42°C. La reacción de PCR se llevó a cabo al agregar el oligonucleótido 5' (Ruiz-Castro y Silva-Rosales 1997) a una concentración de 30 pmol, 50mM de MgCl₂, 5 unidades de Taq polimerasa (Quiagen, California USA) con un volumen final de reacción de 50 µL. Las condiciones de reacción fueron un ciclo inicial de desnaturación a 94°C durante 5 min, seguidos por 35 ciclos de desnaturación a 94°C durante 45s, hibridación a 58°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 2 min y un ciclo final de extensión a 72°C durante 7 min en un termociclador (BIO-RAD). Los productos finales se tiñeron con bromuro de etidio (10mg/µl), se visualizaron en un gel de agarosa y buffer TAE al 0,8% y finalmente se fotografiaron. En cada etapa de la detección de PRSV-p (transcripción inversa y PCR) se incluyó un testigo positivo, que era una muestra conocida de PRSV-p, y un testigo negativo compuesto por agua destilada estéril libre de RNasas, los cuales sirvieron primero, para confirmar la validez de las reacciones y la presencia o ausencia del virus, y segundo, para confirmar la no existencia de contaminación cruzada.

Efecto de *Polyphagotarsonemus latus*. Se seleccionaron 32 plantas de papayo con cinco y seis pares de hojas verdaderas, las cuales se distribuyeron al azar en cuatro grupos. Antes de iniciar el experimento se midió el diámetro del tallo y la

altura de las plantas, y se tomó una hoja para verificar la ausencia de PRSV-p mediante RT-PCR. Los tratamientos consistieron en inocular diferente número de hembras adultas de *P. latus*, tal y como se describe a continuación: T1 (10 ácaros), T2 (20 ácaros), T3 (30 ácaros) y T4 (testigo, al cual no se le añadió ningún ácaro); se decidió evaluar este número de ácaros para facilitar su manipulación. Las plantas se revisaron con un microscopio estereoscópico 24 h después de haber inoculado a los ácaros para corroborar su establecimiento y además fueron revisadas semanalmente para verificar el daño causado por los ácaros. Las observaciones continuaron durante nueve semanas, al término de las cuales se midió el ancho del tallo y la altura de las plantas, se fotografiaron y registraron los cambios que sufrieron durante el desarrollo del experimento; y finalmente, se cortaron todas las hojas, iniciando con la hoja en la que se inocularon los ácaros para medir el área foliar usando el método propuesto por (O'neal *et al.* 2002).

Todas las hojas se digitalizaron con un escáner (HP ScanJet 4990), y posteriormente se procesaron las imágenes usando el software Adobe Photoshop SC3 versión 10,0. Finalmente, el área foliar se obtuvo al convertir los píxeles a centímetros cuadrados mediante el software UTHSCSA Image Tool versión 3,0. La hoja más joven fue almacenada en toallas de papel a -20 °C para corroborar la presencia/ausencia de PRSV-p mediante RT-PCR.

El experimento se realizó en un diseño completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento y todo el experimento se repitió en dos ocasiones. Los datos de área foliar, ancho del tallo y altura de planta se analizaron mediante una prueba ANOVA con una estructura de bloques para ocasión y repetición, para determinar primeramente si había diferencia entre el tratamiento T4 (testigo) y la combinación de los tratamientos T1, T2 y T3; finalmente se determinó si había diferencias entre los tratamientos T1, T2 y T3 (inoculados con ácaros). Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico GenStat (v8.2) (Payne *et al.* 2005).

Efecto de PRSV-p y su interacción con *Polyphagotarsonemus latus*. Antes de iniciar el experimento se hizo un diagnóstico de las plantas utilizadas para confirmar la ausencia de PRSV-p; así mismo se midieron el diámetro del tallo y la altura de las plantas. Se evaluaron cinco tratamientos: T1, plantas inoculadas con PRSV-p; T2, plantas infestadas con 30 hembras adultas de *P. latus*, cantidad con la cual observamos que los daños producidos por los ácaros fueron claramente visibles; T3, plantas inoculadas con agua destilada; T4, plantas inoculadas con PRSV-p más 30 hembras de *P. latus* y T5, plantas testigo sin hembras de *P. latus* ni PRSV-p.

Los tratamientos T1 y T3 se inocularon mediante el raspado con un hisopo, previamente esterilizado en una autoclave, humedecido con una suspensión de PRSV-p en agua destilada estéril. El raspado se hizo sobre la lámina de una hoja preseleccionada proveniente de la parte media de la planta, hasta que ésta quedó translúcida (Ruiz-Castro y Silva-Rosales 1997). El inóculo de PRSV-p se obtuvo a partir de 1 g de hojas de plantas infectadas con PRSV-p, las cuales se molieron con 3 mL de agua destilada estéril (Silva-Rosales, comunicación personal).

Las plantas se revisaron semanalmente para verificar el daño causado por los ácaros y PRSV-p. Las observaciones continuaron durante nueve semanas. Al término de este periodo, se midió el diámetro del tallo y la altura de plantas,

se fotografiaron y registraron los cambios que éstas sufrieron durante el desarrollo experimental, y finalmente se colectaron todas las hojas, progresivamente hacia arriba, a partir de la hoja en la que se inocularon los ácaros o el virus. Siguiendo el método descrito en el experimento anterior, se determinó el área de todas las hojas colectadas. Las plantas que se consideraron positivas a PRSV-p fueron aquellas que presentaron los síntomas del virus (aclaramiento de las venas y manchas aceitosas en las hojas) y que además fueron positivas para el virus mediante la técnica de RT-PCR.

Las variables estudiadas y el procedimiento para su obtención fueron los mismos empleados y descritos anteriormente. El experimento se realizó en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Los datos de área foliar, ancho del tallo y altura de planta se analizaron mediante una prueba ANOVA para diseños desbalanceados. Para analizar las diferencias de área foliar entre los tratamientos, estos fueron particionados en cuatro contrastes ortogonales. Primero se comparó el tratamiento T5 (testigo) y la combinación de los tratamientos T1, T2, T3 y T4; segundo, se comparó el tratamiento T3 con la combinación de los tratamientos T4, T2, y T1; tercero, se comparó el tratamiento T4 con la combinación de los tratamientos T2 y T1, y finalmente se compararon los tratamientos T2 y T1. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico GenStat (v 8,2) (Payne *et al.* 2005).

Resultados

Efecto de *Polyphagotarsonemus latus*. Se encontraron diferencias significativas entre el T4 (testigo) con respecto a los otros tratamientos combinados en donde se inocularon ácaros (T1, T2 y T3) ($F_{1,309} = 15,42$; $P < 0,001$) (Fig. 1) pero no hubo diferencias significativas en el área foliar de plantas entre los tratamientos T1, T2 y T3 ($F_{2,309} = 1,57$; $P = 0,210$) (Fig. 1).

Con respecto al diámetro de tallo y la altura de las plantas, al realizar el análisis antes de iniciar la primera repetición del experimento no hubo diferencias significativas de estas dos variables en las plantas usadas entre los tratamientos ($F_{3,26} = 1,36$, $P = 0,277$; $F_{4,26} = 1,19$, $P = 0,332$, respectivamente). Al final del experimento se encontraron diferencias significativas en la variable altura entre los tratamientos ($F_{3,26} = 19,84$; $P < 0,001$). La mayor altura se obtuvo en el tratamiento T4 y la menor con el tratamiento T3 (Fig. 2A). Igualmente se encontraron diferencias significativas en el diámetro del tallo

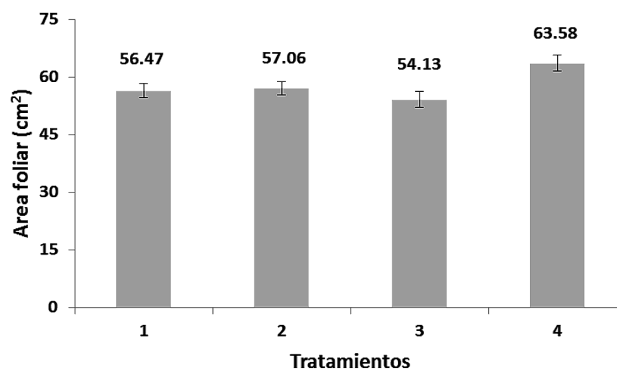


Figura 1. Área foliar de plantas de papayo afectas por la infestación de *P. latus*. T1= 10 ácaros; T2= 20 ácaros; T3= 30 ácaros y T4= testigo, sin ácaros.

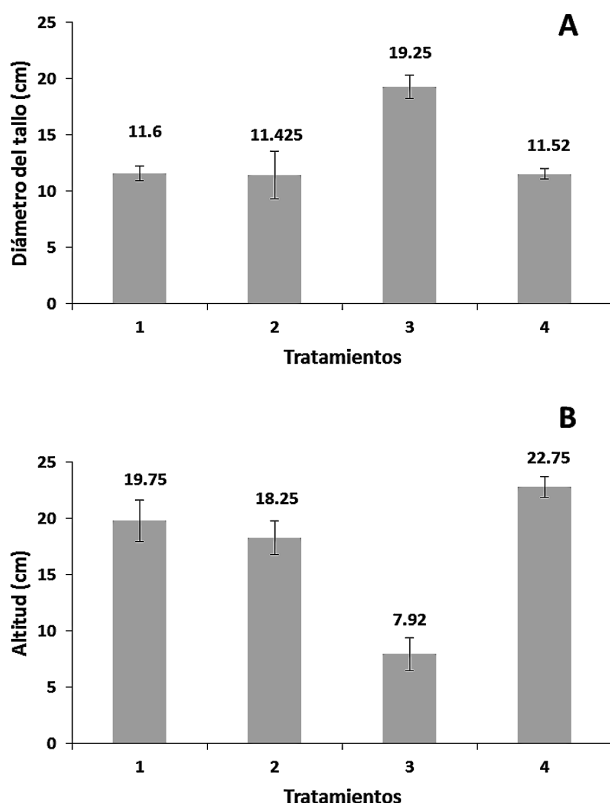


Figura 2. Altitud (A) y diámetro (B) de de plantas de papayo afectas por la infestación de *P. latus*. T1= 10 ácaros; T2= 20 ácaros; T3= 30 ácaros y T4= testigo, sin ácaros. N=312.

($F_{3,26} = 7,95$; $P < 0,001$), e l cual fue mayor con el tratamiento T3 (30 ácaros), y el menor con el tratamiento T2 (20 ácaros) (Fig. 2B).

Los síntomas ocasionados por la alimentación de *P. latus* comenzaron con una pequeña decoloración de la lámina foliar en el centro de la hoja (Fig. 3A), la cual posteriormente se extendió conforme aumentó la población del ácaro (Fig. 3B). Al extenderse esa decoloración, también comenzó a cambiar el patrón de venación de la hoja (Fig. 3C y D). Estos síntomas fueron más evidentes en el tratamiento T3 (30 ácaros por planta). El análisis de PCR mostró que el virus no estuvo presente en ninguna de las plantas experimentales, lo cual confirma que la sintomatología cuantificada y observada es atribuible únicamente al efecto de la alimentación de los ácaros.

Efecto de PRSV-p y su interacción con *Polyphagotarsonemus latus*. Se presentó una diferencia significativa entre el tratamiento T5 y la combinación de los tratamientos T1, T2, T3 y T4 ($F_{1,209} = 26,07$, $P < 0,001$). La mayor área foliar se observó en el tratamiento T5 (testigo absoluto) (110,16 cm²) comparado con los otros tratamientos (Fig. 4). No hubo diferencias significativas entre el tratamiento T3 y la combinación de los tratamientos T4, T2, y T1 ($F_{1,209} = 0,44$, $P = 0,508$). Se encontraron diferencias significativas al comparar el tratamiento T4 con la combinación de los tratamientos T2 y T1 ($F_{1,209} = 12,45$, $P < 0,001$), donde la mayor reducción en área foliar se registró en el tratamiento T4 (inoculación de PRSV-p más virus) comparado con los tratamientos que contenían al ácaro (T2) y al virus (T1) por separado (Fig. 4). Final-

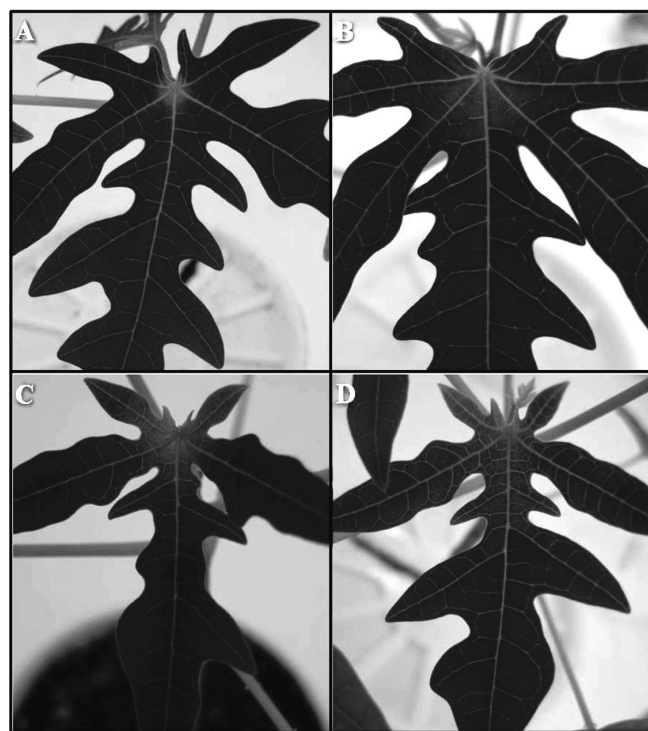


Figura 3. Daños causados a las plantas de papayo cuando 30 hembras adultas fueron inoculadas. **A.** Clorosis en la parte central al inicio de la nervadura central. **B.** Clorosis extendiéndose hacia las partes distales de las hojas. **C.** Aclaramiento de las nervaduras. **D.** Cambio de la estructura de las nervaduras.

mente, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T2 ($F_{1,209} = 1,51$, $P = 0,220$), lo que señala un efecto similar en la reducción de área foliar ocasionado por el virus y el ácaro respectivamente (Fig. 4).

Con respecto al diámetro de tallo y la altitud de las plantas, antes de iniciar el experimento no hubo diferencias significativas entre las plantas usadas en todos los tratamientos ($F_{4,16} = 0,53$, $P = 0,719$; $F_{4,16} = 0,54$, $P = 0,711$, respectivamente). Tampoco hubo diferencias significativas en estas variables entre los tratamientos al término del experimento ($F_{4,16} = 0,60$, $P = 0,667$; $F_{4,16} = 1,32$, $P = 0,306$).

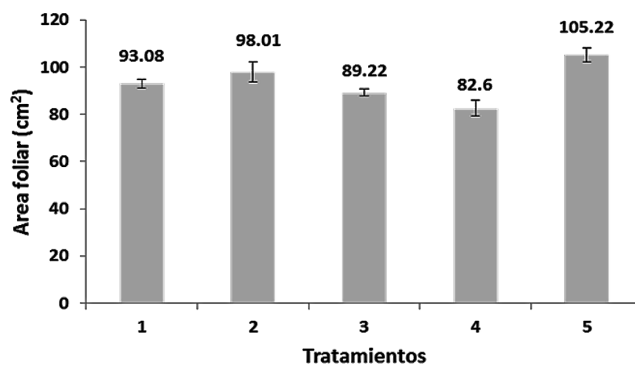


Figura 4. Área foliar de plantas de papayo afectas por la infestación de *P. latus*. T1= Inoculación de PRSV-p; T2= 30 ácaros; T3= Inoculación de agua destilada; T4= 30 ácaros más inoculación de PRSV-p y T5= Plantas testigo sin hembras de *P. latus* ni PRSV-p. N=212.

Los síntomas observados en los tratamientos con virus, ácaros, y virus más ácaros fueron similares a los anteriormente descritos; venación más aparente, reducción del área foliar y decoloración de la lámina foliar en el centro de la hoja (Fig. 5). Las deformaciones de la lámina foliar fueron más evidentes en el tratamiento en donde se inoculaban 30 ácaros (Fig. 6).

Con el análisis de PCR realizado en todas las plantas de papayo antes del establecimiento del experimento, se pudo confirmar que el virus no estuvo presente en ninguna de las plantas experimentales. Posteriormente, al aplicar el mismo análisis a todas las plantas al término del experimento, se encontró que el virus no estuvo presente en los tratamientos T2 (30 ácaros por planta), T3 (agua destilada) y T5 (testigo absoluto). El mismo análisis realizado en las plantas de los tratamientos T1 (inoculado con PRSV-p) y T4 (inoculado con ácaros y PRSV-p) mostró que PRSV-p no fue detectado en todas las plantas inoculadas con virus o virus más ácaros, por lo que únicamente las plantas que fueron positivas al virus se consideraron para el análisis estadístico.

Discusión

En general, los resultados del primer experimento muestran que hubo una reducción en el área foliar de las plantas inoculadas con ácaros comparados con el testigo, lo cual está de acuerdo con lo reportado por otros autores (De Coss-Romero y Peña 1998; De Coss 2006), pero no se encontró una relación directa en el grado de reducción foliar y la densidad inicial de ácaros inoculados, puesto que no se observaron diferencias significativas entre ellos. Es probable que las densidades de ácaros evaluadas no fueron suficientes para tener un efecto significativo, y pudo haber sido enmascarado por diferencias en incrementos poblacionales de cada grupo de hembras inoculadas en las diferentes plantas, ya que a pesar de haberse confirmado el establecimiento de cada grupo de ácaros en cada planta, no se tuvo control sobre el incremento de la población. A pesar de observar una reducción del área foliar ésta no tuvo la magnitud que describen Aubert *et al.* (1981) y De Coss (2006). Esta diferencia puede deberse a la cantidad de ácaros inoculados, ya que los investigadores citados experimentaron con un mayor número de ácaros por planta. El análisis de PCR realizado en todas las plantas de este experimento, antes y después del mismo, confirma que el efecto encontrado fue atribuible al ácaro y no al virus.

En el segundo experimento, la máxima reducción foliar se encontró en el tratamiento T4 (ácaros más PRSV-p), y la menor reducción foliar en el tratamiento T5 (testigo absoluto), pero hubo un efecto intermedio y similar entre ellos en los tratamientos T1, T2 y T3, lo que sugiere un efecto similar por el ácaro y el virus al ser evaluados de manera independiente. Es probable que este efecto pueda ser diferente al modificar las concentraciones de virus o el número de ácaros inoculados, pero esto deberá ser confirmado en futuros experimentos. El efecto del raspado de las plantas con un hisopo con agua destilada, realizado para la inoculación del virus en los tratamientos T1 y T4, no tuvo un efecto adicional en la reducción del área foliar.

Al evaluar la altitud de las plantas y el diámetro del tallo se observó, al menos en el primer experimento (efecto de *Polypogonaronemus latus*), que *P. latus* pudiera tener influencia en la disminución de la altitud y el grosor del tallo, ya que las plantas testigo crecieron mucho más en comparación con

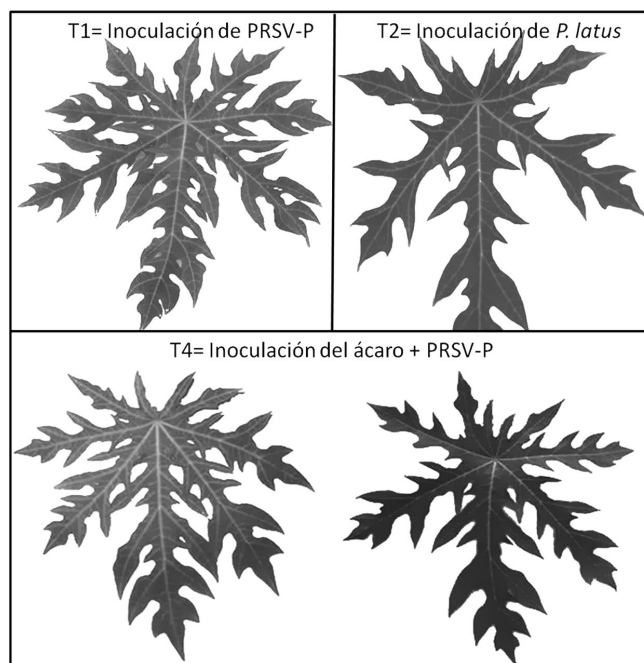


Figura 5. Hojas de papayo que muestran los daños cualitativos que producen *P. latus* y PRSV-p.

aquellas en donde se inoculaban 30 hembras; sin embargo, el diámetro del tallo fue más grande en este último tratamiento. Daños similares han sido observados en otros trabajos en donde *P. latus* fue inoculado en plantas de papa (Peña y Bullock 1994), en Chile (*Capsicum* spp.) (De Coss-Romero y Peña 1998) y en papayo (De Coss 2006). Estos parámetros, sin embargo, parecieran depender del tipo de cultivo u hospedante del que se alimenta el ácaro.

En cuanto a los daños visuales cualitativos en ambos experimentos, es evidente que aquellos ocasionados por los ácaros son muy similares a los producidos por PRSV-p, tales como la venación más clara, decoloración de la lámina foliar y reducción del área foliar (Vegas *et al.* 1985; Téliz *et al.* 1991; Gonsalves *et al.* 2008; Tripathi *et al.* 2008). Sin embargo, hay diferencias que permiten en cierto grado determinar si el daño es producido por *P. latus* o por PRSV-p. Por ejem-

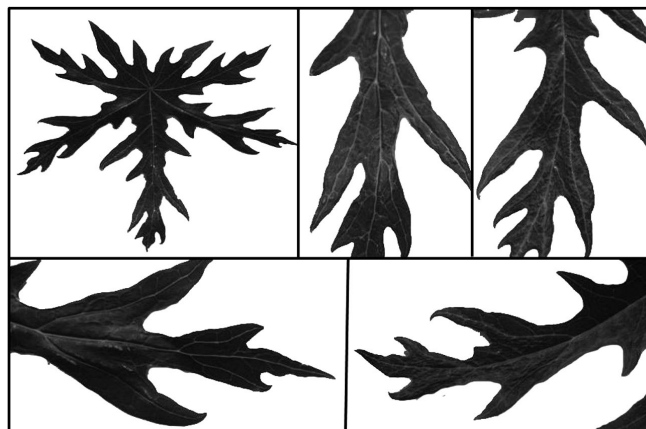


Figura 6. Hojas de papayo que muestran las deformaciones de la lámina foliar cuando *P. latus* se alimenta de éstas durante su desarrollo.

plo, la decoloración de la lámina foliar producida por la infestación de *P. latus* siempre comenzó en la vena central entre la unión del peciolo y el área foliar o limbo, a diferencia de la decoloración producida por PRSV-p, la cual se presentaba en cualquier parte de la lámina foliar, con mayor frecuencia en la parte terminal de los folíolos. En nuestros experimentos también observamos que las plantas infectadas con PRSV-p no se volvían a recuperar, las hojas nuevas aparecían cada vez más pequeñas y deformadas. En cambio en las plantas infestadas con *P. latus*, las hojas nuevas podían recuperarse si la población del ácaro desaparecía. Otro diferencia de los daños producidos por PRSV-p es la producción de manchas aceitosas en las hojas y en los tallos (Téliz *et al.* 1991; Tripathi *et al.* 2008), lo cual no fue producido por la infestación de *P. latus*.

Éste es el primer reporte del efecto combinado de *P. latus* y PRSV-p en plantas de papayo. Así mismo, se recomienda la inclusión de la detección molecular en tiempo real para poder identificar la presencia del virus de una manera más segura, y cuantificar su concentración para poder definir concentraciones bajo las cuales su infección producirá efectos visibles y cuantificables, así como considerar diferentes tiempos de incubación. En conclusión, tanto *P. latus* como PRSV-p pueden ocasionar reducción de la lámina foliar de plantas de papayo. Este efecto se incrementa cuando ambos organismos son inoculados de manera simultánea.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el financiamiento del colegio de Postgraduados con el "Financiamiento a proyectos de investigación y desarrollo tecnológico 2008". Se agradece a la Dra. L. Silva del CINVESTAV Irapuato, México por proporcionarnos plantas infectadas con PRSV-p. Así mismo se le agradece a la Dra. M. De Coss por sus atinadas sugerencias para mantener la cría de *P. latus*.

Literatura citada

- ACUÑA, L. E.; AGOSTINI, J. P. 2004. Búsqueda del agente causal de los síntomas del mosaico del mamón *Carica papaya* L. Citrusmisiones 29:17-20.
- ACUÑA, L. E.; AGOSTINI, J. P.; HABERLE, T. H. 2005. Control químico del ácaro blanco *Polyphagotarsonemus latus* Banks. del mamón *Carica papaya* L. Citrusmisiones 30:10-20.
- AUBERT, B.; LOSOIS, P.; MARCHAL, J.; RABAUD, J.; BOIS-VILLIERS, P. 1981. Mise en evidence des dégats causes par *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) sur papayer à l'île de la Réunion. Fruits 36 (1): 9-24.
- COLLIER, K. F. S.; DE LIMA, J. O. G.; ALBUQUERQUE, G. S. 2004. Predacious mites in papaya (*Carica papaya* L.) orchards: in search of a biological control agent of phytophagous mite pests. Neotropical Entomology 33(6):799-803.
- CROSS, J. V.; BASSETT, P. 1982. Damage to tomato and aubergine by broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks). Plant Pathology 31: 391-393.
- DE COSS, F. M. E. 2006. Bioecología y Herbivoría del Ácaro *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) en *Carica papaya* L. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Chiapas. 18 p.
- DE COSS-ROMERO, M.; PEÑA, J. E. 1998. Relationship of broad mite (Acari: Tarsonemidae) to host phenology and injury levels in *Capsicum annuum*. Florida Entomologist 81:515-526.
- FAO, 2007. Crop Protection Compendium Disponible en: <http://www.cabi.org/compendia/cpc/> (Fecha de revisión: 12 noviembre 2010).
- GERSON, U. 1992. Biology and control of the broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). Experimental and Applied Acarology 13:163-178.
- GONSALVES, D. 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. Annual Review of Phytopathology 36:415-37.
- GONSALVES, D.; SUZUKI, J. Y.; TRIPATHI, S.; FERREIRA, S. 2008. Papaya ringspot virus (Potyviridae). p. 1-8. En: B. Mahy; M. Van Regenmortel (eds.). Encyclopedia of Virology. Elsevier. Oxford. UK.
- JENSEN, D. D. 1949. Papaya virus diseases with especial reference to papaya ringspot. Phytopathology 39: 191-211.
- JEPPSON, L. R.; KEIFER, H. H.; BAKER, E. W. 1975. Mites injurious to economic plants. University of California Press. Berkeley. USA. 614 p.
- KIRANMAI, G.; HEMA, M.; SREENIV, P. 1998. Identification of a virus causing leaf distortion disease of papaya in Andhra Pradesh as cucumber mosaic cucumovirus. Indian Phytopathology 51 (2): 130-135.
- LINDQUIST, E. E. 1986. The world genera of Tarsonemidae (Acari: Heterostigmata): a morphological, phylogenetic, and systematic revision, with a reclassification of family-group taxa in the Heterostigmata. Memoirs of the Entomological Society of Canada 136: 1-517.
- O'NEAL, E. M.; LANDIS, A. D.; ISAACS, R. 2002. An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. Journal of Economic Entomology 95(6): 1190-1194.
- PAYNE, R. W.; MURRAY, D. A.; HARDING, S. A.; BAIRD, D. B.; SOUTAR, D. M. 2005. GenStat for Windows (8th Edition) Introduction. VSN International, Hemel Hempstead. UK.
- PEÑA, J. E.; BULLOCK, R. C. 1994. Effects of feeding of broad mite (Acari: Tarsonemidae) on vegetative plant growth. Florida Entomologist 77 (1): 180-184.
- RIDINGS, W. H.; ZETTLER, F. W.; CONOVER, R. A. 1978. Distortion ringspot of papaya. Fla. Depto. Agric. Cons. Serv. Div. Plant Ind. Gainesville, Plant Pathology Circular No. 184.
- RUIZ-CASTRO, S.; SILVA-ROSALES, L. 1997. Use of RT-PCR for papaya ringspotvirus detection in papaya (*Carica papaya*) plants from Veracruz, Tabasco y Chiapas. Revista Mexicana de Fitopatología 15(2): 86-90.
- SÁNCHEZ, D. L. C.; MARTÍNEZ, L. G. 1976. Algunas observaciones sobre el virus de la mancha anular de la papaya en Colombia. Noticias Fitopatológicas 5(2): 62-73.
- STEINER, A. A. 1968. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant Soil 15:134-154.
- TÉLIZ, O. D.; MORA, A. A.; NIETO, A. D.; GONSALVES, D.; GARCÍA E.; MATHEIS, L.; AVILA, C. 1991. La mancha anular del papayo en México. Revista Mexicana de Fitopatología 9: 64-68.
- TRIPATHI, S.; SUZUKI, J. Y.; FERREIRA, S. A.; GONCALVES, D. 2008. Papaya ringspot virus-P: characteristic, pathogenicity, sequence variability and control. Molecular Plant Pathology 9 (3): 269-280.
- VEGAS, A. G.; CERMELI, M.; TRUJILLO, G. 1985. Áfidos relacionados con el virus de la mancha anillada de la lechosa en Venezuela. Presencia, transmisión y eficiencia. Agronomía Tropical 35 (1-3): 21:31.

Recibido: 25-oct-2010 • Aceptado: 14-may-2011

Scientific note

Susceptibility of the predator *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae) to mycoinsecticides

Susceptibilidad del depredador *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae) a micoinsecticidas

FLÁVIA QUEIROZ DE OLIVEIRA¹, JACINTO DE LUNA BATISTA¹, JOSÉ BRUNO MALAQUIAS³,
CARLOS HENRIQUE DE BRITO⁴, and EMMERSON PEREIRA DOS SANTOS⁵

Abstract: To evaluate the influence of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok on the survival of the predator *Euborellia annulipes* Lucas (Dermaptera: Anisolabididae) were used product concentrations 5.00×10^9 , 7.50×10^9 , 10.00×10^9 , 12.50×10^9 conidia/L from isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* which were obtained, respectively, through products Boveril® and Metaril® and control (0.0 conidia/L). High rates of hatching nymphs of *E. annulipes* have been recorded in clutches that received applications of *M. anisopliae*. Moreover, *B. bassiana* has affected negatively the hatching rate of nymphs of *E. annulipes*. A slightly harmful effect has been observed in all concentrations of conidia *B. bassiana* in clutches of *E. annulipes*. The survival was 100% in all tested concentrations of *M. anisopliae* in females of *E. annulipes*. The females which received topical application of *B. bassiana* have shown a survival rate ranging from 80.30 (12.50×10^9 conidia) to 100% (5.00×10^9 conidia). In males of *E. annulipes*, the survival rate in insects treated with *B. bassiana* ranged from 95.00 (12.50×10^9 conidia) to 100% (5.00×10^9 conidia), while with *M. anisopliae* applications this rate was 96.02 (12.50×10^9 conidia) to 100% (5.00×10^9 conidia). The entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* did not affect the mortality of nymphs and adults of *E. annulipes*. However, careful measures should be adopted in applications of *B. bassiana* directly into clutches of *E. annulipes*.

Key words: Pathogenicity. Entomopathogenic fungi. Selectivity. Natural enemy.

Resumen: Se evaluó la influencia de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok en la supervivencia del depredador *Euborellia annulipes* Lucas (Dermaptera: Anisolabididae). Las concentraciones de los productos evaluados fueron $5,00 \times 10^9$, $7,50 \times 10^9$, $10,00 \times 10^9$, $12,50 \times 10^9$ conidios/L de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respectivamente, con los productos Metaril® y Boveril® y un control (0,0 conidios / L). Se registraron altas tasas de eclosión de ninfas de *E. annulipes* en especímenes que recibieron tratamientos con *M. anisopliae*. Se observó un efecto levemente perjudicial en todas las concentraciones de conidios de *B. bassiana* en posturas de *E. annulipes*, pues *B. bassiana* afectó negativamente la tasa de eclosión de ninfas de *E. annulipes*. La supervivencia fue del 100% en hembras de *E. annulipes* que recibieron todas las concentraciones probadas de *M. anisopliae*. Las hembras que recibieron aplicaciones tópicas de *B. bassiana* presentaron sobrevivencia entre 80,3 ($12,50 \times 10^9$ conidios) y 100% ($5,00 \times 10^9$ conidios). Los machos de *E. annulipes* presentaron una tasa de supervivencia con *B. bassiana* entre 95 ($12,50 \times 10^9$ conidios) y 100% ($5,00 \times 10^9$ conidios) y de 96,0 ($12,50 \times 10^9$ conidios) a 100% ($5,00 \times 10^9$ conidios) al recibir aplicaciones de *M. anisopliae*. Los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* no afectaron la mortalidad de ninfas y adultos de *E. annulipes*. Sin embargo, se deben adoptar medidas precisas en aplicaciones de *B. bassiana* directamente en posturas de *E. annulipes*.

Palabras clave: Patogenicidad de hongos. Hongos entomopatógenos. Seletividad. Enemigo natural.

Introduction

Earwigs or Dermaptera constitute several species with high predation capacity due to their aggressive behavior. Among these species, *Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae) is an important biological control agent of pests in agriculture. This insect species occurs throughout the neotropical zoogeographical region and has been an potential predator of several insect pests, particularly of eggs and immature stages of insects of the Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera and Diptera (Lemos *et al.* 1998, 1999). In northeast Brazil it is common occurrence of this insect preying on immature stages of pests that occur in soil or in plant structures lying on the ground as case of the larvae and pupae of boll weevil at field of cotton.

Entomopathogens are prevalent in natural systems and should receive greater attention in life-history studies (Hesketh *et al.* 2010; Roy *et al.* 2009). Mycoinsecticides compose only a small component of the biopesticide market, but their use is gaining acceptance as an alternative to the use of traditional contact insecticides for pest control (Ludwig and Oetting 2001). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok are among the most studied species of entomopathogenic and are used as bio-control agents of agricultural pests (Alves 1992; Alves *et al.* 1998). In biological control of pests an important pathogen is that one who affects only the target insect and not their natural enemies (Flexner *et al.* 1986; Generoso 2002).

The severity of the effects of microbial insecticides depends on the concentration of spores applied and the stage of

¹ M.Sc. Student in Environmental Science and Technology, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Brazil. e-mail: flavinha2010@ibest.com.br corresponding author; ² Ph.D., Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Campus II - Areia - PB. e-mail: jacinto@cca.ufpb.br; ³ M.Sc. Student in Entomology, Universidade de São Paulo (USP), Brazil. e-mail: jbmalaquias@ig.com.br; ⁴ Researcher/Professor, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II - Areia - PB. e-mail: chbrito1@hotmail.com; ⁵ B.Sc. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II - Areia - PB. e-mail: emersonbiozoo@hotmail.com.

the insect (Ginsberg *et al.* 2002). The use of low concentrations of alternative insecticides may increase the selectivity and help reduce costs of production (Oliveira 2008). In recent studies conducted by Oliveira *et al.* (2010), it was observed that low concentrations of mycoinsecticides isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* promoted high efficiency control of larvae and pupae of fruit flies. However the direct effects of entomopathogenic fungi in natural enemies have not been well studied and probably have been overestimated. It is also necessary to develop techniques to express accuracy in doses of microbial insecticides to achieve maximum physiological compatibility. Due to the increased use of biological control in integrated pest management and considering that information regarding the selectivity of entomopathogenic fungi in biological control agents is incipient, the aim of this research is to evaluate the influence of *M. anisopliae* and *B. bassiana* in the survival of the predator *E. annulipes*.

Material and Methods

Insects. Specimens of the *E. annulipes* used in this study were obtained from laboratory rearing. The stock colony was maintained in an acclimatized room at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, of $70 \pm 10\%$ r.h. and 12L:12D photoperiod. The bioassays followed the methodology described by Lemos *et al.* (1999). This study used eggs, nymphs of 1st instar, ($\leq 24\text{h}$ old), 2nd instar, and adult insects of both sexes of *E. annulipes*. Individuals have been placed in Petri dishes and kept at a constant temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, with $70 \pm 10\%$ R.H., and a photoperiod of 12:12h (L:D). The insects or clutches has been kept in groups of 5 units per dish. Recently emerged adults ($\leq 24\text{h}$ old) have been sexed by the characteristics of external morphology, the number of abdominal segments and the curvature of the forceps (Tomkins and Simmons 1998).

Bioassay. The following concentrations of conidia tested were 5.00×10^9 , 7.50×10^9 , 10.00×10^9 , 12.50×10^9 conidia/L, and control (0.0 conidia/L). These concentrations are recommended to the pests control, i.e. in applications at soil to control of larvae and pupae of fruit flies (Oliveira 2008). The isolates have been obtained from the products Boveril® and Metarril®, produced by the Company Itaforte Bio products.

Pathogenicity and virulence of isolates. The viability of isolated evidence of pathogenicity and virulence has been evaluated according to the method described by França *et al.* (2006). In the viability test has been used two Petri dishes containing PDA (potato dextrose agar) culture media, incubated in climatized chamber ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12h of photophase and relative humidity of $70 \pm 10\%$) for 24 hours, later to perform readings in a light microscope by determining the percentage of germinated conidia and not germinated. For proving the pathogenicity and virulence of the isolates tested in this study, we spraying a suspension of 5.00×10^9 conidia/L on the 100 larvae 1st-instar of *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) for each species of fungus, because it is a highly susceptible to entomopathogenic stage (Oliveira 2008).

Effects on survival and development stages of *E. annulipes*. Fungal suspensions of each fungal product concentration have been applied topically with deposition of $5\mu\text{l}$ from each suspension. The applications have been performed using a

manual spray (1L) just once time on the entire structure of the dorsal body of the specimens, and in the case of the clutches around the whole egg chorion. After 10 days of period application was observed the survival rate. This period was established because the action time of two microorganisms have been also observed and the assessments made after 5 days of application to the insects as young and adult (Bustillo *et al.* 1999) as well as after 10 days, which was the maximum period of hatching in this conditions (Lemos 1998). The mortality was confirmed by sporulation in humide chamber. Then, mortality has been calculated and corrigid to control (un-treated) group.

Data analysis. The experimental design was completely randomized with five replications per concentration/treatment, with each replication consisting of five insects or clutches (100 eggs per clutch). The survival of insects in treatments was calculated using the formula: $S (\%) = 100 - Ma (\%)$. The mortality data ($Ma (\%)$) of the treatments and control were submitted to Abbott's formula (Abbott 1925). Data were also subjected to polynomial logistic regression ($P=0.05$) (PROC GENMOD, SAS Institute 2006). The determination of the harmfulness of the products was based on the guidelines for the insecticides under laboratory conditions by the IOBC/WPRS (Amano and Haseeb 2001): survival $>70\%$, non-harmful, survival $>30\%$ and $<70\%$, slightly harmful; survival $>1\%$ and $<30\%$, moderately harmful and survival $<1\%$ severely harmful.

Results and Discussion

In our test with *C. capitata*, it has been recorded a mortality rate approximately 98% and 97% caused by fungi *M. anisopliae* and *B. bassiana*, respectively. Therefore, the survival of *E. annulipes* was not because the lack of fungi virulence.

High rates of hatching nymphs of *E. annulipes* have been recorded in clutches that received applications of *M. anisopliae*. The hatching percentage nymphs confirmed was 96.23, 92.47, 91.58 and 91.50% in the concentrations of 5.00×10^9 , 7.50×10^9 , 10.00×10^9 and 12.50×10^9 conidia/L of *M. anisopliae*, respectively. Moreover, *B. bassiana* affected the hatching rate of nymphs of *E. annulipes*, the survival ranged from 31.13 (12.50×10^9) to 60.06% (5.00×10^9) (Fig. 1). Results

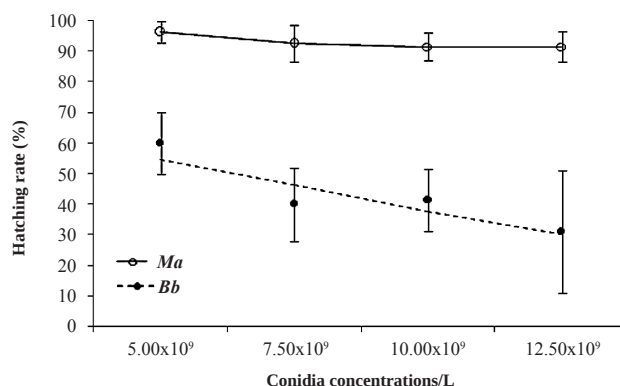


Figure 1. Hatching percentage *Euborellia annulipes* nymphs with conidia concentrations/L of *Metarhizium anisopliae* (—○— Ma) ($y = 0.92x^2 - 6.108x + 101.32$, $R^2 = 0.98$) and *Beauveria bassiana* (---●--- Bb) ($y = 0.4408x^2 - 11.188x + 103.55$, $R^2 = 0.91$). Observed $\pm$ S.E. (dots) and predict results (line models).

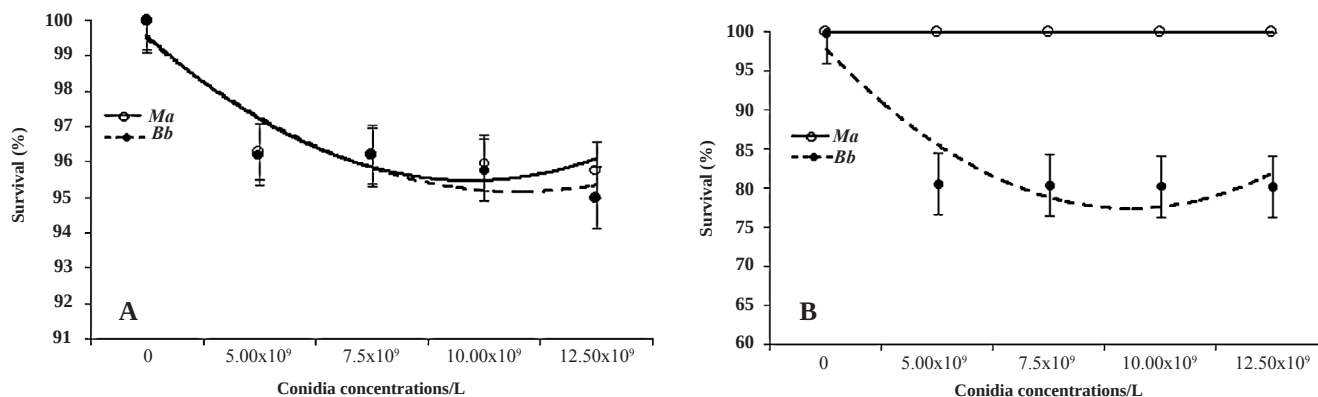


Figure 2. Relationship between the application of different concentrations of conidia of fungi *Metarhizium anisopliae* (—○—Ma) ($y = 0.025x^2 - 0.045x + 96.375$, $R^2 = 0.96$) and *Beauveria bassiana* (—●—Bb) ($y = 0.004x^2 - 0.002x + 96.395$, $R^2 = 0.976$) on the survival of males of *E. annulipes* **A**, and the different concentrations of conidia of fungi *M. anisopliae* (—○—Ma) ($y = 100$) and *B. bassiana* (—●—Bb) ($y = 0.0016x^2 - 0.0744x + 80.916$, $R^2 = 0.958$) on the survival of females of *E. annulipes* **B**. Observed $\pm$ S.E. (dots) and predict results (line models).

obtained by Duso *et al.* (2008) with the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot, 1957) (Acari: Phytoseiidae) have shown high hatching rate of this predator species after application of *B. bassiana*, although this researchers have reported mortality of up to 43% in females.

In the other hand, *M. anisopliae* and *B. bassiana* did not affect the survival of nymphs. There was overall survival (100%) of nymphs of 1st and 2nd instars in all tested concentrations of both the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* (data not shown in figures). Results obtained by Kohno *et al.* (2007) are in agreement with those obtained in this study. These authors verified no effect of *B. bassiana* to nymphs of 2nd instar *Labidura riparia* (Pallas, 1773) (Dermaptera, Labiduridae).

The fungi *M. anisopliae* and *B. bassiana* did not affect the survival of adults of *E. annulipes*. In all tested concentrations of *M. anisopliae* in female *E. annulipes*, survival was 100%. The females which received topical application of *B. bassiana* have been shown a survival rate ranging from 80.3% (12.10×10^9 conidia) up to 100% (5.00×10^9 conidia); whereas, for males of *E. annulipes*, the survival rate in insects treated with *B. bassiana* ranged from 95% (12.10×10^9 conidia) to 100% (5.00×10^9 conidia) and from 96.02% (12.10×10^9 conidia) to 100% (5.00×10^9 conidia) after receiving applications of *M. anisopliae* (Figs. 2a and 2b).

Efficient selectivity is based on physiological differences between pests and their natural enemies, being that pest killed at a concentration of product that does not affect individual benefits. A slightly harmful effect (survival > 30% and < 70%) has been observed in all the concentrations of conidia *B. bassiana* in clutches of *E. annulipes* (Fig. 1). The microbial insecticides tested were not harmful (survival > 70%) for adults (Figs. 2A and 2B) and nymphs of first and second instar. Therefore, the two mycoinsecticides can be used to control pests without significantly affecting nymphs or adults of *E. annulipes*. The greater susceptibility of eggs of *E. annulipes* in relation to nymphs or adults should be the interaction that occurs due to pathophysiological effects on the cuticle of nymphs or adults of the predator, which hindered the process of infection and lessens the potential for invasion of microorganisms for these stages of *E. annulipes*. Moreover, the ability of this insect to survive in areas of land, soil inhabitant galleries can be an important factor to provide

a greater hardening of their cuticle. Other factors such as intestinal pH, biochemical or immunological defense-physiological may be related to the tolerance of nymphs or adults of *E. annulipes* concentrations of mycoinsecticides used in this study.

According Kiselek (1975), *B. bassiana* was harmless to adults *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant, 1853 (Coccinellidae: Coleoptera) while the effect was lethal to larvae (50%) that consumed insects infected by this fungus. In this study, nymphs and adults of *E. annulipes* were not affected by concentrations tested in this study adopted of *B. bassiana* and *M. anisopliae*. In other words, the results of this study have revealed that *B. bassiana* caused a reduction in the rates of hatched nymphs, unlike *M. anisopliae*. Moreover, insecticide applications that are not directly to the soil may enable the adoption of that microorganism in programs of integrated pest management in agroecosystems in which *E. annulipes* is present, because this kind of predator tends to deposit their eggs in soil galleries built by adults (Bharadwaj 1966).

Other studies have also demonstrated the selectivity of entomopathogenic organisms to natural enemies, like *B. bassiana* with *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthoridae) (Cavalcanti 2006); *M. anisopliae* and *B. bassiana* with parasitoid *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912) (Hymenoptera: Eulophidae) (Santos Jr. *et al.* 2006). The concentrations adopted in this study of entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* did not affect the mortality of nymphs and adults of *E. annulipes*. Neither we found ovidicidal activity of *M. anisopliae* to *E. annulipes*. However, careful measures should be adopted in applications from 5.0×10^9 conidia/L of *B. bassiana* directly into clutches of *E. annulipes*, because from this concentration we found a significant reduction in hatching rate this predator. We also suggest the implementation of other studies, as the effects these bio-insecticides on the fitness of *E. annulipes*.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian agency Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to concession scholarship to first author. The authors would like to thank Robério de Oliveira for his help in the laboratory.

We especially thank Tricia Hornsby (Ohio State University) for her valuable help with an important review of English in this manuscript.

Literature Cited

- ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- ALVES, S. B. 1992. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 27: 77-86.
- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; ALMEIDA, A.; MOINO JR., L. F.; ALVES, A. 1998. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. (ed.). *Controle microbiano de insetos*, 637-711. Piracicaba, Fealq.
- AMANO, H.; HASEEB, M. 2001. Recently-proposed methods and concepts of testing the effects of pesticides on the beneficial mite and insect species: study limitations and implications in IPM. *Applied Entomology and Zoology* 36: 1-11.
- BHARADWAJ, R. K. 1966. Observation on the bionomics of *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Labiduridae). *Annals of the Entomological Society of America* 59: 441-450.
- BUSTILLO, A. E.; BERNAL, M. G.; BENAVIDES, P.; HAVES, B. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. *Florida Entomologist* 82: 491-498.
- CAVALCANTI, R. S. 2006. Associação *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. - nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) - *Orius insidiosus* (Say) no controle de trips (Thysanoptera) em cultivo protegido. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, 132p.
- DUSO, C. V.; MALAGNINI, A.; POZZEBON, M.; CASTAGNOLI, M.; LIGUORIB, S. S. 2008. Comparative toxicity of botanical and reduced-risk insecticides to mediterranean populations of *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari Tetranychidae, Phytoseiidae). *Biological Control* 47: 16-21.
- FLEXNER, J. L.; LIGHTHART, B.; CROFT, B. A. 1986. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 16: 203-254.
- FRANÇA, I. W. B.; MARQUES, E. J.; TORRES, J. B.; OLIVEIRA, J. V. 2006. Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology* 35: 349-356.
- GENEROSO, A. R. 2002. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* com *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) e metodologia para avaliação da seletividade. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 63p.
- GINSBERG, H. S.; LEBRUN, R. A.; HEYER, K.; ZHIOUA, E. 2002. Potential nontarget effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae). *Environmental Entomology* 31: 1191-1196.
- HESKETH, H.; ROY, H. E.; EILENBERG, J.; PELL, J. K. HAILS, R. S. 2010. Challenges in modeling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *Biocontrol* 55: 55-73.
- KISELEK, E. V. 1975. The effect of biopreparations on insect enemies. *Zash Rast*, 23p.
- KOHNO, K.; TAKEDA, M.; HAMAMURA, T. 2007. Insecticide susceptibility of a generalist predator *Labidura riparia* (Dermaptera: Labiduridae) *Applied Entomology and Zoology* 42: 501-505.
- LEMO, W. P.; MEDEIROS, R. S.; RAMALHO, F. S. 1998. Influência da temperatura no desenvolvimento de *Euborellia annulipes* (Lucas) (Dermaptera: Anisolabidae) predador de bico-do-do-algodoeiro. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 27: 67-76.
- LEMO, W. P.; MEDEIROS, R. S.; RAMALHO, F. S. 1999. Exigências térmicas de *Euborellia annulipes* (Lucas) (Dermaptera, Anisolabidae) e sua relação com a presa: bico-do-do-algodoeiro. *Revista Brasileira de Entomologia* 43: 61-68.
- LUDWIG, S. W.; OETTING, R. D. 2001. Susceptibility of natural enemies to infection by *Beauveria bassiana* and impact of insecticides on *Ipheseius degenerans* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Agricultural and Urban Entomology* 18 (3): 169-178.
- OLIVEIRA, F. Q. 2008. Eficiência dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de moscas das - frutas *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). BSc em Agronomia. Universidade Federal da Paraíba. 37p.
- OLIVEIRA, F. Q.; BATISTA, L. J.; MALAQUIAS, J. B.; ALMEIDA, D. M.; OLIVEIRA, R. 2010a. Determination of the median lethal concentration (LC50) of mycoinsecticides for the control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Revista Colombiana de Entomologia* 36 (2): 213-216.
- ROY, H. E.; HAILS, R. S.; HESKETH, H.; ROY, D. B.; PELL, J. K. 2009. Beyond biological control: non-pest insects and their pathogens in a changing world. *Insect Conservation and Biodiversity* 2: 65-72.
- SANTOS JR., R.; MARQUES, H. J. G.; BARROS, E. J. R.; GONDIM JR., M. G. C.; ZAGO, H. B.; SILVA, C. M. 2006. Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre adultos de *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae). *Acta Scientiarum. Agronomy* 28: 241-245.
- SAS. 2006. SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- TOMKINS, J. L.; SIMMONS, L. W. 1998. Female choice and manipulations of forceps size and symmetry in the earwig *Forficula auricularia* L. *Animal Behavior* 56: 347-356.

Received: 23-dec-2010 • Accepted: 2-jun-2011

Scientific note

Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species as an agents of biological control of *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae)Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) como agentes de control biológico de *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae)HARLEY NONATO DE OLIVEIRA¹, JOSÉ COLA ZANUNCIO², FABRÍCIO FAGUNDES PEREIRA³, and DIRCEU PRATISSOLI⁴

Abstract: Lepidoptera defoliators are important pests of *Eucalyptus*. This research aimed to evaluate the potential of *Trichogramma acacioi* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to control the eucalyptus defoliator *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae). Biological parameters and parasitism rate of *Trichogramma* on eggs of *O. vesulia* were evaluated under laboratory conditions. *Trichogramma pretiosum* did not parasitized eggs of *O. vesulia* but more than 93% of *T. acacioi* females parasitized eggs of this defoliator, showing its potential for the biological control of this Lepidoptera.

Key words: Eggs parasitoid. Biological control. *Eucalyptus*. Lepidoptera.

Resumen: Los lepidópteros defoliadores son importantes plagas de *Eucalyptus*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de *Trichogramma acacioi* y *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para controlar el defoliador del eucalipto *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae). Los parámetros biológicos y la tasa de parasitismo de *Trichogramma* en huevos de *O. vesulia* fueron evaluados en condiciones de laboratorio. *Trichogramma pretiosum* no parasitó esta especie, pero más de 93% de las hembras de *T. acacioi* presentaron parasitismo en los huevos de este defoliador, mostrando su potencial para el control biológico de este lepidóptero.

Palabras clave: Parasitoide de huevos. Control biológico. *Eucalyptus*. Lepidoptera.

Introduction

Lepidoptera defoliators are found in *Eucalyptus* plantations and their importance is increasing due to frequent outbreaks and damage (Oliveira *et al.* 2008; Pereira *et al.* 2008). This group includes species of the genus *Oxydia* (Lepidoptera: Geometridae) which have been collected in population outbreaks in the Brazilian States of Minas Gerais, São Paulo (Zanuncio *et al.* 1994), Maranhão (Zanuncio *et al.* 1992), Goiás (Alves *et al.* 1994) and Bahia (Santos *et al.* 2002). Outbreaks of these species have been controlled with different methods, but especially with chemical insecticides which can have negative impact on the environment (Zanuncio *et al.* 1994; Zanuncio *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2003). Therefore, there is a need to develop alternative control methods for this kind of pest (Zanuncio *et al.* 1991). The release of *Trichogramma* species, which have been widely used in many crops, represents one of the techniques that have shown good results to control pest, especially in species of Lepidoptera (Bueno *et al.* 2009).

Some species such as *Trichogramma demoraei* Nagaraja, 1983, *Trichogramma soaresi* Nagaraja, 1983, *Trichogramma manicobai* Brun, Moraes & Soares, 1984, *Trichogramma caiaposi* Brun, Moraes & Soares 1984, *Trichogramma maxacalii* Voegelé and Pointel, 1980, *Trichogramma acacioi* Brun, Moraes & Soares, 1984 and *Trichogramma pratissolii* Querino and Zucchi, 2003 are recorded occurring in eucalyptus plantations (Oliveira *et al.* 2003; Soares *et al.* 2007; Vianna *et al.* 2007). But it is necessary to evaluate the interaction

between these parasitoids and the host target because species of *Trichogramma* have a great variation in behavior and preference (Bueno *et al.* 2009). For this reason, the objective of this research was to evaluate the ability of *T. acacioi* and *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to parasitize eggs of *Oxydia vesulia* (Cramer, 1779) (Lepidoptera: Geometridae).

The biological characteristics of *T. acacioi* and *T. pretiosum* were studied using eggs of *O. vesulia* obtained from adults originating from caterpillars collected in a eucalyptus plantation and reared with *Eucalyptus cloeziana* F. Muell.. The experiment was carried out at 25±1°C, 75±10% relative humidity and 14h photoperiod. Twenty-five fresh eggs of *O. vesulia* were glued onto a piece of blue cardboard (3.5 x 0.5cm) with Arabic gum (30% diluted) and were offered to the parasitoids on the same day. Each cardboard was placed in a glass tube with one parasitoid female with maximum age of 24h and honey droplets were offered as food. The cardboard was removed from the tubes after 24 hours and kept in a plastic bag under the same conditions as described above. Fifteen replicates were done for each parasitoid species. The percentage of females that parasitized, the parasitism rate (number of eggs parasitized/number of eggs in the cardboard), embryonic period (between egg to adult emergence), emergence rate (eggs with a hole made were counted to evaluate), number of individuals/egg, sex ratio (number of females/number of females + males) and longevity of female offspring were evaluated.

¹ Ph.D. Researcher Embrapa Agropecuária Oeste, Caixa Postal 661, CEP 79804-970 Dourados, MS, Brazil; harley@cpao.embrapa.br Corresponding Author. ² Ph.D. Professor Universidade Federal de Viçosa, Brazil zanuncio@ufv.br. ³ Ph.D. Professor Universidade Federal da Grande Dourados, Brazil fabriciofagundes@ufgd.edu.br. ⁴ Ph.D. Professor Universidade Federal do Espírito Santo, Brazil pratissoli@cca.ufes.br

Females of *T. pretiosum* did not parasitize eggs of *O. vesulia* although *T. acacioi* parasitized 93.3% of those (Table 1). Some factors that may explain the host rejection by the parasitoid are size, format and texture of the host eggs (Schmidt 1994; Oliveira *et al.* 2000; Moreira *et al.* 2009) and these factors can also affect the behavior of *Trichogramma* and their capacity to parasitize a specific host (Schmidt and Smith 1987). In the field, host eggs of these two parasitoid species may have a different size. In our study, the strain of *T. pretiosum* was collected in areas which tomato was grown, parasitizing eggs of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) while *T. acacioi* were collected in arboreal environments, with avocado orchards occurring in *Nipteria panacea* Thierry-Mieg, 1892 (Lepidoptera: Geometridae) eggs. Probably *O. vesulia* eggs have sizes more similar to those accepted by *T. acacioi* than by *T. pretiosum*.

The parasitism rate of *T. acacioi* on eggs of *O. vesulia* was around 15%, lower when compared to the performance of this parasitoid on eggs of *Anagasta kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) and *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1789) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Pratissoli *et al.* 2009). However, it is important to emphasize that the size of the eggs are different, being the *O. vesulia* eggs bigger than those from the factitious host. Bueno *et al.* (2009) reported that the size of the egg can influence the number of eggs laid per female of *Trichogramma*. The results found in this work showed a larger number of individuals produced per egg of *O. vesulia* than those from alternative host. On the other hand, in the same host, the parasitism by different species of *Trichogramma* can vary, because the number of eggs of *O. vesulia* parasitized by *T. acacioi* was higher than that by *T. maxacalii* (Oliveira *et al.* 2003).

The parasitism it is an important factor in the selection of the species or strain of parasitoids, and in the field this biologic characteristic can be especially important to determine the best species (Bueno *et al.* 2009). This higher parasitism indicates that *T. acacioi* should present better potential in controlling *O. vesulia*. The viability, sex ratio, number of individuals per egg, female longevity and duration of the embryonic period found to *T. acacioi* (Table 1) was similar to those of *T. maxacalii* on eggs of this defoliator (Oliveira *et al.* 2003).

Trichogramma acacioi may be used with *T. maxacalii* to control eggs of the Lepidoptera defoliator *O. vesulia*. Additionally, further studies should be developed to define the potential of these parasitoids as biological control agents of Lepidoptera defoliators of *Eucalyptus* species.

Table 1. Means and standard error of the percentage of females that parasitizing females, parasitism rate, duration of embryonic period, emergence rate, number of individuals per egg, sex ratio and longevity of offspring females of *Trichogramma acacioi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on eggs of *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae).

Characteristics	<i>Trichogramma acacioi</i>
Parasitizing females (%)	93.3 ± 1.72
Parasitism rate (%)	14.9 ± 0.60
Duration of embryonic period	10.08 ± 2.60
Emergence rate (%)	89.9 ± 2.10
Number of individuals/egg	3.01 ± 0.07
Sex ratio	0.46 ± 0.03
Longevity of offspring females (days)	1.51 ± 0.02

Acknowledgments

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Cited literature

- ALVES, J.B.; ZANUNCIO, J.C.; FORLIN, A.; PIFFER, A.A. 1994. Análise faunística e flutuação populacional de lepidópteros associados ao eucalipto em Niquelândia, Goiás. *Revista Árvore* 18(2): 159-168.
- BUENO, R.C.O.F.; PARRA, J.R.P.; BUENO, A.F.; HADDAD, M.L. 2009. Desempenho de trichogramatídeos como potenciais agentes de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology* 38(3): 389-394.
- MOREIRA, M.D.; SANTOS, M.C.F.; BESERRA, E.B.; TORRES, J.B.; ALMEIDA, R.P. 2009. Parasitismo e superparasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 38(2): 237-242.
- OLIVEIRA, H.N.; ZANUNCIO, J.C.; PRATISSOLI, D.; CRUZ, I. 2000. Parasitism rate and viability of *Trichogramma maxacalii* (Hym.: Trichogrammatidae) parasitoid of the *Eucalyptus* defoliator *Euselasia apisaon* (Lep.: Riodinidae) on eggs of *Anagasta kuehniella* (Lep.: Pyralidae). *Forest Ecology and Management* 130: 1-6.
- OLIVEIRA, H.N.; PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. 2003. Influência da idade dos ovos de *Oxydia vesulia* no parasitismo de *Trichogramma maxacalii*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38(4): 551-554.
- OLIVEIRA, H.N.; ZANUNCIO, T.V.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. 2008. The eucalypt defoliator *Thyrine arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) protects its eggs from parasitism. *Biological Letters* 45: 23-28.
- PEREIRA, F.F.; MELLO, F.J.P.; CANEVARI, G.C.; MIELKE, O.H.H.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. 2008. Biological aspects of *Dirphia moderata* (Lepidoptera: Saturniidae) on *Eucalyptus cloeziana* and *Psidium guajava*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51(2): 369-372.
- PRATISSOLI, D.; BUENO, A.F.; BUENO, R.C.O.F.; ZANUNCIO, J.C.; POLANCZYK, R.A. 2009. *Trichogramma acacioi* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) parasitism capacity at different temperatures and factitious hosts. *Revista Brasileira de Entomologia* 53(1): 151-153.
- SANTOS, G.P.; ZANUNCIO, T.V.; ZANUNCIO, J.C. 2002. Influência de faixas de vegetação nativa em povoamentos de *Eucalyptus cloeziana* sobre população de *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae). *Revista Árvore* 26(4): 499-504.
- SCHMIDT, J.M. 1994. Host recognition and acceptance by *Trichogramma*. In: Wajnberg, E. and Hassan, S.A. (eds.). *Biological control with egg parasitoids*. CAB International, Wallingford. p. 165-200.
- SCHMIDT J.M.; SMITH, J.B. 1987. The effect of host spacing on the clutch size and parasitization rate of *Trichogramma minutum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 43(2): 125-131.
- SOARES, M.A.; LEITE, G.L.D.; ZANUNCIO, J.C.; ROCHA, S.L.; SÁ, V.G.M.; SERRÃO, J.E. 2007. Flight capacity, parasitism and emergence of six *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species from reforested areas with eucalyptus in Brazil. *Phytoparasitica* 35:314-318.
- VIANNA, U.R.; PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J.C.; ANDRADE, G.S.; QUERINO, R.B. 2007. First record of *Trichogramma pratissolli* in *Eucalyptus* spp. plantation in the State of Minas Gerais – Brazil. *Floresta* 37(1): 111-112.
- ZANUNCIO, J.C.; FAGUNDES, M.; ARAÚJO, M.S.; EVARISTO, F.C. 1992. Monitoramento de lepidópteros, associados a plantios de eucalipto da região de Açailândia (Maranhão), no período de agosto/90 a julho/91. *Acta Amazônica* 22(4): 615-622.
- ZANUNCIO, J.C.; NASCIMENTO, E.C.; GARCIA, J.F. 1994. Major lepidopterous defoliators of eucalypt, in the Southeast Brazil. *Forest Ecology and Management* 65(1): 53-63.
- ZANUNCIO, J.C.; GUEDES, R.N.C.; ZANUNCIO, T.V.; FABRES, A.S. 2001. Species richness and abundance of defoliating Lepidoptera associated with *Eucalyptus grandis* in Brazil and their response to plant age. *Austral Ecology* 26(6): 582-589.
- ZANUNCIO, T.V.; SARAIVA, R.S.; ZANUNCIO, J.C.; RODRIGUES, L.; FERREIRA, J. 1991. Levantamento e flutuação populacional de lepidópteros associados a eucaliptocultura: XI - Região de Três Marias, M.G., junho/89 a maio/90. *Revista Ceres* 38(218), 373-382.

Scientific note

Emergence patterns of *Orgyia ericae* (Lepidoptera: Lymantriidae) parasitoidsPatrones de emergencia de los parasitoides de *Orgyia ericae* (Lepidoptera: Lymantriidae)CUI YA-QIN¹, SHENG MAO-LING², LUO YOU-QING³, and ZONG SHI-XIANG⁴

Abstract: To provide guidance on the utilization and conservation of the forest defoliator *Orgyia ericae* parasitoids, we survey its parasitoid species. We identified the developmental stages associated with the different parasitoids, and the emergence pattern of adult parasitoids. Observations of hatching were conducted hourly from 7am to 12pm until all adults had emerged. Pupation time, emergence patterns, and the abundance of *Exorista larvarum* parasitoids were recorded in detail. The abundance and daily emergence patterns of *Bracon* (*Habrobracon*) sp., and *Tetrastichus* sp. were analyzed. *Bracon* (*Habrobracon*) sp. and *E. larvarum* both had only one emergence peak, whereas *Tetrastichus* sp. had two. The daily emergence of *Bracon* (*Habrobracon*) sp., *Tetrastichus* sp. and *E. larvarum* peaked at 3 to 5pm, 3 to 5pm and 7 to 8am, respectively. The *E. larvarum* pupation distribution was characterized by two peaks.

Key words: Parasitoids. *Bracon* (*Habrobracon*) sp. *Tetrastichus* sp. *Exorista larvarum*. Grey-spotted tussock moth.

Resumen: Para proveer guías acerca de la utilización y conservación de los parasitoides del defoliador forestal *Orgyia ericae* se inventariaron sus especies de parasitoides. Se identificaron los estados de desarrollo del lepidóptero con las distintas especies de parasitoides así como sus patrones de emergencia. Se adelantaron observaciones de emergencia desde las 7am hasta 12pm hasta que todos los adultos emergieron. Tiempo de pupación, patrones de emergencia y abundancia del parasitoide *Exorista larvarum* se registró en detalle. Se analizaron la abundancia y patrones de emergencia de *Bracon* (*Habrobracon*) sp. y *Tetrastichus* sp. *Bracon* (*Habrobracon*) sp. y *E. larvarum* exhibieron un solo pico de emergencia mientras que *Tetrastichus* sp. muestra dos picos. La emergencia diaria de *Bracon* (*Habrobracon*) sp., *Tetrastichus* sp. y *E. larvarum* fue mayor entre las 3 a 5pm, 3 a 5pm y 7 a 8am, respectivamente. La pupación de *E. larvarum* mostró dos picos.

Palabras clave: Parasitoides. *Bracon* (*Habrobracon*) sp. *Tetrastichus* sp. *Exorista larvarum*. Polilla de penacho de manchas grises.

Introduction

Orgyia ericae (Germar, 1824) is a defoliator moth of the Lymantriidae family (Lepidoptera) (Xu 1980; Wu *et al.* 1982). It is distributed mainly in Heilongjiang, Jilin, Liaoning, Shaanxi, Gansu, Qinghai, and Shandong provinces, in the autonomous regions of Inner Mongolia and Ningxia in China, and in the former Soviet Union and Europe (Zhao 1978; Xiao 1992; Dapkus 2004, 2010). *O. ericae* is an important pest of trees. Given the economic and ecological importance of the species it attacks, *O. ericae* has a major impact in the regions where it is found. In recent years, it has been frequently reported to attack *Hedysarum fruticosum* Pall. var. *mongolicum* (Turcz. ex B. Fedtsch., 1902) (Fabaceae), *Caragana*, *Hedysarum scoparium* (Fisch. et C. A. Mey., 1841) (Fabaceae), *Calligonum mongolicum* (Turcz., 1832) (Polygonaceae), *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) (S. H. Cheng, 1959) (Fabaceae) and other desert plants, occurring in a large area of desert shrubbery of regions such as Inner Mongolia, Ningxia and Qinghai. These species are important for desert shrubbery in northwest China, and play a particularly key role in landscape stability and desertification control. They are resistant to drought, sand burial, wind erosion, sand, and barren soil, and grow rapidly. These plants can be used as fodder

for livestock (except *A. mongolicus*), and as ingredients for Chinese medicine, also edible oils can be extracted from seeds of these plants (Liu *et al.* 1985; Liu *et al.* 1987). Studies of the biological characteristics and life history of *O. ericae* have shown that *O. ericae* has two generations per year (Xu 1980; Xiao 1992; Wang & Liu 2002; Wang *et al.* 2009). Individuals overwinter as eggs in cocoons, which hatch in the middle of May. The newly hatched larvae undergo six instars of four to five days each, usually feeding on leaves. The dispersion of larvae depends on wind. Pupation begins in mid June on the branches of plants, and adults emerge after approximately ten days, in early July. The wingspan is 21-28mm for males, while females are wingless and release sex pheromones that attract mates to cocoons, where eggs are laid. Each female adult can produce, on average, approximately 250 eggs. Males have obvious phototaxis. The second generation of eggs begins to hatch in the middle of July, with pupation beginning in mid to late August and adult emergence in early September. The eggs overwinter in cocoons after mating. Although the biological characteristics and parasitoids of *O. ericae* (Wang & Liu 2002; Yu *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008; Sun *et al.* 2008; Li *et al.* 2009), and the sex pheromone (Chen *et al.* 2010; Chen *et al.* 2011), nuclear polyhedrosis virus and polyhedrin gene sequence of *Orgyia ericae* (Zhang *et al.* 1991; Dai & Zu 1996; Zu

¹ Dr. Cui Ya-Qin, Beijing Forestry University, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China. sxtcyq@foxmail.com. ² Prof. Dr. Sheng Mao-Ling, General Station of Forest Pest Management, State Forestry Administration, Shenyang 110034, P.R. China. shengmaoling@163.com. ³ Prof. Dr. Luo You-Qing, Beijing Forestry University, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China. youqingluo@126.com. ⁴ Vice-Prof. Dr. Zong Shi-Xiang, Beijing Forestry University, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China. zongsx@126.com. Author for correspondence.

& Dai 1997; Yang *et al.* 2006), have been intensely studied, there are currently no reports describing the emergence patterns of adult *O. ericae* parasitoids. To provide guidance on the utilization and conservation for parasitoids of *O. ericae*, we investigated *O. ericae* parasitoid species and the emergence pattern of adult parasitoids.

Materials and Methods

A total of 982 cocoons of *O. ericae* were collected from *H. scoparium* in Hangjinqi, Erdos, Inner Mongolia, on July 4, 2008. All cocoons were cultured and observed in two loosely airtight containers placed in a rearing room at $24\pm1^{\circ}\text{C}$, $50\pm10\%$ relative humidity and a photoperiod of 14:10 (L:D).

Observations of *O. ericae* egg hatching as well as the identification of parasitoid species and measurements of their stage and abundance were conducted hourly from 7am to 12pm from July 7, 2008, until all adults had emerged. In order to represent a proportion of parasitism of all male and female cocoons, all cocoons collected were dissected on August 14, 2008. *O. ericae* cocoons were also classified with respect to sex, based on their morphological differences. Female cocoons present one mating hole, and differ in length and color: the female pupa is 15mm long and characterized by a yellow and brown color, whereas the male pupa is approximately 8mm long and it is dark brown.

To complete the next stage of their life cycle, the larvae of *Exorista larvarum* (Linnaeus, 1758) (Tachinidae) (S. M.-L.) must break out of the *O. ericae* cocoon and pupate. All the pupae of *E. larvarum* were collected in vitro, and the time of pupation and emergence, as well as the quantity of parasitoids, were recorded. We used LSD multiple comparisons to analyze and identify where differences in the peaks of emergence occurred.

Results

Parasitoid species. Out of the 982 cocoons of *O. ericae*, 485 male cocoons and 384 female cocoons were parasitized, representing a parasitism of 88.18% and 88.89% for male and female cocoons, respectively. Eight parasitoid species were identified, including the following Hymenoptera, numbers within brackets indicate their abundance: *Bracon (Habrobracon)* sp. (Braconidae) (174), *Itoplectis viduata* (Gravenhorst, 1829) (Ichneumonidae) (S. M.-L.) (11), *Pimpla disparis* (Viereck, 1911) (Ichneumonidae) (S. M.-L.) (3), *Eutanyacra picta* (Schränk, 1776) (Ichneumonidae) (S. M.-L.) (3), *Tetrastichus* sp. (Chalcidoidea) (S. M.-L.) (180), *Aprostocetus* sp. (Chalcidoidea) (S. M.-L.) (1), *Brachymeria lasus* (Walker, 1842) (Chalcidoidea) (S. M.-L.) (2), and the Diptera *Exorista larvarum* (Linnaeus, 1758) (Tachinidae) (445).

Adult emergence period of parasitoids. *Bracon (Habrobracon)* sp. and *Tetrastichus* sp. were the most frequent Hymenoptera parasitoid species in the sample. By contrast, only 11 adults of *I. viduata* emerged, and the remaining species of parasitic wasp were represented by three or less individuals. There were 445 adults of *E. larvarum* in our sample.

For *Bracon (Habrobracon)* sp. it took 11 days for adults to begin to emerge and emergence occurred from the 7th to the 22nd July (Fig.1). Peak emergence corresponded to 54

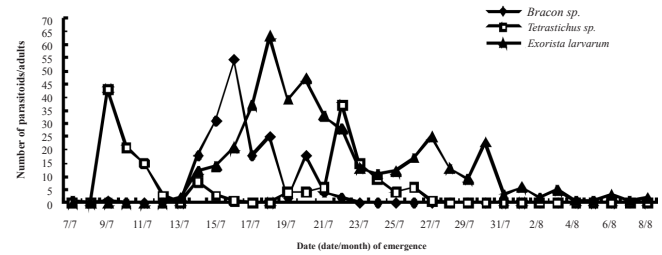


Figure 1. Adult emergence periods of *Bracon (Habrobracon)* sp., *Tetrastichus* sp. and *E. larvarum* adults.

adults (31% of the total number of *Bracon* sp. individuals that emerged). Eclosion took 16 days for *Tetrastichus* sp. and occurred from the 9th to the 27th July (Fig.1). Emergence in this species was characterized by a bimodal pattern of emergence, with the first peak of emergence being slightly higher than the second. Adults of *E. larvarum* emerged from mid July to early August (Fig.1). There were three small peaks of emergence concentrated in mid and late July, followed by a low rate of emergence until the 10th August.

Daily emergence rhythm of parasitoids. The emergence of *Bracon (Habrobracon)* sp. peaked between 11 and 12am and between 3 and 5pm, with most emergences occurring between 3 and 5pm (Fig. 2). *Tetrastichus* sp. emerged most frequently from 7am to 8pm, with two emergence peaks at 8 to 10am and 3 to 5pm, with the second peak being slightly higher (Fig. 2). The daily emergence of *E. larvarum* was characterized by a high peak of emergence from 7am to 8pm and several low peaks of emergence throughout the day (Fig. 2).

Pupation range of *Exorista larvarum*. *E. larvarum* pupation lasted from 7 to 34 days and two emergence peaks were observed, accounting for respectively 40% (first peak) and 48% (second peak) of all emergences (Fig. 3).

Our results show that the parasitoid species *Bracon (Habrobracon)* sp., *Tetrastichus* sp. and *E. larvarum* emerged at different times in July, with distinctive differences in the timing of their peaks of eclosion. The consecutive peaks of eclosion may be the consequence of long-term co-evolutionary competition processes among these three parasitoid species, which would have resulted in the minimization of inter-species competition and parasitization of

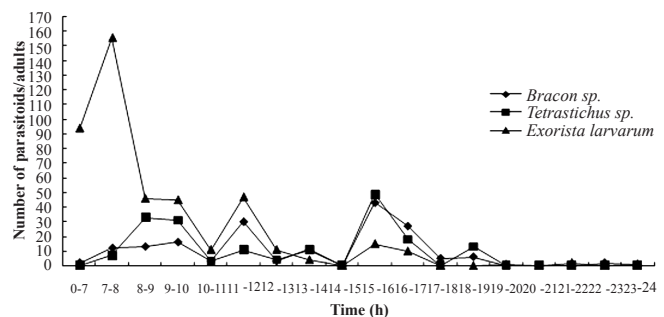


Figure 2. Daily emergence patterns of *Bracon (Habrobracon)* sp., *Tetrastichus* sp. and *E. larvarum* adults.

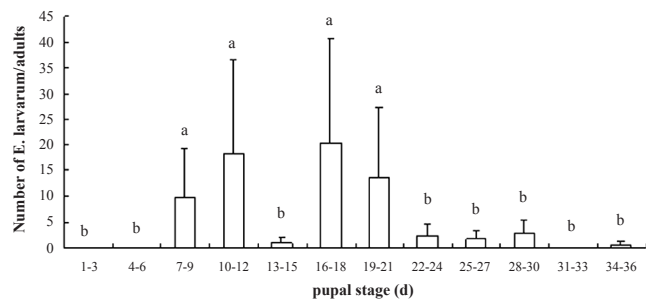


Figure 3. Pupation time of *E. larvarum* in days (Means $\pm$ SE, and the different letters indicate significant differences ($P=0.05$) based on LSD multiple comparisons).

the same host at different periods. This conjecture may also explain how these parasitoid populations are maintained in balance.

Although this study has confirmed that the emergence of *Tetrastichus* sp. adults is characterized by two peaks, it is still not clear whether *Tetrastichus* sp. is a hyperparasitoid insect. Conversely, a large number of *E. larvarum* adults emerged between midnight and 7am, but there are no data on the number of eclosions per hour, precluding the determination of specific emergence times. In addition, because the number of individuals belonging to *I. viduata*, *P. disparis*, *E. picta*, *Aprostocetus* sp. and *B. lasus* was low, we were unable to determine their patterns of eclosion, an issue that should be addressed in future studies.

Most adults of *O. ericae* emerge in early July, mate and lay eggs. Newly hatched larvae of the second generation emerged in mid July, and mature larval pupated in mid and late August. Adults emerged in early September. Based on the life cycle and habit of *O. ericae*, *Tetrastichus* sp. might parasitize eggs of *O. ericae*, *Bracon* (*Habrobracon*) sp. and *E. larvarum* might attack larvae of *O. ericae*. Similar results were reported by Haiyan Li *et al.* (2009), whose anatomical observations of the parasitoids of egg cocoons of *O. ericae* showed that each developmental stage of *O. ericae* is parasitized by a different parasitoid species. These findings could permit the selection of the most appropriate parasitoids according to the developmental stage of the host, as well as the selection of suitable prevention and control periods based on adult emergence patterns of parasitoids and the biological characteristics of the host.

Chemical control and cocoon extirpation are commonly used to prevent and control *O. ericae* (Yu *et al.* 2007; Sun *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009; Luan *et al.* 2010). However, chemical control and cocoon extirpation would also adversely affect parasitoid population numbers, reducing the effectiveness of this natural control of *O. ericae*. Therefore, it might be appropriate to reduce these artificial control measures during adult emergence periods of parasitoids. Simultaneously, through investigations of *O. ericae* parasitoid species and the emergence patterns of adult parasitoids, it might be possible to choose a suitable time for the release of parasitoid species into the field to control population numbers of *O. ericae*.

Acknowledgments

This research was supported by the Program of the Key Science and Research projects of China's State Forestry Administration (Grant No.2006-46), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (BLYX200919) and National Natural Science Foundation of China (30730075). We gratefully acknowledge Professor Wang Yi-Ping from Zhejiang Forestry University for helping us to identify *Bracon* (*Habrobracon*) sp. (Braconidae) parasitoids.

Cited literature

- CHEN GF, LI T, SHENG ML, LUAN SS, XU JF, WANG S. 2011. Study on sex pheromone of *Orgyia ericae* Germar. China Forestry Science and Technology 25(1): 73-76.
- CHEN GF, SHENG ML, LI T, MILLAR JG., ZHANG QH. 2010. Synergistic sex pheromone components of the grey-spotted tussock moth, *Orgyia ericae*. Entomologia Experimentalis et Applicata 136(3): 227-234.
- DAI MX, ZU AM. 1996. Studies on the constructural polypeptides and nucleic acid of *Orgyia ericae* nuclear polyhedrosis virus. Chinese Journal of Biological Control 12 (3): 117-122.
- DAPKUS D. 2004. Lepidoptera of a raised bog and adjacent forest in Lithuania. European Journal of Entomology 101(1): 63-67.
- DAPKUS D. 2010. Check-list of butterflies and moths of the notigalé bog (Northern Lithuania). New and rare for Lithuania insect species 22: 91-100.
- LI HY, ZONG SX, SHENG ML, SU M. 2009. Investigation on the Parasitoids of *Orgyia ericae*. Scientia Silvae Sinicae 45 (2): 67-70.
- LIU YX, YANG XL, YAO YY, ZHANG GL. 1985. Flora in Desertis Reipublicae Populorum Sinarum: Tomus 1. Science Publishing House, Beijing, 312p.
- LIU YX, YANG XL, YAO YY. 1987. Flora in Desertis Reipublicae Populorum Sinarum: Tomus 2. Science Publishing House, Beijing, 178-239p.
- LUAN SS, XU JF, YANG JJ, LI T, LI HY, GUO ZH. 2010. Comparison of the control effects of two biotic pesticides on *Orgyia ericae*. Forest Pest and Disease 29(3): 42-43.
- SUN YW, HUANG CH, LIU L. 2008. Investigation on the biological characteristics and the control experiments of *Orgyia ericae*. Modern Forestry Science and Technology (4): 73-74.
- WANG X, LIU Q. 2002. Studies on *Orgyia ericae* Germar-a new pest harming endangered plants-*Ammopiptanthus mongolicus* Cheng f.. Journal of Inner Mongolia Normal University (Natural Science Edition) 31 (4): 374-378.
- WANG ZJ, HAO XP, YANG ML. 2008. *Orgyia ericae* Germar and Its Natural Enemy. Journal of Inner Mongolia Forestry Science and Technology 34 (1): 27-28.
- WANG YF, XU CF, YAO NC, LI CQ, WANG WS, XU ZX. 2009. Biological Characteristics of Harming Seabuckthorn's *Orgyia Ericae* and it's Prevention. The Global Seabuckthorn Research and Development 7(1): 38-40.
- WU FZ, GAO ZN, GAO YY. 1982. Ningxia agricultural entomography: 2nd. People's Publishing House, Yinchuan, Ningxia, 150-151p.
- XIAO GR. 1992. Forest insects of China: the second edition (Revised & enlarged). China Forestry Publishing House, Beijing, 1093-1094p.
- XU ZJ. 1980. Study on *Orgyia ericae* Germar. Scientia Silvae Sinicae (1): 70-71.
- YANG LR, WANG D, DUAN LQ, ZHANG CX. 2006. Polyhedrin gene sequence and phylogenetic analysis of a nucleopolyhedro-

- virus isolated from *Orgyia ericae* Germar. DNA SEQUENCE 17(3): 215-222.
- YU J, JIA WJ, YANG HJ, LI FR, WANG SQ. 2007. Biological Characteristics of *Orgyia ericae* Germar and Its prevention and Control Measures. Shaanxi Forestry Science and Technology (4): 124-125, 132.
- ZHANG B, JIANG JM, ZHAO J. 1991. A preliminary study on a nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia ecricae*. Chinese Journal of Biological Control (2):93.
- ZHAO ZL. 1978. Economic insect fauna of China: 12th. Science Publishing House, Beijing, 39-40p.
- ZU AM, DAI MX. 1997. The bioassay and field evaluation of the nuclear polyhedrosis virus from *Orgyia ecricae*. Chinese Journal of Biological Control 13(2):57-60

Received: 19-may-2010 • Accepted: 31-mar-2011

Scientific note

Collaria oleosa* (Hemiptera: Miridae) on *Brachiaria ruziziensis* and *Penisetum purpureum* (Poaceae): Characterization of injury and biological aspectsCollaria oleosa* (Hemiptera: Miridae) en *Brachiaria ruziziensis* y *Penisetum purpureum* (Poaceae): aspectos biológicos y caracterizaciones de sus lesionesALEXANDER M. AUAD¹, DANIEL S. PIMENTA², DANIELA M. SILVA³, PRISCILA H. MONTEIRO⁴, and TIAGO T. RESENDE⁵

Abstract: Injuries caused by *Collaria oleosa* have often been observed in signal grass and elephant grass pastures. Therefore, the aim of this study was to diagnose and delineate the sites of the injuries caused by *C. oleosa* and to evaluate some biological aspects of this insect on forage. The duration and survival of the instars and nymph phase of the pest were analyzed. The epidermises were evaluated to identify the sites where the style of the pest entered and to characterize the anatomy of the injured site. The stoma was the entry place of the style and the main injuries were caused to the chlorenchyma of both grasses, and to the parenchymatic sheath of the signal grass. The lignified sheath remained intact, so this appears to be a feeding barrier for the insect. The duration was shorter from second to fifth instars and the nymphal phase when fed with the elephant grass. The way the food sources were hydrated did not alter the development of the nymphs. The survival was greater for the specimens maintained on elephant grass and the nymphs of the first instar were less sensitive when the grass blades were maintained on agar. This hydration method was also better for the survival of the mirid's nymph phase.

Key words: Plant bug. Forage. Elephant grass.

Resumen: Los daños de *Collaria oleosa* (Hemiptera: Miridae) se han observado con frecuencia en las praderas de brachiaria y pasto elefante. El objetivo de este estudio fue de diagnosticar y delimitar los lugares de daño provocados por la *C. oleosa*, así como evaluar algunos aspectos biológicos de este insecto en los forrajes. Se analizaron la duración y supervivencia de los instares y la fase ninfal del insecto. Se observó la epidermis con el fin de diagnosticar en que lugar ingresó el estilite de la plaga, así como la caracterización del sitio afectado. El estoma fue el lugar más frecuente de ingreso para el insecto, promoviendo daños en el clorénquima de los dos forrajes y también en la vaina parenquimatososa de la brachiaria. La vaina lignificada se mantuvo intacta, significando una barrera para la alimentación del insecto. La duración fue menor del segundo al quinto estadios y para la fase de ninfa cuando son alimentados con el pasto elefante. Las ninfas no fueron afectadas por la forma que fue hidratado y distribuido el alimento. Un número mayor de ninfas sobrevivió en el pasto elefante. Los instares demostraron ser menos sensibles cuando las hojas se mantuvieron con agar. El método de agar como hidratación también causó más supervivencia en la fase ninfal de mirideo.

Palabras clave: Chinche. Forraje. Pasto elefante.

Introduction

The genus *Collaria* is associated with various host plants, such as rice, wheat, oat, barley and forage grasses at different development stages (Silva *et al.* 1994; Carlessi *et al.* 1999; Ferreira *et al.* 2001; Goellner and Floss 2001). These insects cause whitish stippling or spotting on the leaves that impair the production of photo assimilates, reducing yield and nutritional value of the plants, and in the case of grasses, the palatability to cattle (King and Saunders 1984). The affected areas coalesce when the attack is more intense, and in the youngest leaves the limbo can totally or partially dry out. According to Menezes (1990), this type of injury is characteristically caused by the feeding habits of this genus. Wheeler (2000) reported that besides the local lesions and growth disorders caused by these bugs' feeding habits, one of the most important effects is the change in color, often accompanied by small black spots from their excrement.

The mirid *Collaria oleosa* (Distant, 1883) (Hemiptera: Miridae) is widely distributed in South America, including various Brazilian states (Carvalho and Fontes 1981). Although the mentioned report date from 30 year ago, few other studies of this bug have been conducted. The typical damage caused by this species has often been observed in signal grass and elephant grass pastures, but farmers and agronomists still often do not associate this damage with the causative agent, leading to the use of incorrect tactics to combat the problem. According to Barboza (2009), this species is also a potential pest to wheat in cerrado (savanna) regions of Brazil.

Morales and Rodriguez (2004) reported that *C. scenica* Stal, 1859 this species is responsible for serious losses in pastures in Colombia, requiring the use of pesticides for its control. Also in Colombia, Duarte *et al.* (1998) reported that this species is the main problem for production of milk in the Bogotá savanna region due to the high prevalence of this mirid, which is present in 95% of the dairy farms, causing

¹ Dr. Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento No. 610, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Endereço eletrônico: amaud@cnpgl.embrapa.br. Autor para correspondencia. ² Dr. Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora-MG. daniel.pimenta@ufff.edu.br. ³ Mestre of Science Student. Universidade Federal de Lavras. Campus Universitário, C. P. 3037, 37200-000, Lavras, MG. dsmomy_bio@yahoo.com.br. ⁴ Biology Student. Universidade Federal de Juiz de Fora. Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora-MG. priscilahmonteiro@gmail.com. ⁵ Agronomic Engineer Embrapa Gado de Leite Rua Eugênio do Nascimento No. 610, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. tiago@cnpgl.embrapa.br

reduction of pasture carrying capacity and daily milk production per cow. In Brazil, serious damage caused by this mirid was reported in pastures of *Cynodon dactylon*, (L.) Pers and *Brachiaria plantaginea*, (Link) Hitch in 2005 and 2006 (Barboza 2009).

The complexity of the problems caused by pests in pastures requires finding and implementing different solutions than those used on food crops. This in turn requires understanding the way the insects and plants interact. The aim of this study was to diagnose and delineate the places where *Collaria oleosa* causes injuries to forage grasses and to evaluate some biological aspects of this insect in pastures.

Material and Methods

Characterization of the leaf injuries. The adaxial and abaxial parts of the epidermis of the grass samples were examined in the Plant Anatomy Laboratory, Federal University of Juiz de Fora - MG, Brazil, to detect the places where the insects insert their stylet. For internal anatomical characterization, six blades each of elephant grass and signal grass with signs of injury were collected. Then three cross sections were obtained from each sample, for a total of 18 sections from each grass species. The percentage of area injured in each section was determined in the median and intercostal portion. The transversal measures were obtained from the second secondary vascular bundle, counted from the keel, since the diameter of these secondary bundles diminishes in direction of the leaf edge. Digital photographs were taken of the cross sections and the injured proportion was determined by quantifying the pixels on a gray scale using image editing software (Adobe® Photoshop®). The data on leaf thickness were also obtained in pixels related to the area of the cross section, where the horizontal measure was held constant, according to the microscopic field. To determine the length of the injury, the photographs were analyzed with the same software, but the measurements were taken with a caliper and converted to real scale with the aid of an objective micrometer.

Evaluation of the biological aspects of *C. oleosa*. Adult specimens were collected in a greenhouse and reared in the laboratory of the Embrapa Dairy Cattle Research Center. Nymphs up to 12 hours old were individualized in two types of rearing chambers. The first rearing type consisted of cylindrical plastic beakers (2.5cm in diameter x 2.5cm in height) in which a layer of agar about 1.0cm thick was placed to maintain the turgescence of the leaves. The second rearing type consisted of Petri dishes (5cm in diameter) lined with a sheet of filter paper moistened with distilled water to keep the leaf sections hydrated. In both cases the nymphs were given leaf disks of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum Cv. Pioneiro) or signal grass (*Brachiaria ruziziensis* Germain and Evard). The rearing chambers containing the nymphs were sealed with voile cloth held in place with rubber bands and kept in a climate chamber (28°C, 70±10% RH and 14-hour photophase). The leaves were changed daily or when they turn yellowish. The experiment was performed in a fully randomized 2x2 factorial design (grass species x rearing method), with 100 repetitions.

The duration (days) and survival (%) of each instar and the nymph phase of *C. oleosa* kept on the elephant and signal grass were recorded. The data were submitted to variance analysis and the means were compared by the Tukey

test ($p < 0.005$). The species identification of *C. oleosa* was performed by the taxonomist Dr. Paulo Sérgio Fiuza Ferreira of Viçosa Federal University, Brazil.

Results and discussion

Injuries to the host plants caused by *C. oleosa*. The injuries to the two grasses were caused by the insertion of the stylet in the leaf epidermis, through the stomata, causing the leaves to lose pigmentation. This same reaction was observed by Salvadori (2000), who mentioned that *C. scenica* nymph insert the stylet in the lengthwise direction of the leaf and suck out the cell contents, causing whitish stippling along the leaf limbo of wheat. The second step is what injures the plant, by impairing photosynthesis and reducing the biomass.

Among grasses there are species with single leaf sheaths (lignified) or dual sheaths (lignified and parenchymatic), for elephant grass and signal grass (Figs. 1A-1B). According to Hatch and Slack (1966), this is the normal kranz anatomy of grasses. In both grass species the injury mainly occurred to the chlorenchyma, which radiates around the bundle sheath. It was also possible to observe that the parenchymatic sheath was affected in the signal grass. In both grass species the lignified sheath remained intact, indicating it acts as a feeding

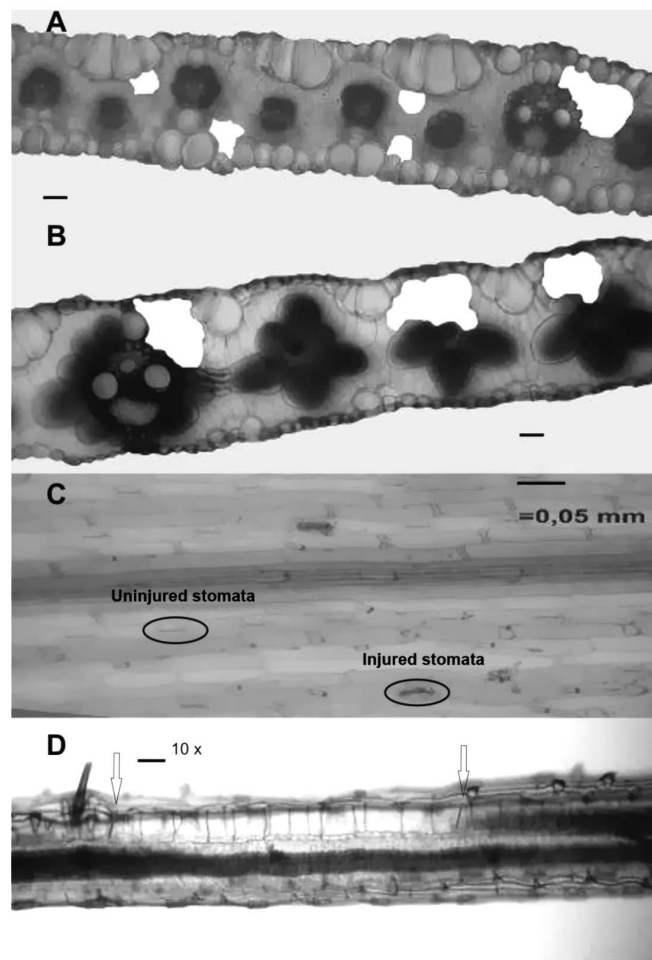


Figure 1. Cross sections of elephant grass **A.** and signal grass **B.** with injuries indicated (bar = 0.05mm). Front views of the adaxial epidermis **C.** indicating the injured stomata. Longitudinal section of elephant grass **D.** with the injured area indicated (bar = 0.05mm).

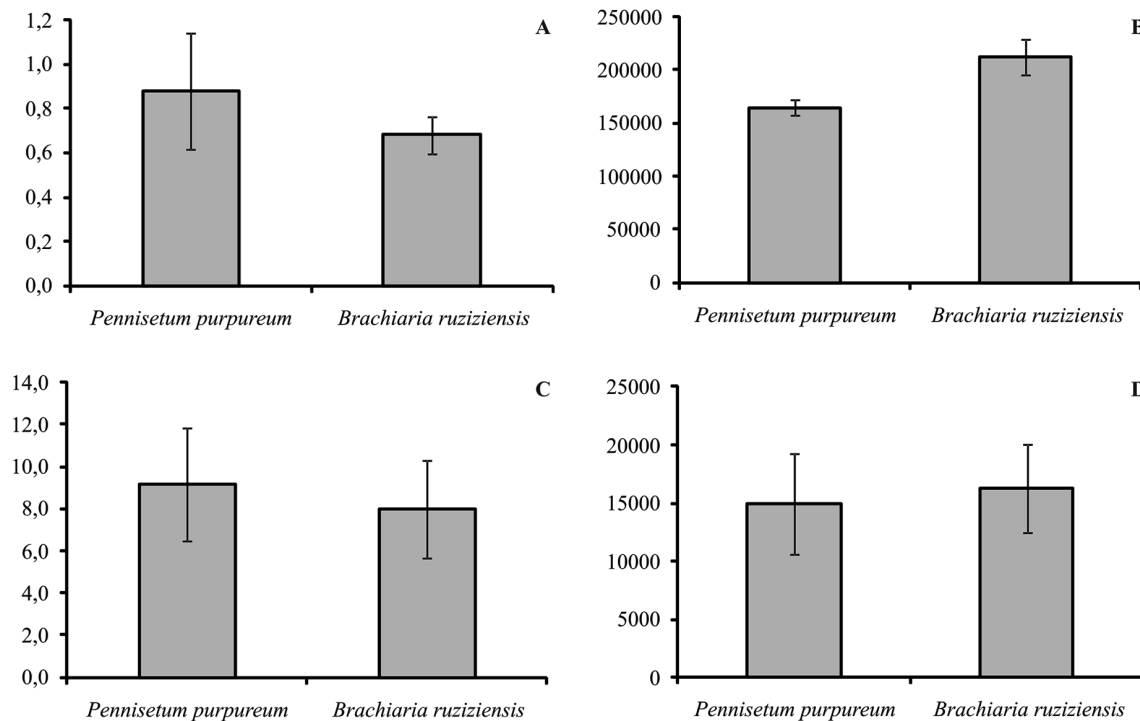


Figure 2. Injury length (mm) **A.** leaf thickness (pixels) **B.** injured leaf (%) **C.** injury (pixels) **D.** in the two grass species (standard deviation at 5% probability).

barrier to the insect. This agrees with the finding of Raven *et al.* (2007), who mentioned that lignin is deposited on the cell wall, providing compression resistance and rigidity. In general the epidermis cells were not attacked, except upon insertion of the stylet, in the case, the main injury occurred to the stomata (Fig. 1C).

Analysis of the injured area by observing the longitudinal section showed it was limited by the length of the stylet, which penetrates the leaf blade in this direction through the stomata in the adaxial and abaxial epidermis (Fig. 1D). Therefore, due to the little variation in the stylet lengths of the *C. oleosa* specimens, there was no significant difference in the length of the injuries in both grass species ($F=2.324$; $p=0.13$) (Fig. 2A).

The leaf thickness of the two grass species is significantly different ($F=30.563$; $p=0.0001$) (Fig. 2B). Nevertheless, there was no statistical difference between the species in the proportion of injured area relative to the thickness of the cross section ($F=0.534$; $p=0.47$) (Fig. 2C) and the total injured area ($F=0.227$; $p=0.63$) (Fig. 2D), denoting a similar effect caused by the pest in the two grasses.

Effect of grasses and rearing chamber conditions on the biology of *C. oleosa*. The insects fed with both forage grasses passed through five instars. The average duration of the first instar of *C. oleosa* did not differ significantly when fed with signal or elephant grass (Table 1). However, the duration of the next four instars was shorter for the specimens fed with elephant grass (Table 1), indicating this grass has better nutritional quality for *C. oleosa*, since in general insects develop faster with diets having higher nutritional quality. Silva *et al.* (1994) reported a maximum duration of 13 days for the

nymph phase of the same species fed with wheat leaves and maintained under climate conditions similar to those in this study.

The durations of the first, third and fifth instars and the entire nymph phase did not differ significantly, indicating that the way in which the food sources were maintained did not have a significant effect on the development of the nymphs.

Comparison of the rearing method on each grass species individually showed that for the elephant grass the maintenance of the leaves on an agar layer shortened the life cycle of the insect, except in the second instar, where this parameter was longer, and in the third instar, where there was no difference in duration. For signal grass no difference was observed from the first to the third instar, and for the fifth instar and the entire nymph phase the maintenance of turgescence of the leaf by agar was not favorable. We attribute these findings to the thickness of the leaf blades of the two grasses evaluated: elephant grass has thinner leaves, making them less dependent on hydration (Fig. 2B).

The survival of the nymphs did not differ significantly from the first to the fourth instars when fed with signal or elephant grass. However, for the fifth instar and the entire nymph phase those maintained on elephant grass had a higher survival rate (Table 1). Therefore, this forage species was better for the biologic parameters, duration and survival.

With respect to the rearing method, the nymphs of the first instar were more sensitive: they presented 37% higher survival when the leaves' turgescence was maintained by a layer of agar (Table 1), which made the leaves more tender and consequently made it easier for the nymphs to find the food site. The survival of the nymphs of the third and fourth instar was not influenced by the way the leaves were main-

Table 1. Duration (days) and survival (%) of the instars of the nymph phase of *Collaria oleosa* fed with signal grass or elephant grass leaves under a hydration regime with moistened filter paper or a layer of agar. 28°C, 70±10% RH and 14-hour photophase.

Forage	Duration			Survival		
	Filter paper	Layer of agar	Average	Filter paper	Layer of agar	Average
1° Instar						
Signal grass	2.82 Ba	2.91 Aa	2.87A	50.52 Ab	94.28 Aa	72.40 A
Elephant grass	3.10 Aa	2.81 Ab	2.96 A	57.64 Ab	88.27 Aa	72.95 A
Average	2.96 a	2.86 a		54.08 b	91.275 a	
2° Instar						
Signal grass	2.22 Aa	2.36 Aa	2.29 A	100.00 Aa	92.85 Aa	96.42 A
Elephant grass	1.96 Bb	2.17 Ba	2.07 B	98.05 Aa	88.72 Ab	93.38 A
Average	2.09 b	2.27 a		99.02 a	90.78 b	
3° Instar						
Signal grass	2.44 Aa	2.56 Aa	2.50 A	88.88 Aa	95.53 Aa	92.20 A
Elephant grass	2.26 Aa	2.31 Ba	2.29 B	94.70 Aa	84.62 Ba	89.66 A
Average	2.35 a	2.44 a		91.79 a	90.07 a	
4° Instar						
Signal grass	3.44 Aa	2.77 Ab	3.11 A	65.83 Aa	79.96 Aa	72.89 A
Elephant grass	2.84 Ba	2.53 Ab	2.69 B	69.41 Aa	85.50 Aa	77.455 A
Average	3.14 a	2.65 b		67.62 a	82.73 a	
5° Instar						
Signal grass	3.80 Ab	4.42 Aa	4.11 A	69.81 Aa	59.52 Ba	64.66B
Elephant grass	4.30 Aa	3.59 Bb	3.95 B	49.38 Aa	93.80 Ab	71.59 A
Average	4.05 a	4.00 a		59.595 b	76.66 a	
Nymph phase						
Signal grass	14.00 Ab	14.91 Aa	14.46 A	20.00 Aa	32.85 Ba	26.42 B
Elephant grass	14.41 Aa	13.12 Bb	13.77 B	18.82 Ab	58.44 Aa	38.63 A
Average	14.21 a	14.02 a		19.41 b	45.64 a	

Values followed by different capital letters in the columns and small letters in the lines differ from each other by the Tukey test ($P < 0.05$).

tained. Those of the fifth instar had greater survival when fed with leaves kept on agar, but this did not occur for the second instar.

Starting with the fourth instar there was a decline in the viability values for the nymphs in both rearing chambers and for both grasses (Table 1). This can be explained by the size of the chambers, suggesting that for more developed instars the rearing receptacle should be larger.

The entire nymph phase of *C. oleosa* was longer for those fed with leaves kept on agar than for those maintained on filter paper moistened with distilled water (Table 1). It was evident that agar assured better hydration of the leaf disks, maintaining the internal hydrostatic pressure so that the cells remained turgid for a longer period. This method permitted an efficiently way to create the mirids. Carlessi *et al.* (1999) studying the biology of *C. scenica* fed with wheat leaf sections with no substrate for maintenance, reported 50.9% viability of the nymphs.

Cited literature

- BARBOZA, M. R. 2009. *Collaria scenica* (Stal, 1859) (Hemiptera: Miridae) em poaceas hibernais na região centro sul do Paraná: biologia e danos. 55 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, Brasil.
- CARLESSI, L. R. G.; CORSEUIL, E.; SALVADORI, J. R. 1999. Aspectos biológicos e morfométricos de *Collaria scenica* (Stal) (Hemiptera: Miridae) em trigo. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 28 (1): 65-73.
- CARVALHO, J. C. M.; FONTES, A. V. 1981. Mirídeos Neotropicals, CCXXV: Revisão do Gênero *Collaria* Provancher no Continente Americano (Hemiptera). Experimentiae 27 (2): 1-46.
- DUARTE, O. A.; CASTILHO, S. T.; GOMÉZ, F.; REY, A.; ARA-GON, R. 1998. El chinche de los pastos: efectos de su ataque y estrategias para su control en fincas lecheras de Cundinamarca y Boyacá. Corpoica, Tibaitata. 18 p.
- FERREIRA, E.; BARRIGOSI, J. A. F.; VIEIRA, N. R. 2001. Percevejos das panículas do arroz: fauna Heteroptera associada ao arroz. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goias. 52 p.
- GOELLNER, C. I.; FLOSS, E. L. 2001. Insetos - pragas da cultura da aveia: Biologia controle e manejo. Editora Universidade Passo Fundo, RS, 98 p.
- HATCH, M. D.; SLACK, C. R. 1996. Photosynthesis by Sugar-cane Leaves: A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. Biochemistry Journal 101 (1): 103-111.
- KING, A. B. S.; SAUDERS, J. L. 1984. Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en America Central. O.D.A. TDRI-CATIE, Londres. 182 p.
- MENEZES, M. 1990. *Collaria oleosa* (Distant, 1883) (Hemiptera: Miridae), nova praga de gramíneas forrageiras no sudeste da Bahia, Brasil. Agrotropica 2 (2): 113-118.

- MORALES, P. L.; RODRIGUEZ, N. 2004. El cloropirifos: Posible disruptor endócrino em Bovinos de Leche. Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias 17: 255-267.
- RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. 2007. A composição molecular das células vegetais. p. 17-38. In: RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. (Ed.) Biologia Vegetal. vol. VII. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 856p.
- SALVADORI, J. R. 2000. Pragas da cultura da cevada. Embrapa Trigo, Passo Fundo. 48 p.
- SILVA, D. B. S.; ALVES, P. S. F.; FERREIRA; CAMARGO, A. J. A. 1994. *Collaria oleosa* (Distant, 1883) (Heteroptera: Miridae) uma praga potencial na cultura do trigo na região dos cerrados. Pesquisa Agropecuária Brasileira 29: 2007-2010.
- WHEELER, A. G. 2000. Plant bugs (Miridae) as plant pest. p.37-83. In: SCHAEFER, C. W.; PANIZZU, A. R. (Ed.) Heteroptera of Economic Importance. vol I. Editora CRS, Boca Raton. 828 p.

Received: 7-feb-2011 • Accepted: 22-sep-2011

Nota científica

Parasitismo de huevos de *Paraselenis flava* (Coleoptera: Chrysomelidae) en batata (*Ipomoea batatas*)

Parasitism in eggs of *Paraselenis flava* (Coleoptera: Chrysomelidae) in sweet potato (*Ipomoea batatas*)

SÔNIA MARIA N. M. MONTES¹ and VALMIR A. COSTA²

Resumen: Se reporta la ocurrencia de *Emersonella pubipennis* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando los huevos de *Paraselenis flava* (Coleoptera: Chrysomelidae) atacando batata (*Ipomoea batatas*), en la región de Presidente Prudente, SP, Brazil.

Palabras clave: Parasitoide. Enemigos naturales. Control biológico.

Abstract: The occurrence of *Emersonella pubipennis* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing eggs of *Paraselenis flava* (Coleoptera: Chrysomelidae) infesting sweet potato, (*Ipomoea batatas*), in the region of Presidente Prudente, state of São Paulo, Brazil, is reported.

Key words: Parasitoids. Natural enemies. Biological control.

Con la expansión del cultivo de batatas (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) (Convolvulaceae) en el oeste del Estado de São Paulo, algunas plagas han comenzado a demostrar un importante aumento de población, tal es el caso de *Paraselenis flava* (L., 1758) (Coleoptera: Chrysomelidae) (Fig. 1A). Además, estos insectos también atacan *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (Biezanko *et al.* 1949) y otras Convolvulaceae (Silva *et al.* 1968). En el año agrícola 2003/2004, en el municipio de Presidente Prudente, SP, se constató la presencia de este insecto en extensas zonas de cultivo de batata (Información del autor).

Las larvas y adultos del insecto se alimentan de las hojas, reduciendo considerablemente el área fotosintética e indirectamente perjudican el desarrollo de los tubérculos (Marques 1932). Por lo general, los daños son pequeños, pero los cultivos son afectados al ser perforadas las hojas, retrasando el crecimiento de la planta y la formación de tubérculos (Bondar 1930, 1954).

En Brasil se han citado previamente varios depredadores y parasitoides que atacan crisomélidos de la subfamilia Cas-

sidinae. En la región del amazonas, Carrol (1977) afirma que 86% de los huevos de *Stolas* sp. fueron parasitados por *Emersonella niveipes* (Girault, 1916) (Hymenoptera: Eulophidae) y sus larvas pueden ser devoradas por depredadores diversos incluyendo hormigas, mientras que las pupas son parasitadas por *Brachymeria* sp. y *Conura* (*Spilochalcis*) sp. (Hymenoptera: Chalcididae).

De Santis (1983), al describir cuatro especies de *Emersonella* de América del Sur, informó la existencia de *Emersonella ooecia* De Santis, 1983 y *E. niveipes* en Brazil. También se ha mencionado en el país la especie *Emersonella trimaculata* Azevedo y Silva, 2000 (Azevedo *et al.* 2000), aunque Hansson (2002) considera esta entidad como sinónimo de *E. niveipes*.

Hay un gran interés en desarrollar medidas de control biológico contra plagas debido al riesgo de efectos dañinos de plaguicidas químicos al medio y a los seres humanos y conocer los enemigos naturales es uno de los primeros pasos a tomar. El objetivo de este trabajo fue reportar parasitoides

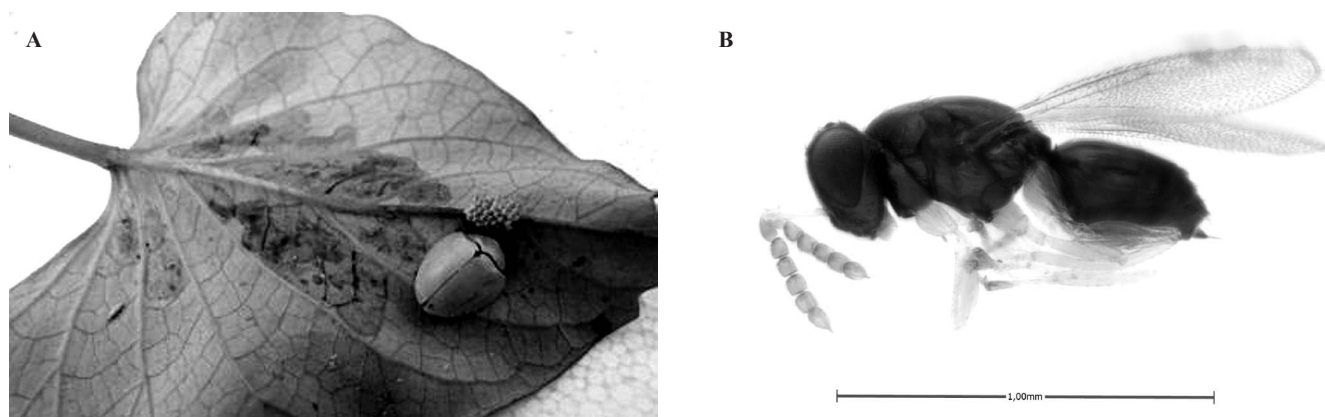


Figura 1. A. Postura y adulto de *Paraselenis flava* B. Adulto de *Emersonella pubipennis* (Hym.: Eulophidae).

¹ Dra. PqC. APTA-Pólo Regional Alta Sorocabana, Rodovia Raposo Tavares, km 561, Caixa 298, Presidente Prudente, SP, Brasil, CEP 19015-970, soniamontes@apta.sp.gov.br, Autora para correspondencia ² Dr. PqC.APTA- Instituto Biológico, Rodovia Heitor Penteado, km 3, Caixa 70, Campinas, SP, Brasil, CEP- 13001-970, valmir@biologico.sp.gov.br

de huevos de *P. flava* en cultivos de batata en la región de Presidente Prudente, SP, Brazil.

Las colecciones se hicieron en parcelas comerciales de 5 hectáreas de batata cultivar Rio II, en la ciudad de Presidente Prudente, SP, Brazil (UTM 7545369 m N, 459817 m E y 437 m de altitud). hasta final del ciclo, no se habían realizado aplicaciones de plaguicidas químicos.

Se recolectaron hojas al azar en una bolsa plástica y se llevaron al laboratorio del Pólo de la región da Alta Sorocabana, en el municipio de Presidente Prudente, SP, para obtener los insectos. Para evaluar el parasitismo, los peciolos de hojas conteniendo huevos del escarabajo se envolvieron con algodón empapado en agua destilada y se mantuvieron aisladas en recipientes de vidrio de 15cm y 8cm de diámetro. La tapa del recipiente fue perforada para colocar una gasa que permita aireación. Un tubo de ensayo invertido permitió la alimentación y la visualización de los parasitoides que emergían. Los recipientes se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la emergencia de los parasitoides y la eclosión de las larvas del escarabajo.

Los parasitoides obtenidos fueron sacrificados y conservados en etanol al 70% y luego identificados con la ayuda de las claves de Schauff *et al.* (1997) y Hansson (2002); los ejemplares fueron depositados en la Colección de Insectos Entomófagos "Oscar Monte", del Instituto Biológico, en Campinas, SP, Brazil. El porcentaje de parasitismo se calculó mediante la fórmula $P = (N^{\circ} \text{ de huevos parasitados} / \text{total de huevos}) \times 100$.

Se recogieron un total de 96 huevos de *P. flava*, de los que emergieron 15 larvas del escarabajo y 30 adultos de *Emersonella pubipennis* Hansson, 2002 (Hymenoptera: Eulophidae). (Fig. 1B). El parasitismo fue del 31%. Este es el primer registro de *E. pubipennis* en batata en Brazil, aunque su distribución conocida incluía sólo a Panamá (Moura 1985). *Emersonella* Girault es un género restringido al Nuevo Mundo (Boucek 1977). Todas las especies conocidas del parasitoide atacan los huevos de Chrysomelidae (Hansson 2002). *Emersonella pubipennis* ha sido asociada a huevos de *Acromis sparsa* (Boheman, 1854) (Hansson 2002). Con este trabajo aumenta el número de especies hospederas del parasitoide, haciendo notar que al ser una plaga agrícola, le confiere a *E. pubipennis*, el estatus de potencial agente de control biológico en programas de manejo integrado de plagas.

Hay pocos estudios sobre la biología de *Emersonella*. En Brazil, Azevedo *et al.* (2000) estudiaron el ciclo de vida de *E. niveipes* (como *E. trimaculata*) en *Zatrephina meticulosa* Spaeth, 1909, la cual, en Maranhão, ha sido detectada sobre hojas de *Ipomoea pescaprae* (L.) R.Br. Un hecho curioso sobre *Emersonella* es que las hembras del parasitoide pueden ser foréticas en las hembras del hospedador y parasitar sus huevos justo después de ser depositados. Esto ha sido observado en *E. niveipes* por Carrol (1977) y en *E. ooecia* por Becker y Frieiro-Costa (1988).

Expresamos nuestro agradecimiento al Dr. Christer Hansson (Universidad de Lund, Suecia) por la donación de un

ejemplar de su obra (Hansson 2002), lo que permite el reconocimiento de *E. pubipennis* y a la Dra. Marlene Cristina Alves (FEIS/UNESP) por la revisión del manuscrito.

Literatura citada

- AZEVEDO, C.O.; SILVA JUNIOR, J.C.; CAMPOS, L.A. de O. 2000. Description of a new species of *Emersonella* (Hymenoptera: Eulophidae) from Brazil, with preliminary observations on its biology. *Journal Hymenoptera Research* 9 (2): 298-304.
- BECKER, M.; FRIEIRO-COSTA, F.A. 1988. Natalty and mortality in the egg stage in *Gratiana spadicea* (Klug 1829) (Coleoptera: Chrysomelidae), a monophagous cassidine beetle of an early successional Solanaceae. *Revista Brasileira de Biología* 48 (3): 467-475.
- BIEZANKO, C.M. de; BERTHOLDI, R.E.; BAUCKE, O. 1949. Relação dos principais insetos prejudiciais observados nos arredores de Pelotas nas plantas cultivadas e selvagens. *Agros* 2(3): 156-213.
- BONDAR, G. 1954. Pragas da batata-doce na Bahia. *Bahia Rural* 22(7): 18-19, 21,23.
- BONDAR, G. 1930. Insetos damnhinhos e moléstias da batata-doce no Brasil. Segunda contribuição. *Campo* 1(11): 33-36.
- BOUCEK, Z. 1977. Descriptions of two new species of Neotropical Eulophidae (Hymenoptera) of economic interest, with taxonomic notes on related species and genera. *Bulletin of Entomologic Research* 67: 1-15.
- CARROLL, C.R. 1977. Besouros, parasitóides e *Ipomoea* (Convolvulaceae): um estudo sobre descriminação de hospedeiro. *Acta Amazonica* 7(1): 15-22.
- De SANTIS, L. 1983. Las especies argentinas, uruguayas e brasileñas del género *Emersonella* Girault 1916 (Insecta, Hymenoptera, Eulophidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 12(2): 249-259.
- HANSSON, C. 2002. Eulophidae of Costa Rica (Hymenoptera: Chalcidoidea), 1. *Memoirs of the American Entomologist Institute* 67: 1-290.
- MARQUES, L.A. de. 1932. Insetos damnhinhos à batata-doce, seus hábitos e os meios de combate-los. *Boletim do Instituto Biológico de Defesa Agrícola* 9: 1-45.
- MOURA, J.I.L. 1985. Incidência de *Calyptocephala brevicornis* (Boheman 1850) (Coleoptera: Chrysomelidae) em cultura de dendê (*Elaeis guineensis*) no município de Porto Platon, Território Federal do Amapá. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 14(1): 37-43.
- SCHAUFF, M.E.; LaSALLE, J.; GRISSELL, E.E. 1997. Eulophidae. In: GIBSON, G.A.P.; HUBER, J.T.; WOOLLEY, J.B. (Eds.). *Annotated keys to the genera of Nearctic Chalcidoidea* (Hymenoptera). Ottawa: NRC Research Press. 327-429.
- SILVA, A.G.D.A.; GONCALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONCALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M. do N.; SIMONI, L. de. 1968. Cuarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores. Parte II - 1º tomo - Insetos, hospedeiros e inimigos naturais. Rio de Janeiro: Ministerio de Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Agropecuária. 622p.

Recibido: 29-dic-2011 • Aceptado: 26-abr-2011

Evaluación del perfil neurofarmacológico del aceite de *Ulmoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Evaluation of neuropharmacological profile of oil from *Ulmoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae)

FLOR ÁNGELA TOBÓN¹, GLORIA PATRICIA GUTIÉRREZ Z.² y MARTA LILIANA MEJÍA G.³

Resumen: Este estudio investiga el perfil neurofarmacológico del aceite extraído del *Ulmoides dermestoides* “in-vivo” para establecer su efecto sobre el sistema nervioso central. La técnica empleada en el diseño experimental fue bloques completamente aleatorizados de cuatro tratamientos: Sustancia control (solución salina), Sustancia problema (aceite de *U. dermestoides*), Sustancia patrón estimulante (Anfetamina) y Sustancia patrón depresora (Diazepam y Difenhidramina), utilizando ratones albinos (*Mus musculus*), cepa suizo ICR. Los resultados muestran que el aceite (3mg/Kg, vo) tiene un efecto depresor en el SNC de esta especie e indican diferencia significativa entre tratamientos. Dicho efecto depresor es dosis-dependiente a través del tiempo.

Palabras clave: Aceite. Depresión. Sistema Nervioso Central.

Abstract: The neuropharmacological profile of extracted oil from *Ulmoides dermestoides* “in vivo” to establish its effect on the central nervous system was studied. The method used was random blocks of four treatments: Control Substance (saline solution), Problem Substance (oil from *U. dermestoides*), Stimulant Pattern substance (Amphetamine) and Depressive Pattern Substance (Diazepam and Diphenhydramine) by using Swiss ICR strain albino mice (*Mus musculus*). The results show that the oil (3mg/kg, ov) has a CNS depressing effect on this specie and indicate some significant difference between treatments. The comparative analysis of obtained data concerning the CNS depressing effect of the oil compared with the other treatments used, points out this depressing effect is dose-dependent over time.

Key words: Oil. Depression. Central Nervous System.

Introducción

El coleóptero *Ulmoides dermestoides* (Fairmaire, 1893), es un insecto de la familia Tenebrionidae, originario de la China que fue introducido en Colombia desde hace varias décadas como remedio natural antiasmático. El uso de este insecto como remedio por parte de personas del común despertó el interés de entomólogos biólogos y profesionales de la salud. *U. dermestoides* se reproduce adecuadamente en los granos de maní (*Arachis hypogaea* L.), maíz (*Zea mays* L.), arroz (*Oriza sativa* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), frijol mungo (*Vigna radiata*) y soya (*Glycine max* (L.) Merrill), (Londoño 1992). Según referencia popular en la China y Malasia, las heces de este insecto se utilizan para curar indigestiones, afecciones cardíacas, mialgias, enfermedades renales y asma. Además, se utiliza en el tratamiento de una variedad de infecciones y se ingiere vivo como afrodisíaco (Chua y Chandrepal 1978; Chu *et al.* 1997).

Las medicinas alternativas de origen chino utilizan generalmente mezcla de principios activos –PA– y la mayoría de ellos son responsables de la actividad farmacológica y usos clínicos, pero no están bien definidos. El grado de evidencia clínica para apoyar estas medicinas como terapéuticas no reúne los estándares internacionales de fármacos nuevos aceptados para tratamientos clínicos. Algunos estudios preclínicos y clínicos realizados en China se publican en la literatura de ese país, pero los resultados no son de fácil acceso para las

comunidades occidentales. Las medicinas de origen natural constituyen una perspectiva de la investigación de la biodiversidad, como un beneficio sostenible enorme, es además fuente de oportunidades de empresa; razones culturales y económicas, entre otras, la convierten en una alternativa terapéutica que presenta bioactividad con potencialmente menos eventos indeseados que alteren organismos y el ambiente, comparados con los medicamentos sintéticos tradicionales (Largo 1987; Gutiérrez 2002; Li *et al.* 2003).

Desde esta perspectiva, este artículo presenta la valoración del perfil neurofarmacológico del aceite obtenido de *U. dermestoides*, partiendo de un estudio de casos, en el cual se consultaron algunas personas del común que recibían tratamiento en el departamento de Neumología del Hospital San Vicente de Paúl de la ciudad de Medellín (Colombia) y que además tomaban infusión de este coleóptero vivo, en leche o en agua de panela caliente, para aliviar los síntomas en crisis asmáticas. Las personas consultadas expresaron que dicha infusión les mejoraba los síntomas agudos de asma y notaban una mayor recuperación. Estos resultados plantean la posibilidad de que el aceite extraído del coleóptero, obtenido en condiciones de estrés a una temperatura entre 35-45°C /10min, tenga bioactividad farmacológica broncodilatadora o antiinflamatoria. Esta acción broncodilatadora puede ser debido indirectamente a que el maní contiene ácidos grasos poli-insaturados de dos familias: 1) la familia ω -3 como el ácido linolénico (C18:3, ω -3), compuestos de cadena más

¹ M. Sc. Facultad Química Farmacéutica. Grupo UNIPLURI/VERSIDAD, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Carrera 74 No.40-27, edificio Samarkanda, apto 603. Medellín, Colombia. Telefax 2503975, tel. 2198462. fatobon@farmacia.udea.edu.co, jvm@une.net.co. Autora para correspondencia.

² Integrante del Grupo UNIPLURI/VERSIDAD-GITT, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Especialista en Gerencia de Proyectos. Correo electrónico: patri0411@hotmail.com, teléfono 2195783, 4118329. ³ Grupo UNIPLURI/VERSIDAD-GITT, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Correo electrónico: marlig74@gmail.com, teléfono 2195783.

larga como los ácidos eicosapentenoico –EPA– (C20:5), docosapentenoico –DPA– (C22:5, ω -3) y docosahexenoico (C22:6, ω -3). 2) la familia ω -6 como el ácido araquidónico (C20:4, ω -6). Estos PA intervienen en la reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos, y en el aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el plasma; que pueden ser utilizados por el organismo como un factor protector en la prevención del riesgo de enfermedades cardiovasculares y enfermedades inflamatorias en vías respiratorias y articulaciones porque tienen acción antioxidante (Tobón *et al.* 2002). En Colombia es una necesidad la búsqueda de sustancias de origen natural que tengan mayor probabilidad de presentar pocos efectos adversos para las personas y menor impacto negativo al medio (Echeverri y Quiñones 1997; Smith 2002; Li *et al.* 2003). Por las razones anteriores, el propósito de investigación fue iniciar un tamizaje farmacológico de dicho aceite utilizado por la comunidad, empezando por establecer su efecto depresor o estimulante en el SNC, el cual es uno de los sistemas vitales del organismo.

Materiales y Métodos

Esta investigación se desarrolló en la Universidad de Antioquia, en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Química Farmacéutica. Las pruebas biológicas se realizaron de conformidad con las normas colombianas para el uso e investigación en animales vivos (Ley 84, 1989; Resolución 8430, 1993), teniendo en cuenta los principios técnico-científicos y éticos del manejo y el respeto al animal como sujeto experimental, desde las tres R de Russell y Burch (Reemplazo, Reducción y Refinamiento), para proporcionar al animal bienestar mientras viva, minimizando las molestias que pueda originarle el estudio; como también garantizar que los resultados de la investigación sean confiables (Tobón 1998; Mrad 2006; Cardoso *et al.* 2007; Concepción *et al.* 2007). El proceso metodológico se hizo en dos fases:

Cultivo del pie de cría de U. dermestoides. Los especímenes adultos de este coleóptero, se obtuvieron de un pie de cría reproducido en maní, en el laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. De dicho pié de cría se extrae el aceite que se utiliza en las pruebas neurofarmacológicas (Londoño 1992).

Ambientación del animal de experimentación. Se utilizaron 36 ratones albinos, cepa suizo ICR, adquiridos en el bioterio de la facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, y éstos se distribuyeron en seis grupos homogéneos de cuatro ratones, con las siguientes características: machos con peso entre 18 y 21 g y 50 días de edad. La edad de los animales de experimentación garantiza la madurez del SNC para que el efecto por el aceite no sea alterado debido a la no maduración del cerebro. Las condiciones ambientales se ajustaron a una temperatura aproximada entre 22 y 25°C; períodos de luz y oscuridad de 12 horas c/u; humedad relativa entre 65 y 70%; como material de cama se utilizó viruta de madera libre de elementos extraños. Los ratones se alimentaron con concentrado de soya, teniendo en cuenta los requerimientos nutricionales y con agua acidulada *ad libitum* (Tobón 1998; Mrad 2006; Cardoso *et al.* 2007; Concepción *et al.* 2007).

Evaluación del perfil neurofarmacológico del aceite de U. dermestoides

1. *Test de Irwin preliminar.* Es una prueba preliminar que consiste en hacer un estudio cualitativo observacional con enfoque

hermenéutico, para identificar efecto depresor o estimulante del aceite de *U. dermestoides* (0,60mg/Kg, vo) en el SNC de ratones albinos. La prueba se realizó por medio de la observación del comportamiento general del animal de experimentación comparado con el efecto del patrón estimulante Anfetamina (25mg/Kg, ip), del patrón depresor Diazepam (25 mg/Kg, ip) y del efecto del control solución salina (0,9%, ip).

2. *Test de Irwin prueba de validación.* Confirma el efecto depresor que se presenta en la prueba preliminar con el aceite de *U. dermestoides* (3mg/Kg, vo). Este efecto depresor se comparó con el patrón Difenhidramina (37,50mg/Kg, vo) de menor potencia depresora que el Diazepam, con leche (62,5 mg/Kg, vo) vehículo del aceite y el control solución salina (0,9%, vo).

3. *Pruebas neurofarmacológicas específicas de validación:* Se realizaron cuatro experimentos: Memoria, Aprendizaje y Discriminación; Actividad Motriz Exploratoria; Actividad Motriz Espontánea y Neurosis Experimental. Estos experimentos se llevaron a cabo en un acercamiento a las investigaciones de Turner (1965) y Lipman (1978).

Los ensayos de los tests de Irwin, preliminar y confirmatorio, son una prueba cualitativa de observación mediante la cual se estima con destreza y cuidado el efecto de los tratamientos en el comportamiento general del animal. Los ensayos se dividieron en tres categorías básicas: la observación del comportamiento, los efectos neurológicos y los efectos sobre el sistema nervioso autónomo del aceite, comparado con el efecto de los otros tres tratamientos.

La evaluación del efecto depresor o estimulante, se realizó partiendo del criterio farmacológico del “Todo o Nada”, es decir: “prueba positiva” (si afecta el estado de alerta, el estado de ánimo, la postura corporal, la actividad motora, el tono muscular y los reflejos; si produce excitación del SNC incoordinación motora; aumenta o disminuye la micción y la defecación), o “prueba negativa” (no afecta el comportamiento, no tiene efectos neurológicos ni efectos sobre el sistema nervioso autónomo).

La “prueba positiva”, se interpreta como aquel efecto preestablecido que se manifiesta en términos de: presencia del efecto (+), efecto aumentado (++) o ausencia del efecto (-). Al administrar el aceite de *U. dermestoides* (3mg/Kg, vo), comparándolo con el patrón Difenhidramina (37,50mg/Kg, vo); leche (62,5mg/Kg, vo) vehículo del aceite y el control solución salina (0,9%, vo).

El efecto se valora mediante una escala de valores entre 0 y 8, bajo los siguientes criterios: respuesta normal (4), estimulación (5-8), depresión (3-1) y ausencia de respuesta (0), siguiendo los criterios experimentales y del efecto farmacológico (Tobón 1998; Rang *et al.* 2004).

Actividad Motriz Exploratoria: en este ensayo evalúa la actividad locomotora mediante el registro del número de exploraciones realizadas por el animal (introducción de la cabeza en los agujeros hasta, por lo menos, el nivel de las orejas) en un dispositivo con el suelo agujereado, durante 5min (Nakama 1972; Meneses *et al.* 1990; Ariza *et al.* 2007).

Actividad Motriz Espontánea: La prueba determina la longitud (cm) de los movimientos del ratón en su desplazamiento habitual durante dos min ($F=1,19$; $gl=4$; $p \leq 0,05$), utilizando un actógrafo con unos sensores en el piso del dispositivo, el cual registra y mide la longitud del desplazamiento de los animales (Nakama 1972; Meneses *et al.* 1990). El análisis estadístico de los datos de este ensayo permite rechazar la hipótesis H_0 , el análisis define que existe diferencia en el efecto

Tabla 1. Prueba de Irwin preliminar al aceite de *U. dermestoides* en diferentes concentraciones en mg por kg de peso en *Mus musculus* albinos durante seis horas.

Concentración	100	200	400	800	1.600	3.200
Efectos observados						
Somnolencia	+	+	+	+	++	++
Pasividad	+	+	++	++	++	++
Autoacicalación	-	-	-	+	+	+
Vocalización	-	-	+	-	-	-
Relajación	+	+	+	+	+	+

+: Presencia del efecto. ++: Efecto aumentado. -: Ausencia del efecto.

depresor sobre el SNC producido por los cuatro tratamientos. La figura 3 muestra que el aceite de *U. dermestoides* (3mg/Kg, vo), causa un efecto depresor en esta función del SNC de los ratones, semejante al efecto producido por el patrón depresor, la Difenhidramina (37,50mg/Kg, vo).

Neurosis experimental. Este ensayo mide el grado de ansiedad de los animales; para lo cual se priva de agua durante 48 horas a los biomodelos experimentales antes del ensayo, con el fin de generarles ansiedad. La prueba evalúa la respuesta del comportamiento reprimido mediante electrodos conectados al tetero del animal y se precisa el promedio de descarga eléctrica de 50 miliamperios durante 30 segundos que soportaba el animal ($F=3,24$; $gl=4$; $p\leq 0,05$). Para esta prueba, se tuvo en cuenta que la corriente eléctrica aplicada al animal, alcanzará el umbral de respuesta, sin causarle excesivo temor. Si bien causa cierto malestar al animal, esta descarga eléctrica es mínima y la molestia es leve; por lo que este tratamiento se justifica por los posibles beneficios que esta investigación puede aportar en la construcción del conocimiento en este campo, una necesidad poco explorada en Colombia.

Criterios de experimentación. La dosificación de los tratamientos se determinó de acuerdo al peso del animal. La administración por vía oral a los ratones albinos ICR, se hizo mediante una sonda metálica, teniendo en cuenta no ocasionarles malestar. El aceite de *U. dermestoides* se incorporó en leche hasta que se disolviera, a una temperatura aproximada a la temperatura corporal del ratón de 36,9 a 37,9°C; semejante a la forma como utilizan el *U. dermestoides* las personas del común, para tratar los síntomas del asma en la cotidianidad.

Los ensayos específicos evaluaron el efecto depresor del aceite de *U. dermestoides* (3mg/Kg, vo), comparándolo con el patrón Difenhidramina (37,50mg/Kg, vo); leche (62,5mg/Kg, vo) vehículo del aceite y el control solución salina (0,9%, vo). La evaluación se realizó por triplicado a los 30, 60, 120, 240 y 360 minutos, entre las 6H y las 14H, teniendo en cuenta el tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de los medicamentos utilizados (Rang *et al.* 2004; Alcaraz 2005).

Se empleó el diseño de bloques completamente aleatorizados en cada una de las pruebas neurofarmacológicas para confirmar el efecto depresor del aceite del coleóptero en el SNC de ratones albinos ICR. El nivel de significancia fue de 0,05 en la prueba de análisis de varianza simple (ANOVA), seguido de un análisis de comparaciones múltiples (Tukey) (Wayne 1995; Díaz 1999). Se utilizaron los programas Excel® y SPSS® para el procesamiento de los datos.

Resultados y Discusión

La evaluación preliminar del efecto del aceite en la conducta y en el sistema autónomo de los ratones albinos, mediante el Test de Irwin, se realizó en términos de la discriminación de presencia del efecto neurofarmacológico depresor o estimulante (+) y aumento del efecto (++). Los efectos más relevantes que presentaron los animales en esta prueba preliminar fueron somnolencia y pasividad (++); mientras que la relajación y la autoacicalación se presentan (+) a través del tiempo del experimento; comparándolo con el efecto depresor del patrón Diazepam y el efecto estimulante de la Anfetamina en el SNC. Estos hallazgos preliminares dan lugar a afirmar que el aceite de *U. dermestoides* (3mg/Kg, vo) tiene un efecto depresor moderado en el SNC en una relación directa y dependiente de la dosificación; el cual después de media hora de administrado comenzaba a disminuir y los animales recuperaron su comportamiento normal a las seis horas de iniciado el ensayo (Tabla 1).

El efecto neurofarmacológico más notorio causado por aceite de *U. dermestoides* (3mg/Kg, vo) fue la depresión, demostrada como pasividad. Este efecto depresor se confirma mediante otro Test de Irwin, comparando dicho efecto con el patrón depresor del SNC Difenhidramina (37,50mg/Kg, vo), cuya prueba muestra disminución de la alerta y de la reactividad, además de la presencia y el aumento de la pasividad a través del tiempo del experimento (Tabla 2).

Las dos pruebas del Test de Irwin sugieren que el aceite de *U. dermestoides* produce un efecto depresor leve sobre el

Tabla 2. Prueba de Irwin confirmatoria. Promedio de los valores del efecto neurofarmacológico del aceite de *U. dermestoides* en *Mus musculus* albinos comparados con Difenhidramina durante 360 minutos.

Tratamiento	Aceite de <i>U. dermestoides</i>					Difenhidramina (patrón)				
	30	60	120	240	360	30	60	120	240	360
Alerta (4)	3,0	2,7	2,7	3,3	4,0	4,0	40,0	3,70	3,70	4,0
Pasividad (0)	0,7	1,3	2,0	2,0	2,3	0,0	0,0	0,33	0,33	0,0
Reactividad (4)	3,0	2,7	2,7	3,3	4,0	4,0	4,0	3,70	3,70	4,0

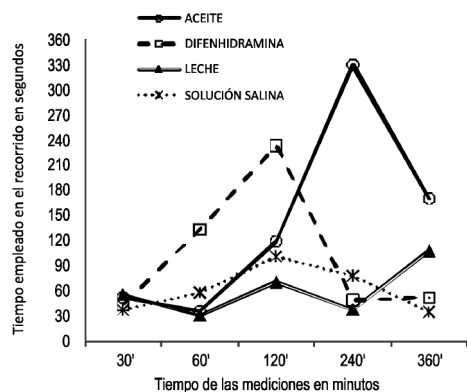


Figura 1. Comparación del efecto del aceite de *U. dermestoides* (3 mg/Kg, vo) y la Difenhidramina (37,5mg/Kg, vo) en la Memoria el Aprendizaje, y la Discriminación sobre ratones albinos durante 360 minutos.

SNC de los ratones albinos, el cual desaparece después de seis horas de administrado en una relación directa y dependiente de la dosificación en los signos observados respecto al comportamiento, en los efectos neurológicos y en los efectos en el sistema nervioso autónomo, tales como el estado de alerta (atento, ubicación visual, pasividad); el estado de ánimo (autoacicalación, intranquilidad, irritabilidad, temor), la actividad motora (reactividad, actividad motora espontánea, respuesta al dolor); la postura corporal y de extremidades, la incoordinación motora (marcha vacilante, marcha normal, reflejo de posición) y el tono muscular (de extremidades, fuerza prensil, encorvadura corporal, tono corporal, tono abdominal); comparados con el efecto producido por la Difenhidramina. Dichos ensayos de Irwin están en coherencia con ensayos reportados por (Turner 1965; Nakama 1972; Lipman 1978; Meneses *et al.* 1990).

Pruebas neurofarmacológicas confirmatorias del efecto depresor del aceite de *U. dermestoides*

La determinación del perfil de actividad en el SNC del aceite, se realizó por medio de pruebas orientadas a valorar las siguientes funciones del cerebro:

Memoria, Aprendizaje y Discriminación: El animal se entrena previamente y se somete a un ayuno de alimentos sólido durante 24 horas, con el fin de que se estimule durante el experimento a buscar el alimento colocado al final de una ruta establecida como un premio (Velasco y González 1981;

Poldinger 1984; Meneses *et al.* 1990). Se evaluó el tiempo que tarda el animal en atravesar el recorrido trazado en el equipo (laberinto múltiple) hasta llegar al alimento. El aceite origina una notable disminución en estas funciones del SNC (Fig. 1), comparado con el efecto depresor de la Difenhidramina ($F=1,30$; $gl=4$; $p\leq 0,05$). El análisis estadístico de los promedios de los datos obtenidos durante esta prueba, revela que el aceite de *U. dermestoides* produce una notable disminución en estas funciones del cerebro de los animales.

Actividad Motriz Exploratoria: La evaluación de este efecto farmacológico muestra que el aceite de *U. dermestoides* produce un efecto depresor moderado ($F=11,09$; $gl=4$; $p\leq 0,0001$) y que existe diferencia en el efecto depresor en el SNC por lo menos entre dos tratamientos. Comparado con el efecto depresor de la Difenhidramina (37,50mg/Kg, vo) en el SNC, el aceite de *U. dermestoides* (3mg/Kg, vo), genera una disminución en el número de exploraciones del ratón, lo que sugiere un estado de depresión. En este sentido, esta prueba confirma un efecto depresor moderado del aceite de *U. dermestoides* en esta función del SNC (Fig. 2).

Actividad Motriz Espontánea: El análisis estadístico de los datos de este ensayo permite rechazar la hipótesis H_0 , el análisis define que existe diferencia en el efecto depresor sobre el SNC producido por los cuatro tratamientos. El aceite de *U. dermestoides* (3mg/Kg, vo) causa un efecto depresor en esta función del SNC de los ratones, semejante al efecto producido por el patrón depresor, la Difenhidramina (37,50 mg/Kg, vo) (Fig. 3).

Neurosis Experimental. En este experimento, la ansiedad generada por la sed causa en el animal un conflicto entre si toma la decisión de calmar la sed, a pesar del malestar que le causa el tetero cuando intenta acercarse a él, o no calmar la sed (Vogel 1971; Nakama 1972; Meneses *et al.* 1990). El análisis estadístico indica que hay diferencias estadísticas en la respuesta. Comparado con el efecto depresor de la Difenhidramina (37,50mg/Kg, vo) en el SNC, el aceite de *U. dermestoides* (3mg/Kg, vo), inhibe la respuesta emocional del animal de experimentación, compatible con un efecto ansiolítico del aceite (Fig. 4). Esta prueba confirma que existe diferencia en el efecto depresor sobre el SNC producido por los cuatro tratamientos.

En aproximación a las opiniones de Tasaka (1986) y Rang *et al.* (2004), las pruebas desarrolladas durante esta investigación para evaluar el perfil neurofarmacológico del aceite de *U. dermestoides* comparado con los patrones depresores del

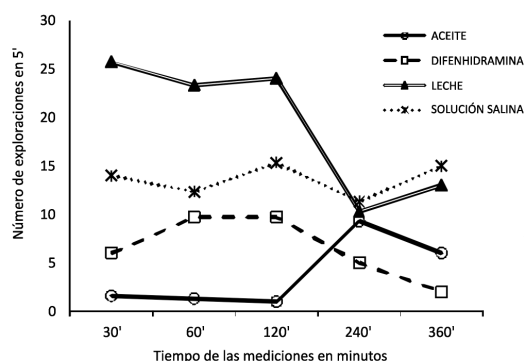


Figura 2. Comparación del efecto del aceite de *U. dermestoides* (3 mg/Kg, vo) y la Difenhidramina (37,5 mg/Kg, vo) en el número de exploraciones realizadas por los ratones albinos en un lapso de cinco minutos.

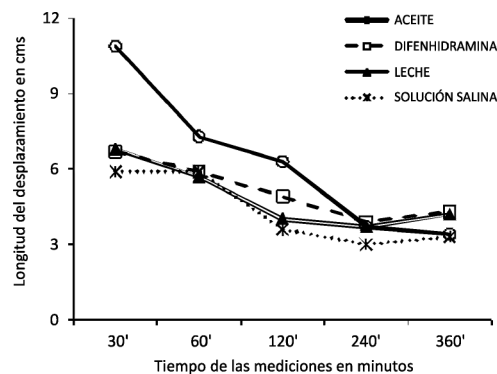


Figura 3. Comparación del efecto del aceite de *U. dermestoides* (3 mg/Kg, vo) y la Difenhidramina (37,5 mg/Kg, vo) en el desplazamiento habitual de los ratones albinos medido en cm.

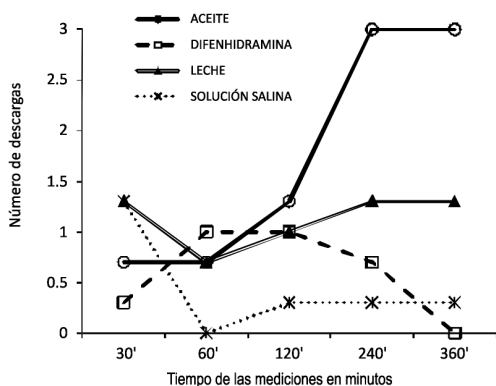


Figura 4. Comparación del efecto del aceite de *U.dermestoides* (3 mg/Kg, vo) y la Difenhidramina (37,5 mg/Kg, vo) en el comportamiento reprimido de ratones albinos por aplicación de 50 mA durante 30 seg.

SNC: Diazepam (medicamento ansiolítico) y Difenhidramina (medicamento antihistamínico, antagonista de los receptores H1 de Histamina), se puede deducir que los resultados presentaron cierta variabilidad biológica, debido probablemente a factores genéticos propios del animal de experimentación, a los factores ambientales y de sensibilidad de los animales y a la manipulación; variables que son dinámicas en el tiempo (Vogel 1971; Meneses *et al.* 1990; Tobón y Meneses 1991).

En general se determinó que en las condiciones de esta investigación, el aceite presenta un efecto depresor leve sobre el SNC y ciertos signos neurofarmacológicos compatibles con un efecto ansiolítico moderado en los biomodelos. Las pruebas neurofarmacológicas específicas al aceite, en especial el ensayo de la Neurosis Experimental, muestran un efecto ansiolítico moderado, probablemente por una acción farmacológica de tipo gabaérgico, como sucede con el patrón Diazepam (Rodgers y Dalvi 1997). Sin embargo, la literatura reporta más efectos empíricos en otros órganos y sistemas; por ejemplo, se vincula con la curación de indigestiones, afecciones cardíacas, mialgias, enfermedades renales, variedad de infecciones, asma y se ingiere vivo como afrodisíaco (Chua y Chandrepal 1978; Chu *et al.* 1997).

Agradecimientos

Al Laboratorio de Farmacología y a las estudiantes practican-tes en formación investigativa, Luz Mary Lopera B, Diana M. Márquez F., Erika Sofia Martínez Garcés y Elizabeth Pa-rody, hoy egresadas de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, quienes contribuyeron al de-sarrollo de esta investigación.

Literatura Citada

ALCARAZ, M.; FERRÁNDIZ, M.; PAYÁ, M. 2005. Histamina y fármacos antihistamínicos. *Farmacología de otros mediadores inflamatorios*. pp. 487-500. En: Lorenzo, P.; Moreno, A.; Leza, J.; Moro, M. Velásquez *Farmacología Básica y Clínica*. Editorial Médica Panamericana, S.A. Madrid. España. 1250 p.

ARIZA, S.; RUEDA, D.; RINCÓN, J.; LINARES, E. GUERRERO, M. 2007. Efectos farmacológicos sobre el Sistema Nervioso central inducidos por Cumarina, aislada de *Hygrophila tytha* LEONARD. *Revista Vitae* 14 (2): 51-58.

CARDOSO, C.; MRAD, A.; MARTÍNEZ, C.; RODRÍGUEZ, E.; LO-LAS, C. 2007. El animal como sujeto experimental. Aspectos técnicos y ética. 1ª ed. Universidad de Chile: Centro Interdisciplinario de Estudio en Bioética. 228p. En internet: <http://www.actabioethica.cl/docs/elanimal.pdf>. Consultado 19 de septiembre de 2011.

Colombia. Congreso de la República. Ley 84. Estatuto Nacional de Protección de los Animales, Capítulo VI: Del Uso de Animales Vivos en Experimentos e Investigación. Bogotá: El Congreso; 1989.

Colombia. Ministerio de la Protección Social. Resolución 8430 de 1993. Título V: La investigación Biomédica con Animales. Bogotá: El Ministerio; 1993.

CONCEPCIÓN, A.; DE LA PEÑA PINO, R.; GARCÍA, J. 2007. Acercamiento al accionar ético-moral del científico que trabaja con animales de Experimentación. *Acta Bioethica* 13 (1): 9-15.

CHU, G.; PALMIERI, J.; SULLIVAN, J. 1997. Beetle eating: A Malaysia folk medical practice and its public health implications. *Tropical Geography Medicine* 29(4): 422-427.

CHUA, T.; CHANDREPAL, W. 1978. The influence of restricted food on development of larvae and on the fecundity of *Palembus dermestoides* Fair (Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 14:2-3.

DÍAZ, A. 1999. Diseño estadístico de experimentos. Editora Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia. 347 p.

ECHEVERRI, F.; QUIÑONES, W. 1997. Tópicos en productos naturales: La biodiversidad como fuente de moléculas activas. Conferencias selectas del V Congreso Colombiano de Fitoquímica. Editora Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia. 490 p.

LARGO, R. 1987. Medicina natural, Aceites, jarabes y licores medicinales. Editora Edison S.A. Madrid. España. 387 p.

LI, G.; DUKE, C.; LECTURER, S.; ROUFOGALIS, B. 2003. The quality and safety of traditional Chinese medicines. *Australian Prescriber* 26(6):128-131.

LIPMAN, A. 1978. Multidimensional screening as a pharmacology laboratory experience. *American Journal of Pharmaceutical Education* 42(1): 223-227.

LONDOÑO, L. 1992. Ciclo biológico del *Palembus dermestoides* (Coleoptera Tenebrionidae), en condiciones de laboratorio. Tesis de Pregrado. Universidad de Antioquia, Departamento de Biología. Medellín, Colombia.

MENESES, B.; LUNA, F.; MALDONADO, C. 1990. Actividad neurofarmacológica del extracto de *Senecio vaccinioides*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* 18: 11-16.

MRAD DE OSORIO, A. 2006. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. *Alternativas y las 3 R de Russel*. *Revista Colombiana de Bioética* 1(1): 163-183.

NAKAMA, M. 1972. Effects of psychotropic drugs on emotional behavior. *Exploratory behavior of naive rats in holed open-field*. *Japanese Journal of Pharmacology* 22:767-775.

RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J.; MOORE, P. 2004. Antiinflamatorios e inmunodepresores. pp. 245-261. En: *Farmacología*. 5ta ed., Editora Elsevier S.A., Madrid. España. 797 p.

RODGERS, R. J.; DALVI A. 1997. Anxiety, defense and the elevated plus maze. *Neurosciences Biobehavioral Review* 21(6): 801-10.

SERAFIN, W.; BABE, K. 1996. Autacoides: farmacoterapia de la inflamación. pp. 619-728. En: Goodman y Gilman (eds). *Las bases Farmacológicas de la terapéutica*. 9ª ed. Volumen I. Editora Panamericana. México. 1015 p.

SMITH, A. 2002. It's natural so it must be safe. *Australian prescriber* 25(3): 50-51.

TASAKA, K. 1986. Antiallergic Drugs. *Drugs of today* 22: 101-133.

TOBÓN, F.; ROMÁN, M.; MOLINA, S.; BOTHERT, J. 2002. Determinación del perfil de ácidos grasos de la secreción de la glándula uropigial de la *Coturnix coturnix japonica* (codorniz doméstica). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 15 (2): 169-179.

TOBÓN, F. 1998. Principios básicos de la farmacología experimental; Procedimientos teóricos prácticos. Medellín: Fondo Editorial Co-operativo. Cooperativa de Profesores. Universidad de Antioquia. 129 p.

TURNER, R. 1965. Screening methods in pharmacology. Ed. Academic Press, New York. U.S.A. 312 p.

VOGEL, J. 1971. A simple and relievable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacology* 21: 1-7.

WAYNE, W. 1995. Bioestadística. 3ª ed., Editora Limusa S.A. México. 521 p.

Recibido: 21-ene-2011 • Aceptado: 8-nov-2011

Actividad de picadura de *Anopheles calderoni* (Diptera: Culicidae) en dos localidades del Valle del Cauca, Colombia

Biting activity of *Anopheles calderoni* (Diptera: Culicidae) in two localities of Valle del Cauca, Colombia

DIANA LUCUMI-ARAGÓN¹, RANULFO GONZÁLEZ O.² y CRISTHIAN SALAS-QUINCHUCUA³

Resumen: *Anopheles calderoni* ha sido recientemente registrado en Colombia y aparentemente muchos de los aspectos bionómicos de *An. punctimacula* corresponden a esta especie, esclarecer esta confusión es indispensable para desarrollar programas de prevención y control de vectores de malaria, por tal motivo, en este trabajo se evalúa su actividad de picadura en tres estaciones de dos localidades del Valle del Cauca: una en El Otoño (Candelaria) y dos en Laguna de Sonso (Buga); se realizaron 312h de colecta con cebo humano protegido, en periodos de 12h (18:00 a 06:00), colectando 5.831 especímenes, 334 en El Otoño, 864 y 4.633 en la estación uno y dos de la Laguna de Sonso respectivamente. El índice de picadura por humano por noche (IPHN) y por hora (IPHH), así como las horas de mayor actividad de picadura variaron entre las estaciones y sitios de muestreo, esto estuvo aparentemente relacionado con la proximidad de las estaciones de colecta a los criaderos o con la disponibilidad y productividad de criaderos locales. El IPHN varió de 26,5 a 78,5 ($\bar{x}=55,7$) en El Otoño, y entre 16,5 y 157,0 ($\bar{x}=65,8$) y 246,0 y 1265,5 ($\bar{x}=661,9$) en la estación uno y dos de la Laguna de Sonso respectivamente. En conclusión, en ambas localidades la especie presentó un comportamiento unimodal y bimodal dependiente de las densidades y muy heterogéneo entre las noches de muestreo, lo que sugiere una característica de plasticidad en su comportamiento hematofago.

Palabras claves: Control de Malaria. Peridomicilio. Extradomicilio. *Anopheles punctimacula*.

Abstract: *Anopheles calderoni* has been recently registered in Colombia and apparently many bionomic aspects of *An. punctimacula* correspond to this species, to clarify this confusion is essential to develop prevention and control programs of malaria vectors, for that reason this paper evaluates its biting activity at three stations in two localities of Valle del Cauca, one in El Otoño (Candelaria) and two in Laguna de Sonso (Buga), 312 collecting hours were carried out with protected human bait in periods of 12 hours (18:00 to 06:00), 5.831 specimens were collected, 334 at El Otoño, 864 and 4.633 at Laguna de Sonso stations respectively. The biting rate per human per night (IPHN), the biting rate per human per hour (IPHH) and peak hours of biting activity varied among stations and sampling sites apparently related to the proximity of sampling stations to the breeding sites or to the availability and productivity of local breeding sites. The IPHN ranged from 26.5 to 78.5 ($\bar{x}=55.7$) in El Otoño, and between 16.5 and 157.0 ($\bar{x}=65.8$) and between 246.0 and 1265.5 ($\bar{x}=661.9$) in the station one and two respectively. In conclusion, at both localities the species showed unimodal and bimodal behavior depending on the densities and being heterogeneous between nights, which suggest a plasticity feature on its hematophagous behavior.

Key words: Malaria control. Peridomicile. Extradomicile. *Anopheles punctimacula*.

Introducción

Un buen conocimiento de la bionomía de los vectores de malaria favorece una mejor programación de las actividades de prevención y control (Voorham 2002). Los patrones de actividad diaria de los mosquitos están regulados por un ritmo circadiano endógeno (Beck 1968), que puede estar influenciado por la luz, temperatura y humedad (Murillo *et al.* 1988). Este ritmo es especie-específico y puede ser explicado por la competencia que tienen varias especies de *Anopheles* presentes en un mismo hábitat por la explotación en diferentes tiempos de recursos alimenticios, sitios de reposo y criaderos (Solarte *et al.* 1996).

Como parte de una revisión sistemática de las especies de *Anopheles* (*Anopheles*) de la Serie Arribalzagia, realizada en los últimos 20 años, *An. punctimacula* Dyar y Knab. 1906 fue redescrita por Wilkerson (1990), y *An. malefactor* Dyar y Knab. 1907, elevada de sinónimo con la anterior, a especie válida. Posteriormente, a partir de ejemplares colectados en

Salitral, departamento de Piura, Perú, Wilkerson (1991) describió a *An. calderoni*, tanto en larvas como en adultos y consideró que su distribución estaba restringida a las tierras bajas del Perú, con elevaciones menores a 250 m.s.n.m sin embargo, en 1995 se reportó en Perú que el límite de dispersión más alto de esta especie era de 1.080 m.s.n.m y se incriminó como el segundo vector potencial de malaria, en especial a partir de 400 m de elevación (Calderón *et al.* 1995). Posteriormente, Rubio-Palis y Moreno (2003) la registraron para Venezuela, en posible simpatria con *An. punctimacula*. Recientemente González *et al.* (2010), a partir de análisis morfológico de progenies, especímenes de colección y secuencias de código de barras (subunidad I del gen de la citocromo oxidasa del ADN mitocondrial), comprobaron su presencia en varias localidades de Colombia y Ecuador, incluyendo localidades costeras y de alturas hasta de 1.113 metros de elevación. Antes de estas revisiones, en la Amazonía y Andes de Suramérica, *An. punctimacula* era reconocida entre los entomólogos como una especie involucrada en la transmisión de malaria

¹ Bióloga con énfasis en entomología, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Calle 13 # 100-00, Ed 320 Departamento de Biología. Grupo de Investigaciones Entomológicas (GIE). diana.lucumi@gmail.com. Autora para correspondencia. ² Ph.D. Ciencias biológicas, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Calle 13 # 100-00, Ed 320 Departamento de Biología. Grupo de Investigaciones Entomológicas (GIE). ranulfog@gmail.com. ³ Biólogo con énfasis en entomología, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Calle 13 # 100-00, Ed 320 Departamento de Biología. Grupo de Investigaciones Entomológicas (GIE). csalasq@gmail.com.

(Villalobos y Valderrama 1944; Levi-Castillo 1945; Deane *et al.* 1948; Levi-Castillo 1949; Lane 1953; SEM 1957; Forattini 1962; Gorham *et al.* 1973; Calderón *et al.* 1974; Cova-García y Sutil 1977 (Com. pers); Knight y Stone 1977).

Dada la confusión en la taxonomía de estas especies, posiblemente muchas de las características bionómicas, de distribución altitudinal, e incriminación vectorial asignadas en el pasado a *An. punctimacula* en Perú, Colombia, Ecuador y Venezuela, en realidad corresponden a *An. calderoni* y en algunas regiones a una mezcla entre ésta y las especies *An. guarao* Anduze y Capdevielle, 1949 *An. punctimacula* o *An. malefactor*. Según varios autores, *An. punctimacula* en Ecuador presenta un comportamiento zoonótico (Levi-Castillo 1945) y generalmente antroponóptico (Forattini 1962; Barreto 1971). En Colombia, a *Anopheles punctimacula* se le asigna una amplia distribución en el occidente y la cuenca del río Magdalena (Olano *et al.* 2001), y según Pinzón (1945) era la tercera especie de *Anopheles* más frecuentemente capturada en viviendas de Puerto Salgar (Cundinamarca) a 1.773m de elevación. Ese mismo año fue incriminada como vector de malaria en Itagüí (Antioquia) a una elevación de 1.540ms.n.m. (Rey *et al.* 1945).

Con base en la revisión de especímenes presentes en la colección del Museo de Entomología de la Universidad del Valle (MUSENUV), recolectados en el valle geográfico del Valle del Cauca, durante más de 15 años, y el trabajo reciente de González *et al.* (2010) se puede decir que la especie antes reconocida como *An. punctimacula* en esta región, corresponde a *An. calderoni*. Según lo anterior, posiblemente muchos de los comportamientos observados en *An. punctimacula* en varios países de Suramérica correspondan a *An. calderoni*, pero dado que no existe tal certeza, es necesario clarificarlo apoyados en los nuevos hallazgos taxonómicos.

En algunas regiones o localidades de Suramérica, parece ser que *An. calderoni* tiene actividad antroponóptica sobre todo en el ambiente peri y extradomiciliar. En Perú, según Calderon *et al.* (1995) es la segunda especie en abundancia e invasividad domiciliar y está comprometida en la transmisión de malaria. En su rango de distribución en Perú, (Cruz *et al.* 2004) han observado que *An. calderoni* es más frecuentemente exofágica que endofágica y en algunos casos, su actividad de picadura es mayor que la que se observa en *An. pseudopunctipennis* Theobald, 1901. Poco se conoce sobre los picos de actividad de esta especie, en algunas localidades de Perú, es unimodal y en presencia de densidades muy bajas, presenta su pico de mayor actividad entre las 23:00 y 24:00h en el intradomicilio y entre las 22:00 y 23:00h en el peridomicilio, pero cuando su densidad es mayor, se presenta entre las 23:00 y 24:00h tanto en el peri como en el intradomicilio (Cruz *et al.* 2004). Dado que estos datos corresponden a localidades del Perú, por debajo de los 300 m.s.n.m, a la amplia distribución en Colombia de esta especie (González *et al.* 2010) y que el comportamiento de picadura de una especie de *Anopheles* constituye una variable importante de su competencia vectorial, se evaluó esta actividad en peridomicilio y extradomicilio en dos localidades del Valle geográfico del Río Cauca, Colombia.

Materiales y Métodos

Área de estudio. La actividad de picadura peridomiciliar y extradomiciliar de *An. calderoni* se evaluó en dos localidades: El Otoño, municipio de Candelaria y Laguna de Sonso,

municipio de Buga ubicadas en el Valle geográfico del río Cauca, departamento del Valle del Cauca, Colombia. En la primera, la estación de muestreo se ubicó en la coordenada 3°24'24,7"N 76°19'10,7"W a una elevación de 1.005ms.n.m en el peridomicilio. En la segunda, se establecieron dos estaciones en la sede de la Corporación del Valle del Cauca (CVC). Laguna de Sonso, a una altitud promedio de 966 msnm: Estación uno en el peridomicilio de las edificaciones con coordenadas 3°52'32"N 76°20'53"W y la Estación dos ubicada en el extradomicilio aproximadamente a 800m de las edificaciones con coordenadas 3°52'34,0"N, 76°20'49,5"W (Fig. 1).

Recolección y determinación taxonómica. Las colectas se hicieron con cebo humano protegido entre mayo de 2008 y mayo de 2010, dos operarios por estación realizaron 12 colectas en periodos comprendidos entre las 18:00h y las 06:00h distribuidas así: tres en la localidad de El Otoño (dos en mayo y una en junio de 2008) y nueve en las dos estaciones de la CVC en la Laguna de Sonso (dos en noviembre de 2008, tres en mayo de 2009 y cuatro en mayo de 2010). En total se realizaron 312h de colecta. Para realizar los muestreos se usó un aspirador bucal siguiendo métodos estándares de colecta (WHO 1975). Los especímenes de cada hora de muestreo se colocaron en vasos de 250ml de capacidad y se almacenaron en un frigotermostato Coleman® de 40L, donde se transportaron hasta el Laboratorio de Investigaciones Entomológicas de la Universidad del Valle para su identificación y cuantificación.

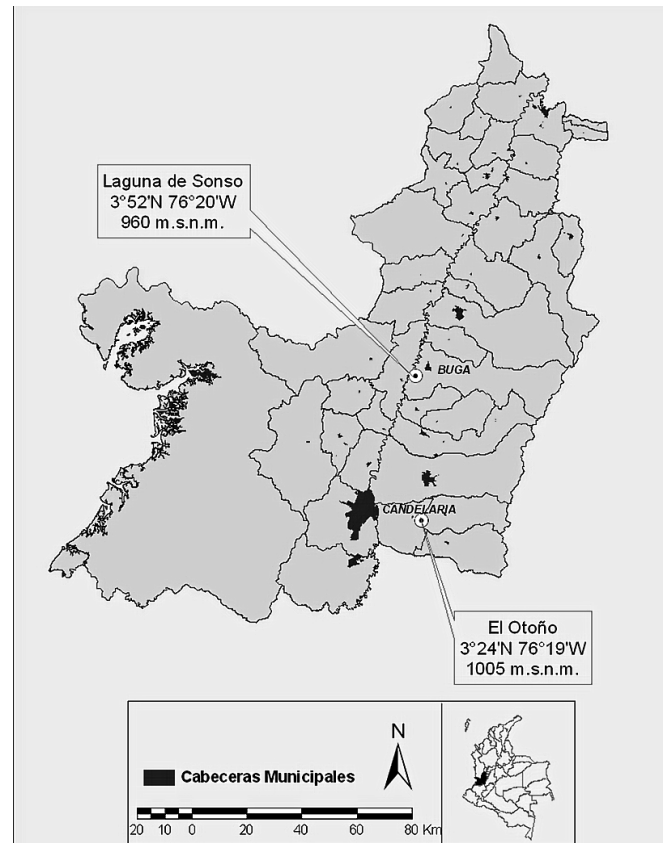


Figura 1. Ubicación geográfica de las dos localidades estudiadas en los municipios de Candelaria y Buga en el Valle del Cauca, Colombia.

Los ejemplares se sacrificaron en frío, se separaron y determinaron a especie, para esto último, se utilizó la clave de González y Carrejo (2009) así como mediante la confirmación de los caracteres diagnósticos de *An. calderoni* presentados en la descripción original (Wilkerson 1991). No se midió la actividad de otras especies presentes esporádicamente (*An. triannulatus* s.l. Neiva y Pinto 1922 y *An. albimanus* Wiedemann, 1820) Finalmente algunos ejemplares se montaron en alfileres entomológicos, se etiquetaron y depositaron en el Museo Entomológico de la Universidad del Valle (MUSE-NUV).

Análisis estadístico. Para cada fecha se cuantificó el número de mosquitos por hora, se promediaron los valores por noche para cada estación y este valor se transformó a porcentaje con respecto al total por jornada de colecta. También se calculó el Índice de Picadura por Hora por Humano (IPHH) y el Índice de Picadura por Humano por Noche (IPHN). Las variaciones promedio de los picos de actividad de picadura se analizaron y graficaron por separado para cada una de las localidades. Se consideró la coincidencia en el tiempo entre la actividad humana y la actividad de picadura de los anofelinos agrupando los datos con base en la contribución relativa de tres periodos funcionales: anochecer (18:00 a 21:00), noche (21:00 a 03:00) y amanecer (03:00 a 06:00).

Resultados y Discusión

Se recolectaron, picando o aterrizando sobre el cebo 5.831 especímenes de *An. calderoni*, 334 en la localidad de El Otoño y 5.497 en las dos estaciones de la Laguna de Sonso (Tabla 1). En esta última, el incremento en densidad se presentó en la estación 2 (4.632 especímenes), coincidiendo con una época de alta densidad de mosquitos.

Los criaderos más importantes de esta especie parecen estar más relacionados con los regímenes de lluvias, es decir sujetos a estacionalidad. Según Levi-Castillo (1945) *An. punctimacula* en Ecuador (posiblemente *An. calderoni*) se re-

Tabla 1. Índices de picadura por humano por noche (IPHN) y por humano por hora (IPHH) de *An. calderoni* en tres estaciones de dos localidades del departamento del Valle del Cauca, Colombia.

Localidad	Fecha	N /Noche	IPHN	IPHH
El Otoño (E1)	1	157,0	78,5	6,5
	2	53,0	26,5	2,2
	3	124,0	62,0	5,2
	Media		55,7	4,6
Laguna de Sonso (E1)	4	48,0	24,0	2,0
	5	33,0	16,5	1,4
	6	314,0	157,0	13,1
	7	221,0	110,5	9,2
	8	105,0	35,0	2,9
	9	143,0	71,5	6,0
	Media		65,8	5,5
Laguna de Sonso (E2)	10	492,0	246,0	20,5
	11	1.608,0	536,0	44,7
	12	2.533,0	1.266,5	105,5
	Media		661,9	55,2

Tabla 2. Precipitación durante los meses en los que se realizaron colectas de *An. calderoni* en las dos localidades de estudio, acumulado y promedio mensual de seis meses anteriores a los meses de los muestreo realizados (Cantidades dadas en mm). Fuentes: CENICANA (para El Otoño) y CVC (Para Laguna de Sonso).

Localidad	Mes de colecta	Precipitación (mm)		
		Mensual	Acumulada seis meses anteriores a los meses de colecta	Promedio mensual de seis meses anteriores a los meses de colecta
El Otoño	Mayo 2008	128,30	806,50	134,42
	Junio 2008	119,20	806,40	134,40
	Total	247,50	1.612,90	134,41
Laguna de Sonso	Noviembre 2008	67,00	604,00	100,67
	Mayo 2009	116,00	420,00	70,00
	Mayo 2010	107,00	523,00	87,17
	Total	290,00	1.547,00	85,94

produce durante los meses de Febrero a Junio en los charcos que están en proceso de secarse, cuando las lluvias dejan de ser torrenciales y en pantanos de agua dulce sombreados. Estos criaderos desaparecen durante el resto del año por lo que los adultos solo se pueden coleccionar ocasionalmente. En Perú, la reproducción de este mosquito está asociada con canales de irrigación y lagunas formadas por filtraciones de la irrigación de campos cultivados cerca del litoral (Cruz *et al.* 2004). En Colombia, según Olano *et al.* (2001) *An. punctimacula* (posiblemente *An. calderoni*) se suele reproducir en huecos y pisadas de animales con agua lluvia, pero durante una epidemia de malaria en La Tebaida (departamento del Quindío) también se observaron en tanques bajos a la intemperie y bebederos de animales. En el valle geográfico del río Cauca, las densidades poblacionales de *An. calderoni* fluctúan mucho, aparentemente sujetas al régimen de lluvias, como se observó en las estaciones de muestreo. En el Otoño y la Laguna de Sonso la precipitación total de los seis meses anteriores a los muestreos osciló entre 806,40 y 806,50 mm (CENICANA) y entre 420 y 1.547mm (CVC) respectivamente, pero con los registros más bajos para la Laguna de Sonso antes de los muestreos de mayo de 2009 y mayo de 2010 (Tabla 2), por eso, posiblemente la época en la cual se encontró la mayor densidad corresponde a los meses de mayo y junio. En una de las estaciones de la Laguna de Sonso se obtuvo la mayor emergencia de adultos, aparentemente las bajas precipitaciones en meses previos al muestreo (87,17mm) durante el verano, ocasionaron una disminución del nivel del agua en la laguna lo que afectó la disponibilidad de criaderos, pero con la llegada de las lluvias, a partir del mes de abril, recuperó una gran extensión de terreno, generando mayores posibilidades de reproducción de estos mosquitos. Sin embargo, para un mejor entendimiento de esta dinámica poblacional, es necesario la realización de un monitoreo mensual durante los diferentes meses del año y correlacionarlos con los diferentes parámetros ambientales.

En ambas localidades las densidades variaron considerablemente entre las noches de muestreo, en general, el IPHN fluctuó de baja a muy alta en la Laguna de Sonso y baja en la localidad de El Otoño. Considerando todas las noches de colecta, este índice varió de 26,5 a 78,5 ($\bar{X}$ =55,7) en El Otoño, 16,5 a 157,0 ($\bar{X}$ =65,8) en la Estación uno de la Laguna

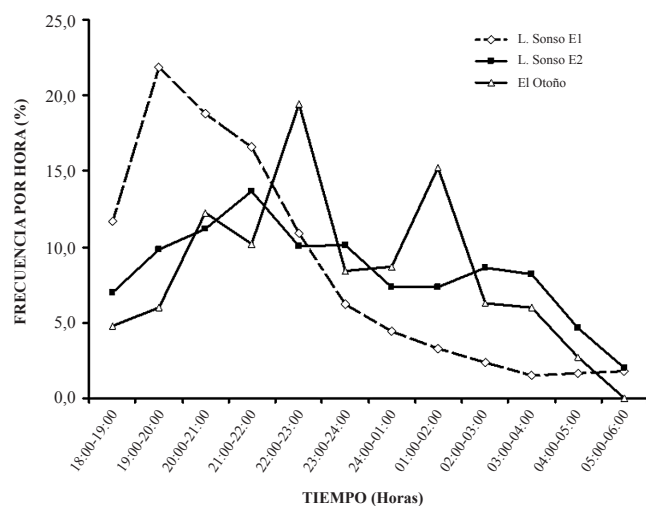
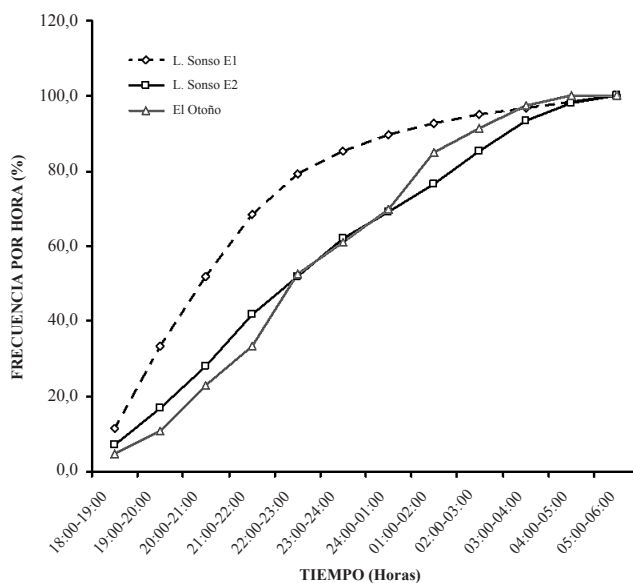
Tabla 3. Media y rango en la actividad horaria (IPHH) por fecha de *An. calderoni* en tres estaciones de dos localidades del departamento del Valle del Cauca, Colombia.

HORA	L. Sonso E1			L. Sonso E2			El Otoño		
	N total	IPHH		N Total	IPHH		N Total	IPHH	
		Media	Rango		Media	Rango		Media	Rango
18:00-19:00	100	9,2	1,5 - 19,5	324	46,3	10,0 - 113,5	16	2,7	0,0 - 7,0
19:00-20:00	187	12,2	3,0 - 27,5	457	65,3	21,0-142,0	20	3,3	2,0 - 7,0
20:00-21:00	161	12,4	3,5 - 29,5	518	74,0	42,5 -145,0	41	6,8	7,0 - 10,0
21:00-22:00	142	10,9	1,0 - 33,0	634	90,6	42,5 - 172,5	34	5,7	3,0 -11,5
22:00-23:00	93	7,2	1,7 - 20,0	466	66,6	30,5 - 110,5	65	10,8	2,5 - 20,0
23:00-24:00	53	4,1	1,0 - 10,5	467	66,7	14,5 - 131,0	28	4,7	2,0 - 7,5
24:00-01:00	38	2,9	0,0 - 6,5	341	48,7	12,0 - 102,0	29	4,8	1,0 -11,0
01:00-02:00	28	2,2	0,5 - 6,0	340	48,6	14,5 - 107,5	51	8,5	3,0 - 17,5
02:00-03:00	20	1,5	0,0 - 3,0	398	56,9	24,5 - 109,5	21	3,5	1,0 -12,0
03:00-04:00	13	1,0	0,0 - 2,5	379	54,1	19,0 -77,0	20	3,3	0,0 - 6,5
04:00-05:00	14	1,1	0,0 - 2,5	216	30,9	8,0 - 43,0	9	1,5	0,0 - 4,0
05:00-06:00	15	1,2	0,0 - 4,0	93	13,3	7,0 -17,7	0	0,0	0,0 - 0,0
TOTAL	864			4.633			334		
MEDIA		5,5			55,2			4,6	

de Sonso y entre 246,0 y 1265,5 ($\bar{X}=661,9$) en la Estación dos de la Laguna de Sonso. Estos resultados pudieron verse influenciados por la presencia de criaderos y condiciones ambientales que favorecen la emergencia de grandes cantidades de mosquitos en la Laguna de Sonso. Los criaderos de la localidad de El Otoño parecen ser fundamentalmente los canales de riego de grandes cultivos de caña y aguas encharcadas de terrenos con malezas.

La actividad horaria de *An. calderoni*, cuantificada como Índice de Picadura por Hora por Humano (IPHH) varió entre 2,2 y 6,5 ($\bar{X}=4,6$) en la localidad de El Otoño y entre 1,4 y 13,1 ($\bar{X}=5,5$) y entre 20,5 y 105,5 ($\bar{X}=55,2$) en las estaciones uno y dos de la Laguna de Sonso (Tabla 3). Los picos de mayor actividad de picadura fueron diferentes entre las localidades y estaciones de muestreo, independientemente de

la densidad de mosquitos en la Estación uno de la Laguna de Sonso, la actividad de picadura mostró una tendencia unimodal, con un pico de mayor actividad de picadura entre las 19:00 y las 20:00 h (Fig. 2; Tabla 3). En la localidad de El Otoño la mayor actividad de picadura parece depender de la densidad observada, cuando la densidad fue muy baja (26,5 mosquitos por humano por noche) se observó un comportamiento unimodal (19:00-22:00 h), pero en promedio y fundamentalmente cuando la tasa de picadura se presentó entre 62,0 y 78,5 mosquitos por humano por noche, se observó un comportamiento bimodal, con picos cerca de la media noche: el mayor, entre las 22:00 y las 23:00h y el menor entre las 01:00 y las 02:00h (Fig. 2). Este comportamiento coincidió

**Figura 2.** Variación en los picos de actividad hematofaga extradomiciliar/peridomiciliar de *An. calderoni* en tres estaciones de dos localidades del Valle del Cauca, Colombia (N=5.831 mosquitos).**Figura 3.** Porcentaje acumulado por hora por noche de *An. calderoni* colectados en el extradomicilio/peridomicilio en tres estaciones de dos localidades del Valle del Cauca, Colombia. (N = 5.831 mosquitos).

más con el de la Estación dos de la Laguna de Sonso donde se presentaron las densidades más altas de mosquitos, ya que los picos se registraron entre las 21:00-22:00h y entre las 02:00-04:00h (Fig. 2). Cruz *et al.* (2004) en Perú, también registró un comportamiento unimodal para la especie, pero con picos diferentes a los presentados en El Otoño y la Laguna de Sonso: en una de las localidades estudiadas en ese trabajo, ubicada a 110 m.s.n.m, el pico en el peridomicilio se presentó entre las 22:00 y 23:00h, mientras que en otra, ubicada a 40 m.s.n.m, el pico se presentó entre las 23:00 y las 24:00h, estas variaciones además de estar relacionadas con las diferencias en el ambiente pueden estar relacionadas con una característica de plasticidad fenotípica de la especie.

El porcentaje acumulado de mosquitos por hora refleja las diferencias entre las estaciones y localidades, por ejemplo, cuando ocurrió el pico de mayor actividad hasta las 20:00h en la Estación uno de la Laguna de Sonso, ya se había colectado cerca de un 33% de los mosquitos que picarían en la noche, mientras que en la Estación dos se colectó cerca del 17% y en la localidad de El Otoño solo un 10% (Fig 3). Lo mismo ocurrió hasta la media noche en la Estación uno donde cerca del 85% de los anofelinos habían picado mientras que en la Estación dos y el Otoño solo se había presentado un poco más del 60% de las picaduras.

Cuando se compararon las estaciones teniendo en cuenta la contribución relativa de los tres periodos funcionales se observaron variaciones con la estación de muestreo: en la Estación uno, se presentó un mayor porcentaje de contacto al anochecer (45%-60%) coincidiendo con el pico de mayor actividad (19:00 - 20:00 h) (Fig. 4B), mientras que en el

intervalo noche (21:00- 03:00h) varió entre 33% y 50% y en el amanecer, cuando las densidades fueron bajas (IPHN = 6,5 y 24,0), no se presentó actividad de picadura del mosquito. Pero cuando fueron mayores la actividad varió entre 5% y 7% (Fig. 4B). A diferencia de la anterior, en la Estación dos la actividad de picadura fue más heterogénea (Fig. 4A) y la mayor actividad correspondió al intervalo de la Noche (64% a 71%), al anochecer varió entre el 16% y el 34% y al amanecer se presentó poca actividad hematófaga (2% a 13%). Un comportamiento similar se observó en la estación de El Otoño pero con menor rango de variación entre fechas (Fig. 4C). En general, promediando todas las fechas para los tres periodos funcionales, se observó una actividad de picadura muy heterogénea (Fig. 4D) que parece coincidir con una característica de plasticidad del comportamiento hematófago de *An. calderoni* que puede presentarse en cualquiera de los tres periodos funcionales dependiendo de las densidades, las localidades y la época del año, incrementando la importancia en la incriminación vectorial de la especie. Los periodos de mayor actividad presentaron coincidencias con las actividades humanas de las zonas de muestreo, las cuales están relacionadas con las jornadas laborales de sus pobladores: en la Laguna de Sonso, la pesca es la actividad principal y según los habitantes de la zona ésta se realiza generalmente durante el anochecer y durante la noche, mientras en la vereda El Otoño, la principal fuente de ingreso está relacionada con el cultivo de la caña de azúcar, con jornadas laborales diurnas, por lo que durante el anochecer y noche la población usualmente se encuentra en sus domicilios. Estas coincidencias entre los picos de actividad y la actividad humana son importantes ya que se incrementa la probabilidad de contacto entre los pobladores de la Laguna de Sonso y *An. calderoni*, siendo este también un componente importante para su incriminación vectorial.

Estos hallazgos son importantes porque contribuyen a entender los diferentes componentes entomológicos que intervienen en la transmisión de malaria en Colombia y posiblemente algunos brotes de malaria atribuidos a *An. punctimacula* corresponden en realidad a *An. calderoni*. Considerando su amplia distribución en el país (González *et al.* 2010) y su incriminación como vector secundario en algunas regiones de su rango de distribución en Suramérica (Calderón *et al.* 1995), es importante llevar a cabo estudios adicionales en localidades con presencia de esta especie, para diferenciar su papel como transmisor de malaria de las otras especies relacionadas, especialmente de *An. punctimacula* (Brochero y Quiñones 2008).

En conclusión *An. calderoni* presenta una alta actividad hematófaga durante el anochecer y gran parte de la noche mostrando un descenso durante el amanecer. Los picos de mayor actividad de picadura de esta especie varían según la localidad de muestreo y aparentemente según su densidad. En ambas localidades se presenta un comportamiento unimodal y bimodal, pero el comportamiento bimodal, parece ser el más frecuente de observar, especialmente cuando se presenta una densidad mediana a alta.

Agradecimientos

A Claudia Ximena Restrepo por sus aportes en los inicios de este estudio a Karen Castaño por el alojamiento en el sitio de colecta, a la CVC y al administrador de la laguna de Sonso Carlos Restrepo por su hospitalidad y por facilitar

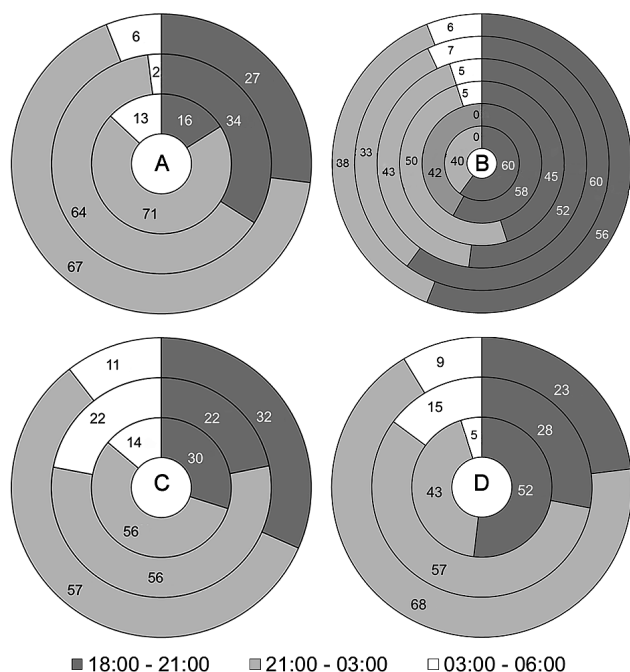


Figura 4. Porcentajes acumulados en tres periodos de la actividad de picadura extradomiciliar de *An. calderoni* en tres estaciones de dos localidades del Valle del Cauca, Colombia (N= 5.831 mosquitos). Cada anillo de A B y C corresponde a una fecha de colecta. **A.** El Otoño (Candelaria). **B.** Estación uno de la Laguna de Sonso (Buga). **C.** Estación dos de la Laguna de Sonso (Buga). **D.** Promedios de las tres estaciones (Anillo interno: Estación uno de la Laguna de Sonso. Anillo intermedio: Estación dos de la Laguna de Sonso. Anillo externo: El Otoño).

el acceso a la zona de muestreo, a Fabio Sarria, a Julián Mendivil y a Kelly Rubiano Cardona por su colaboración en el trabajo de campo, a Andrés Felipe Torres por su colaboración en la cartografía, a Carmen Elisa Poso y a Saúl Antonio Ramírez.

Literatura citada

- BARRETO, P. 1971. Distribución de mosquitos *Anopheles* en el departamento del Valle del Cauca. Acta Médica del Valle 2: 45-48.
- BECK, S. D. 1968. Insect photoperiodism. Academic Press, New-York. 288 p.
- BROCHERO, H. L.; QUIÑONES, M. L. 2008. Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: reflexión para el caso de malaria. Biomédica 28 (1): 18-24.
- CALDERÓN, G.; CURACA, A.; LLANCARI, J.; NAPÁN, M.; SIPÁN, F. 1974. Distribución geográfica de los vectores de malaria en el Perú. Revista Peruana de Medicina Tropical 2 (2): 88-91.
- CALDERÓN, G.; FERNÁNDEZ, R.; VALLE, J. 1995. Especies de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Perú. Revista Peruana de Epidemiología 8 (1): 5-23.
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR DE COLOMBIA (CENICANA) Boletines diarios de la Red Meteorológica Automatizada – RMA. En: http://www.cenicana.org/clima/_boletin_meteoro_diario.php.
- CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL VALLE DEL CAUCA (CVC). Dirección Técnica ambiental, COMUNICACIÓN PERSONAL Ramírez Saúl. COVA-GARCÍA, P.; SUTIL, E. 1977. Claves gráficas para la clasificación de los anofelinos de Venezuela. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Maracay, Aragua, Venezuela. 65 p.
- CRUZ, C.; VALLE, J.; RUIZ, A. 2004. Determinación de los hábitos de *An. pseudopunctipennis* y *An. calderoni* en dos localidades del valle de Chao. La Libertad, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública 21 (4): 223-230.
- DEANE, L. M.; CAUSEY, O. R.; DEANE, M. P. 1948. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. Revista do Serviço Especial de Saúde Pública 1 (4): 827-965.
- FORATTINI, O. P. 1962. Entomologia Medica. Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Universidade São Paulo. 662 p.
- GONZÁLEZ, R.; CARREJO, N.; WILKERSON, R. C.; ALARCON, J.; ALARCON-ORMASA, J.; RUIZ, F.; BHATIA, R.; LOAIZA, J.; LINTON, Y.-M. 2010. Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 105 (8): 1001-1009.
- GONZÁLEZ, R.; CARREJO, N. S. 2009. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia: Claves y notas de distribución. 2. Programa Editorial Universidad del Valle, Cali, Colombia. 260 p.
- GORHAM, J. R.; STOJANOVICH, C. J.; SCOTT, H. G. 1973. Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de sudamerica occidental. Mosquito Systematics 5 (2): 97-156.
- KNIGHT, K. L.; STONE, A. 1977. A catalog of mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). 2. The Thomas Say Foundation, Entomological Society of America, Baltimore, Maryland. 611 p.
- LANE, J. 1953. Neotropical Culicidae. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 1548 p.
- LEVI-CASTILLO, R. 1949. Atlas de los anofelinos sudamericanos. Sociedad Filantrópica del Guayas, Guayaquil, Ecuador. 207 p.
- LEVI-CASTILLO, R. 1945. Los anofelinos de la República del Ecuador. Artes Gráficas Senefelder C. A. Ltda, Guayaquil, Ecuador. 172 p.
- MURILLO, C.; ASTAIZA, R.; FAJARDO, P. 1988. Biología de *Anopheles (Kerteszia) neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la Costa Pacífica de Colombia: III. Medidas de luminosidad y el comportamiento de picadura. Revista de Saúde Pública 22 (2): 109-112.
- OLANO, V. A.; BROCHERO, H. L.; SÁENZ, R.; QUIÑONES, M. L.; MOLINA, J. A. 2001. Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. Biomédica 21 (4): 402-408.
- PINZON, L. A. 1945. Contribución al estudio de la malaria en Puerto Salgar. Tesis, Universidad Nacional, Facultad de Medicina. Bogotá, Colombia.
- REY, H.; SOTO, H.; HUFFAKER, C. 1945. *Anopheles punctimacula* D. & K. as the vector of Malaria in Medellín, Colombia, South America. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 25 (6): 501-505.
- RUBIO-PALIS, Y.; MORENO, J. 2003. Primer registro de *Anopheles (Anopheles) calderoni* (Diptera: Culicidae) en Venezuela. Entomotropical 18 (2): 159-161.
- SEM 1957. Plan para la erradicación de la malaria en Colombia. Volumen 2. Ministerio de Salud Pública y Oficina Sanitaria Panamericana. Bogotá, Colombia. 635 p.
- SOLARTE, Y.; HURTADO, C.; GONZÁLEZ, R.; ALEXANDER, B. 1996. Man-biting activity of *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* and *An. (Kerteszia) neivai* (Diptera: Culicidae) in the Pacific Lowlands of Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 91 (2): 141-146.
- VILLALOBOS, E.; VALDERRAMA, A. 1944. El *Anopheles punctimacula* en el Perú. Publicaciones de la Dirección General de Salubridad. Lima, Perú. 12 p.
- VOORHAM, J. 2002. Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera, Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. Revista de Saúde Pública. 36 (1): 75-80.
- WHO 1975. Manual on practical entomology in malaria, Part II: Methods and Techniques. Geneva. 191 p.
- WILKERSON, R. 1990. Redescriptions of *Anopheles punctimacula* and *An. malefactor* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 27 (2): 225-247.
- WILKERSON, R. 1991. *Anopheles (Anopheles) calderoni* n.sp., a malaria vector of the arribalzagia series from Peru (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics 23 (1): 25-38.

Recibido: 23-sep-2010 • Aceptado: 19-ago-2011

Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Actividad insecticida de tres especies de *Guatteria* (Annonaceae) contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

SULLAMY D. G. ACIOLE^{1,2}, CARLA F. PICCOLI², JONNY E. DUQUE L.^{2,3}, EMMANOEL V. COSTA⁴,
MARIO A. NAVARRO-SILVA², FRANCISCO A. MARQUES⁵, BEATRIZ H. L. N. SALES MAIA⁷,
MARIA LÚCIA B. PINHEIRO⁶, and MARIA T. REBELO¹

Abstract: The products of vegetal origin were assessed for bioactive substances to reduce reliance on organophosphate and pyrethroid insecticides, to which insect populations have become resistant. For this reason the aim of this study was to assess whether the essential oils of *Guatteria hispida*, *G. blepharophylla* and *G. friesiana* have insecticidal effect against *A. aegypti* under laboratory conditions. Essential oils were extracted through hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus and analyzed by Gas Chromatography (CG-FID), Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS), and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The bioassays were analyzed according to the *Probit* model. The GC-MS and NMR analyses confirmed that the leaves of *G. blepharophylla* have the caryophyllene oxide as their main component; in *G. friesiana* the α -, β - and γ -eudesmols prevail, and in *G. hispida* α - and β -pinene, and (*E*)-caryophyllene are the predominant compounds. The lethal concentrations LC₅₀, LC₉₅ and LC₉₉, were respectively 85.74, 199.35 and 282.76ppm for *G. hispida*; 58.72, 107.6 and 138.37ppm for *G. blepharophylla*; and 52.6, 94.37 and 120.22ppm for *G. friesiana*. The oil extracted from *G. friesiana* presented the best insecticidal effect.

Key words: Mosquito control. Dengue. Essential oils. Larvicides

Resumen: Se evalúan productos de origen vegetal en busca de sustancias bioactivas que tengan la capacidad de reducir la dependencia de insecticidas organofosforados y piretroides, a los que las poblaciones de insectos se han vuelto resistentes. Por esta razón el objetivo de este estudio fue evaluar si los aceites esenciales de *Guatteria hispida*, *G. blepharophylla* y *G. friesiana* presentan efecto insecticida contra *A. aegypti* bajo condiciones de laboratorio. Los aceites esenciales se extrajeron a través de hidrodestilación por medio de un aparato tipo Clevenger, analizados por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los bioensayos se analizaron de acuerdo con el modelo Probit. Los análisis de (CG-EM) y (RMN) confirmaron que las hojas de *G. blepharophylla* presentan óxido de cariofileno como el principal componente; en *G. friesiana* fue α -, β - y γ -eudesmol, y en *G. hispida* α - y β -pineno y (*E*)-cariofileno fueron los compuestos predominantes. Las concentraciones letales CL₅₀, CL₉₅ y CL₉₉ fueron respectivamente 85,74, 199,35 y 282,76ppm para *G. hispida*; 58,72, 107,6 y 138,37 ppm para *G. blepharophylla*; 52,6, 94,37 y 120,22ppm para *G. friesiana*. El aceite extraído de *G. friesiana* presentó el mejor efecto insecticida.

Palabras clave: Control de mosquitos. Dengue. Aceites esenciales. Larvicidas.

Introduction

Dengue cases and their clinical complications appear in countries of tropical and subtropical regions every year, with no promising prospects for future decrease of this problem (Guzmán *et al.* 2006). Unplanned urbanization, demographic and climatic changes in conjunction with the fast human migrations worldwide through air and land transport facilities are increasing the spread of the dengue arboviruses and its vector, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) to new places (Kroeger and Nathan 2007).

In the absence of a vaccine that confers permanent immunity to the four serotypes of the DENV1-4 dengue and

their genetic variations, vector control is used as the key measure to fight the disease (Hombach 2007; Periago and Guzmán 2007). However, even with the extensive accumulated knowledge over decades on this problem and knowing that so far that the only viable possibility is the direct vector control; this is not efficient since the epidemics in countries of tropical and subtropical regions continue occurring.

The dependence on synthetic organophosphorus (OP) and pyrethroid (P) insecticides to combat both immature and adult forms of the vector mosquito has been the most frequently adopted procedure for years, despite its little impact on the reduction of dengue cases. Unfortunately, such procedure has favored the outburst of *A. aegypti* populations

¹ Ph. D. y M. Sc. respectivamente. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016, Lisboa, Portugal / CESAM - Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal. ² M. Sc. y Ph. D respectivamente. Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária - Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil. ³ Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Metabólicas (GINEM) - Facultad de Salud, Departamento de Ciencias Básicas, oficina 205. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. Correo electrónico: jonedulu@uis.edu.co; mnavarro@ufpr.br; Autor para correspondencia. ⁴ Ph.D. Laboratório de Pesquisa em Química Orgânica de Sergipe (LABORGANICS), Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil. ⁵ Ph.D. Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, P.O. Box 19081, Curitiba, PR, Brazil. ⁶ Ph.D. Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, Coroado, 69077-000, Manaus, AM, Brazil. ⁷ Ph.D. Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, P.O. Box 19081, Curitiba, PR, Brazil.

that are insecticide tolerant at concentrations that otherwise would cause mortality to susceptible individuals (WHO 1992). This phenomenon has been reported in several regions such as: Venezuela (Mazzarri and Georgiou 1995), the Caribbean (Rawlins 1998), Singapore (Ping *et al.* 2001), Cuba (Rodríguez *et al.* 2002), Peru (Chávez *et al.* 2005), Thailand (Ponlawat *et al.* 2005), Argentina, Bolivia (Biber *et al.* 2006), México (Flores *et al.* 2006) and Brazil (Montella *et al.* 2007).

Botanical-origin products emerge as a promising alternative to control the vector of the dengue virus, after being set aside between the 30's and the 50's because the discovery of chemical synthetic insecticides (organochlorines, organophosphates, carbamates and pyrethroids). Besides have proven insecticidal effect, the plant-based products display a diversity of compounds with attractive, dislodging or repellent features that could be used in integrated pest management systems, as alternatives aimed at monitoring and control the mosquito populations (Isman 2006; Navarro-Silva *et al.* 2009).

The Annonaceae family comprises approximately 130 genera with 2.300 species of tropical and subtropical distribution (Kessler 1993). This group of plants has well known economic importance due to the trade of its fruits, byproducts, pharmacological activity, raw material for cosmetics, perfume industry, natural medicine and antimicrobial and insecticidal activity compounds (Costa *et al.* 2008, 2009; Boyom *et al.* 2003; Isman 2006). The genus *Guatteria* Ruiz & Pav, belongs to this family, with approximately 290 species distributed throughout Mesoamerica, the Caribbean and South America (Erkens and Maas 2008) with no study related to its insecticidal activity yet. The history of biological potential of the Annonaceae and its antimicrobial activity described in Costa *et al.* (2008), related with the chemical composition of essential oils of three species of the genus *Guatteria*, *Guatteria blepharophylla* (Mart.), *Guatteria friesiana* (W.A. Rodrigues) and *Guatteria hispida* (R.E. Fries) (Erkens and Maas 2008), raised the hypothesis of its insecticidal properties.

Research has been carried out to determine the potential efficacy of derivatives from plants in vector control programs. The environmentally safe and biodegradable botanical insecticides could be an alternative method of control, owing to the growing incidence of the insect resistance to synthetic insecticides. In view of the abovementioned and the records of the insecticide action of the Annonaceae Family and the antimicrobial activity of the genus *Guatteria*, the essential oils of these species were evaluated for their effect against *A. aegypti* larvae under laboratory conditions.

Materials and Methods

Sample Collection. With the purpose to observe some variance in the chemical constituents on the essential oils of the species of *Guatteria* (*G. blepharophylla*, *G. friesiana*, and *G. hispida*) the collection was made in the same months, as well as, of the same species used by Costa *et al.* (2008), but three years later. Leaves of *G. blepharophylla* were collected in January 2008, on the campus of the Federal University of Amazonas (UFAM); Leaves of *G. friesiana* were collected in January 2008, at the Experimental Farm of the Federal University of Amazonas (UFAM), and leaves of *G. hispida* were collected in July 2008, at the Adolpho Ducke Forest Reserve. Voucher specimens were deposited in the Herbarium of the

Department of Biology, UFAM, Manaus, AM, Brazil, under registration numbers 7340, 7341 and 7707, respectively. Leaves were obtained from flowered plants.

Extraction of essential oils. The leaves (250g) of the three *Guatteria* species were randomly collected dried at room temperature for three days, grounded and subjected to hydrodistillation for 4 hours, using a modified Clevenger-type apparatus. The oils were dried over anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4) and the percentage content was calculated based on the dry weight. The extraction was repeated three times.

Gas Chromatography (GC-FID) analysis. The GC analyses were carried out using a Shimadzu GC-17A fitted with a flame ionization detector (FID) and an electronic integrator. Separation of the compounds was achieved employing a ZB-5MS fused capillary column (30m x 0.25mm x 0.25µm film thickness) coated with 5%-phenyl-aryl-95%-methylpolysiloxane. Conditions of injection were performed according to Costa *et al.* (2008): injector temperature 240°C; oven temperature program of 60°C-300°C at a rate of 3°C/min; split 20:1 during 1.50 min, carrier gas He: 1 mL/min, constant flow; sample volume 0.5 µL.

Gas Chromatography - Mass Spectrometry GC-MS analysis. The GC-MS analyses were performed on a Shimadzu QP5050A GC/MS system equipped with an AOC-20i auto-injector. A J&W Scientific DB-5MS (coated with 5%-phenyl-95%-methylpolysiloxane) fused capillary column (30m x 0.25mm x 0.25µm film thickness) was used as the stationary phase. The conditions of injection were the same as described above and according to Costa *et al.* (2008). The mass spectrometer was operated at 70eV. The constituents of the essential oils were identified by comparison of their mass spectral pattern and retention indices (RI) with those given in the literature (Adams 2007). The retention indices (RI) were calculated according to Van Den Dool and Kratz (1963).

1D/2D ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance analysis (NMR). The crude essential oils of these species were analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of ^1H and ^{13}C 1D/2D. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were recorded in a Bruker Avance 400 spectrometer operating at 9.4 Tesla, observing ^1H at 400 MHz and ^{13}C at 100 MHz. Chloroform was used as the deuterated solvent. Chemical shifts values were given in parts per million (ppm) relative to the tetramethylsilane (TMS), used as internal reference standard (δ 0.00).

Determination of insecticidal activity. The larvae from the Rockefeller Colony - CDC (Center of Disease Control) were kept in plastic trays (35.5cm x 21.5cm x 6.5cm) containing 3.000mL of dechlorinated water under controlled temperature ($25^\circ\text{C} \pm 1$), humidity ($70\% \pm 10$) and photoperiod (12:12) conditions in a climatized chamber Model 347 CDG, at the Laboratory of Medical and Veterinary Entomology. Thus they remained there until reaching the stage of final 3rd instar and initial 4th instar, a change observed from the exuviate. The latter did not receive any food or chemical treatment.

After reaching the larval stage described above, the larvae were counted, separated and transferred with a Pasteur pipette to disposable plastic glasses with a 50mL capacity,

containing 20mL of the same dechlorinated water, in a total of 10 larvae per glass. Then, these larvae were exposed to different concentrations of essential oils from the *Guatteria* spp. (12, 15, 20, 35, 40, 50, 60, 65, 80, 85, 95 and 120 ppm). The amount of oil for each concentration was placed in plastic containers of 330mL capacity containing Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% (BIOTEC® brand, with 99% purity) and 80mL of mineral water, in a final volume of 100mL.

All the experiments were repeated four times, including a control treatment exclusively with DMSO and mineral water. Finally, seven concentrations were tested (12, 15, 20, 35, 40, 60 and 85ppm).

Mortality of the larvae exposed to the treatment was determined after 24 hours, considering mortality within a confidence interval of 95%. Larvae unable to reach water surface when touched were considered dead (WHO 1981a, 1981b). In parallel, the DMSO calibration was achieved in five concentrations between 1% and 5% to confirm that the 1% percentage used in the assays in fact did not cause mortality of the larvae. Data of the bioassay and solvent calibration were subjected to the *Probit* analysis (Finney 1971; Raymond 1985).

Results and Discussion

The yields of essential oils were 0.6% for *G. friesiana*, 0.5 for *G. hispida*, and 0.3 for *G. blepharophylla*. These results of the GC-FID and GC-MS analyses are similar to those obtained by Costa *et al.* (2008) (Table 1). The analyses of ^1H and ^{13}C 1D/2D NMR spectral data of the crude essential oils of *G. friesiana* and *G. blepharophylla*, along with the analysis of these crude essential oils by GC-FID and GC-MS (Table 1), confirm the results reported by Costa *et al.* (2008) that *G. friesiana* are dominated by α -eudesmol (15.1%), β -eudesmol (52.0%) and γ -eudesmol (24.0%) (Fig. 1A-C), respectively, while *G. blepharophylla* is dominated by caryophyllene oxide (70.0%) (Fig. 1D). From the actual ^1H and ^{13}C NMR spectral along with GC-FID and GC-MS (Table 1) analyses of the crude essential oil of *G. hispida*, the three major compounds, α -pinene (31.0%), β -pinene (36.0%) and (*E*)-caryophyllene (21.0) (Fig. 1E-G respectively), were confirmed after extensive analysis by Barero *et al.* (1995); Lee (2002); Hall *et al.* (2005), and suggested by the GC-MS performed by Costa *et al.* (2008). The ^1H and ^{13}C NMR data

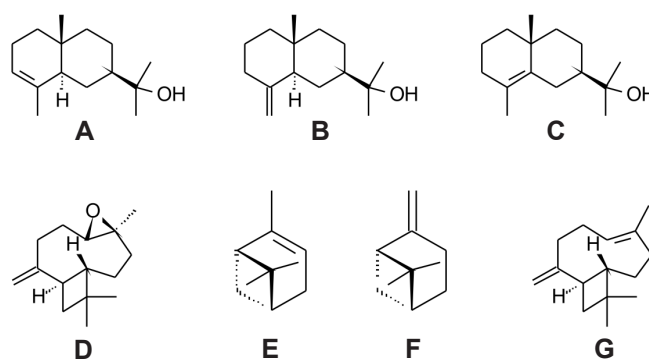


Figure 1. Major components identified in the essential oils of *Guatteria* leaves. A: α -eudesmol; B: β -eudesmol; C: γ -eudesmol; D: caryophyllene oxide; E: α -pinene; F: β -pinene; and G: (*E*)-caryophyllene.

obtained for compounds α -, β -, γ -eudesmols, caryophyllene oxide, α -, β -pinenes, and (*E*)-caryophyllene in the crude essential oils were in accordance with Barero *et al.* (1995); Lee (2002); Hall *et al.* (2005) and Costa *et al.* (2008).

Mortality tests with the *A. aegypti* larvae under laboratory conditions using essential oils of the three *Guatteria* species indicated a strong larvicida action, with the highest rates being recorded for $\text{LC}_{50/95}$ and $_{99}$ for *G. hispida*, and the lowest rates for *G. friesiana* (Table 2). By comparing the confidence intervals (CI) of each lethal concentration (LC) of the three species, it becomes evident that *G. hispida* is not in the same category as of the others. However, *G. blepharophylla* and *G. friesiana* were similar according to IC. The same behavior of insecticide action was observed in relation to the Angular Coefficient (AC) of concentrations and mortality response for the three species. Finally, all the experiments were significantly adjusted to the Probit ($p < 0.05$) model ($\chi^2 = 0.318$, 3.20 and 3.58, Table 2).

Considering the increase of *A. aegypti* insecticide-resistant populations, mosquito control requires candidates to replace organophosphates (OP) and pyrethroids (P) chemical pesticides with products of proven insecticide effectiveness while these are environmentally safe. New plant records with biological action emerge every day, standing as possible substitutes to be incorporated into the fight against Culicidae.

Table 1. Essential oil composition of *Guatteria* species.

Constituents	Leaf oil %				
	RI ^a	RI ^b	<i>Guatteria blepharophylla</i>	<i>Guatteria friesiana</i>	<i>Guatteria hispida</i>
α -Pinene (1E)	931	932			31.0
Camphene	944	946			0.4
β -Pinene (1F)	977	974			36.0
Myrcene	988	988			0.5
<i>p</i> -Cymene	1022	1020			0.1
Limonene	1028	1024			0.4
Citronellal	1150	1148	0.1		
α -Terpinen-4-ol	1172	1174			1.0
α -Terpineol	1188	1186			0.1
γ -Elemene	1333	1335	0.1		

(Continúa)

(Continuation Table 1).

Constituents	Leaf oil %				
	RI ^a	RI ^b	<i>Guatteria blepharophylla</i>	<i>Guatteria friesiana</i>	<i>Guatteria hispida</i>
Cyclosativene	1368	1369	0.1		
α -Ylangene	1373	1373	0.9		0.3
β -Bourbonene	1388	1387	0.2		
β -Elemene	1390	1389	1.2		
(<i>E</i>)-Caryophyllene (1G)	1419	1417	1.0		21.0
β -Ylangene	1420	1419	0.1		
α - <i>Trans</i> -bergamotene	1434	1432	0.3		0.1
Aromadendrene	1437	1439	0.1		
α -Humulene	1451	1452			0.7
(<i>E</i>)- β -Farnesene	1456	1454			0.5
<i>Trans</i> -cadin-1-(6),4-diene	1475	1475			0.2
γ -Gurjunene	1477	1475	0.2		0.6
γ -muurolene	1478	1478	0.2		
γ -curcumene	1482	1481	0.7		
γ -Himachalene	1483	1481			1.4
Germacrene D	1487	1484	0.1		
<i>epi</i> -Cubebol	1492	1493	0.1		
β -Selinene	1493	1489	0.4		0.8
Cuparene	1500	1504			
β -Bisabolene	1507	1505	0.3		
γ -Cadinene	1511	1513	0.2		
δ -Cadinene	1523	1522	1.1		1.2
<i>Trans</i> -cadin-1(2),4-diene	1530	1531c	0.4		
α -Calacorene	1540	1544	0.7		
Elemol	1551	1548		2.2	
<i>Trans</i> -cadinene-ether	1554	1557	2.0		
Germacrene B	1554	1559	0.3		
Spathulenol	1578	1577		2.5	
Caryophyllene oxide (1D)	1582	1582	70.0		3.0
β -Copaen-4- α -ol	1592	1590	0.7		
Humulene epoxide II	1609	1608	2.2		0.1
10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	1620	1622		1.3	
1- <i>epi</i> -Cubenol	1627	1627	0.3		
<i>Cis</i> -cadin-4-en-7-ol	1632	1635	1.6		
γ -Eudesmol (1C)	1632	1630		24.0	
Caryophylla-4(14),8(15)-dien-5-ol	1635	1636c	0.6		
Hinesol	1641	1640		0.9	
Cubenol	1643	1645	0.4		
β -Eudesmol (1B)	1652	1649		52.0	
α -Eudesmol (1A)	1656	1652		15.1	
14-hydroxy-9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-Caryophyllene	1670	1668	2.5		
Ishwarone	1679	1680	2.0		
14-oxy- α -muurolene	1770	1767	0.2		
Carissone	1926	1926		0.2	
Monoterpenes identified			0.1		68.4
Sesquiterpenes identified			91.2	98.2	31.0
Total identified			91.3	98.2	99.4

RI^a (calc.), retention indices on ZB-5MS column calculated according to Van Den Dool and Kratz (1963). RI^b retention indices according to Adams, 2007. ^cCosta *et al.* (2008).

Table 2. Values of lethal concentrations (LC) that cause mortality in 50, 95 and 99 % of the *A. aegypti* larvae and confidence intervals (IC)

Lethal concentrations	<i>Guatteria hispida</i>	<i>Guatteria blepharophylla</i>	<i>Guatteria friesiana</i>
LC ₅₀	85.74 ppm	58.72 ppm	52.60 ppm
IC	(74.05 – 112.78)	(55.08 – 62.81)	(50.11 – 55.17)
LC ₉₅	199.35 ppm	107.64 ppm	94.37 ppm
IC	(140.19 – 435.37)	(95.28 – 128.16)	(85.96 – 107.09)
LC ₉₉	282.76 ppm	138.37 ppm	120.22 ppm
IC	(108.92 – 769.05)	(117.98 – 174.53)	(106.09 – 142.82)
χ^2	0.318	3.20	3.58
Slope	4.48 ± 0.89	6.25 ± 0.62	6.48 ± 0.55

There was no mortality in the control groups. LC₅₀ lethal concentration that causes death in 50% of larvae exposed, LC₉₅ lethal concentration that caused the death of 90% and LC₉₉ lethal concentration that causes death in 99% of larvae exposed, slope ± standard deviation, χ^2 chi-square (Finney 1971).

The extraction yield of vegetable essential oils is a factor to consider in botanic products with biological action. When compared to the yield of oils extracted from other Annonaceae published in literature (Boyom *et al.* 2003), it becomes evident that the *Guatteria* species analyzed produced higher yields, especially considering that only 250g of leaves from each species were used for the entire extraction process. The type of compound and its chemical characteristics are fundamental factors to determine whether an extract or essential oil can act as an insecticide. According to Costa *et al.* (2008), the essential oils of the three *Guatteria* species are formed by mono and sesquiterpenes. According to NMR data the major compounds in *G. friesiana* are β -eudesmol, γ -eudesmol, and α -eudesmol (Fig. 1A-C respectively); in *G. blepharophylla*, caryophyllene oxide (Fig. 1D), and in *G. hispida* α -pinene, β -pinene, and (*E*)-caryophyllene (Fig. 1E-G respectively), agreeing with the results of Costa *et al.* (2008). Determining the relation between the insecticide activity and the chemical composition of the essential oils is a significant challenge, because the possibility of synergic activities is always present, which makes difficult to establish an efficient model for this purpose. However, contrasting analyses of oil composition, its major compounds and the abundance of its constituents are often carried out in an attempt to assign the mortality action observed.

The results achieved in this study lead to the hypothesis that sesquiterpene-rich essential oils can be considered more active in the control of *A. aegypti* in relation to those containing more monoterpenes. This conclusion becomes evident by comparing activity results of *G. friesiana*, *G. blepharophylla* against *G. hispida*. The first two are significantly richer in sesquiterpenes than the latter, which contains monoterpenes (Costa *et al.* 2008). The same pattern can be observed in the study developed by Santos *et al.* (2006) with *Cordia leucomalloides* (Jack) (LC₅₀=63.1 ppm) and *C. curassavica* (Jack) (Boraginaceae) (LC₅₀=97.7), active in the *A. aegypti* larvae control, the first species being both more active and richer in sesquiterpenes; however, these are less effective than the plants analyzed here. Similarly, Simas *et al.* (2004) indicate that the best insecticidal activity was detected for the isolated (*E*)-nerolidol (LC₅₀=17 ppm), sesquiterpenes of *Myroxylon balsamum* (L.) Harms (Fabaceae). Despite that its LCs is lower than that found in the present study, it reinforces the idea

that the sesquiterpenes are highly effective when compared with monoterpenes.

Although studies developed by Santos *et al.* (2006) and Simas *et al.* (2004) evidenced a stronger action of the sesquiterpenes, this pattern was not found in Costa *et al.* (2005) with oils of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae), *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) and *Syzigium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae), whose major compounds are the monoterpenes (1,8-cineol, timol and eugenol), presenting LCs₅₀ similar to these reported by Santos *et al.* (2006) and Simas *et al.* (2004) against *A. aegypti* larvae.

The comparison between LC₅₀ and LC₉₅ indicates that diterpenes could have an even more toxic effect than sesquiterpenes for this mosquito species, as shown with *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) for diterpenoid acid 1[(-)-3 β -acetoxylabdan-8(17)-13-dien-15-oic] (LC₅₀=0.8ppm and LC₉₅=8.2ppm) and acid 2{alepterolic [(-)-3 β -hydroxylabdan-8(17)-13-dien-15-oic]} (LC₅₀ = 87.3ppm and LC₉₅ =128.8ppm) (Geris *et al.* 2008). More interesting is the fact that tetranortriterpenoids (azadirachtin) have presented less effect than monoterpenes, sesquiterpenes and triterpene according to the LCs for *A. aegypti* (Wandscheer *et al.* 2004). By observing the results in Furtado *et al.* (2005) and Cavalcanti *et al.* (2004) (Table 3), only the essential oils of a few plants present the LCs with values close to the determined by *G. friesiana*, and *G. blepharophylla* which places the essential oils of these species among the most active against *A. aegypti* larvae. Finally, we recommend conducting studies to reveal the mechanisms of action of the major compounds of these oils in the mosquito.

Acknowledgments

The authors thank Rodrigo F. Chitolina for his help on the experimental work and also CNPq, CAPES FAPITEC/SE, and Fundação Araucária for financial support. J. E Duque thanks Prodoc/Capes for the postdoctoral fellowship in the period of 2008-2010. F.A. Marques and E. V. Costa thanks CNPq/INCT - Controle Biorracional de Insetos Pragas - Estudos Integrados, for financial aid.

Table 3. Comparison between lethal concentrations (LCs) of the essential oils from several plant species evaluated as larvicidal against *A. aegypti* with their major compounds, respectively.

Vegetal species	Chemical compound	LC ₅₀	LC ₉₀	LC ₉₅
<i>Vanillosmopsis arborea</i> Baker (Compositae) ^a	α -bisabolol	15.9 mg/mL	28.5 mg/mL	-
<i>Lippia sidoides</i> Cham (Verbenaceae) ^a	Timol	45.4 mg/mL	48.2 mg/mL	-
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt (Graminaceae) ^a	Citronelal	54.6 mg/mL	88.2 mg/mL	-
<i>Ageratum conyzoides</i> L (Asteraceae) ^a	Precocene	61.5 mg/mL	95.1 mg/mL	-
<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf (Graminaceae) ^a	Neral	63.8 mg/mL	112.2 mg/mL	-
<i>Ocimum basilicum purpurascens</i> Benth (Labiadae) ^a	Linalool	66.9 mg/mL	88.3 mg/mL	-
<i>Ocimum tenuiflorum</i> L (Labiadae) ^a	Eugenol	71.2 mg/mL	111.6 mg/mL	-
<i>Tagetes minuta</i> L (Asteraceae) ^a	Diidrotagetone	72.8 mg/mL	104.8 mg/mL	-
<i>Citrus limon</i> L (Rutaceae) ^a	Limonene	95.8 mg/mL	102.8 mg/mL	-
<i>Ocimum gratissimum</i> L (Labiadae) ^a	Eugenol	104.5 mg/mL	195.1 mg/mL	-
<i>Ocimum gratissimum</i> L (Labiadae) ^b	Eugenol	60 ppm	-	-
<i>Lippia sidoides</i> Cham (Verbenaceae) ^b	Timol	63 ppm	-	-
<i>Ocimum americanum</i> L (Labiadae) ^b	<i>E</i> -Methyl-Cinnamate	67 ppm	-	-
<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf (Gramineae) ^b	Geranial	69 ppm	-	-
<i>Hyptis suaveolens</i> Poit (Labiadae) ^b	1,8-Cineole	261 ppm	-	-
<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae) ^b	1,8-Cineole	313 ppm	-	-
<i>Syzygium jambolana</i> DC (Myrtaceae) ^b	Z-Ocimene	433 ppm	-	-
<i>Citrus limonia</i> Osbeck (Rutaceae) ^b	Limonene	519 ppm	-	-
<i>Citrus sinensis</i> Osbeck (Rutaceae) ^b	Limonene	538 ppm	-	-
<i>Guatteria hispida</i> (Fries) Erkens & Maas (Annonaceae) ^c	α - and β -pinenes and (<i>E</i>)-caryophyllene	85.7 ppm	-	199.3 ppm
<i>G. blepharophylla</i> (Mart) Mart (Annonaceae) ^c	Caryophyllene oxide	58.7 ppm	-	107.6 ppm
<i>G. friesiana</i> (Rodrigues) Erkens & Maas (Annonaceae) ^c	α -, β - and γ -eudesmols	52.6 ppm	-	120.2 ppm

^a Furtado *et al.*, (2005); ^b Cavalcanti *et al.*, (2004) and ^c our result; - Data are not comparable.

Cited literature

- ADAMS, R. P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th ed. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL.
- BARERO, A. F.; MOLINA, J.; OLTRA, J. E.; ALTAREJOS, J.; BARRAGÁN, A.; LARA, A.; SEGURA, M. 1995. Stereochemistry of 14-hydroxy- β -caryophyllene and related compounds. *Tetrahedron* 51 (13): 3813-3822.
- BIBER, P. A.; RONDAN, J. D.; LUDUEÑA, F. A.; GARDENAL, C. N.; ALMIRÓN, W. R. 2006. Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22 (3): 408-411.
- BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. 2003. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry* 64 (7): 1269-1275.
- CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M. M.; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E. W. P. 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (5): 541-544.
- CHÁVEZ, J. C. G.; ROLDÁN, J. R.; VARGA, F. V. 2005. Niveles de resistencia a dos insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del Perú. *Revista Colombiana de Entomología* 31 (1): 75-78.
- COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEONOR, L. L. 2009. Antimicrobial and antileishmanian activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Química Nova* 32 (1): 78-81.
- COSTA, E. V.; TEIXEIRA, S. D.; MARQUES, F. A.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; TRIGO, J. R.; MAIA, B. H. L. N. S. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteria* species. *Phytochemistry* 69 (9): 1895-1899.
- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacologia* 15 (4): 304-309.
- ERKENS, R. H. J.; MAAS, P. J. M. 2008. The *Guatteria* group disentagled: Sinking *Guatteriaopsis*, *Guatteriaella*, and *Heteropetalum* into *Guatteria*. *Rodriguésia* 59 (2): 401-406.
- FINNEY, D. J. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, 3rd Edition. 174 p.
- FLORES, A. E.; SALOMON, J. G.; FERNANDEZ, I. S.; PONCE, G. G.; LOAIZA, M. H. B.; LOZANDO, S.; BROGDON, W. B.; BLACK, W. C.; BEATY, B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22 (4): 672-677.

- FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; NETO, M. A.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. 2005. Atividade larvívica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology 34 (5): 843-847.
- GERIS, R.; SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A. G. 2008. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 50 (1): 25-28.
- GUZMÁN, M. G.; GARCIA, G.; KOURI, G. 2006. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. Revista Panamericana de Salud Pública 19 (3): 204-215.
- HALL, M. C.; KINNS, M.; WELLS, E. J. 2005. Revised assignment of the ¹³C NMR spectra of a- and b- pinenes. Organic Magnetic Resonance 21 (2): 108-110.
- HOMBACH, J. 2007. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. Revista Panamericana de Salud Pública 21 (4): 254-260.
- ISMÁN, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology 51: 45-46.
- KESSLER, P. J. A. 1993. Annonaceae. In: Kubitski, K., Rohwer, J. C. & Bittrich, V. (eds.). The families and genera of vascular plants II: Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. Springer-Verlag, Berlin, 93-129.
- KROEGER, A.; NATHAN, M. B. 2006. Dengue: setting the global research agenda. The Lancet 368: 2193-2195.
- LEE, S. G. 2002. a-Pinene and Myrtenol: Complete ¹H NMR assignment. Magnetic Resonance in Chemistry 40: 311-312.
- MAZZARRI, M. B.; GEORGHIU, G. P. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. Journal of the American Mosquito Control Association 11 (3): 315-322.
- MONTELLA, I. S.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; LIMA, J. B. P.; BRAGA, I. A.; VALLE, D. 2007. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77 (3): 467-477.
- NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE, J. E. L. 2009. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of culicidae. Revista Brasileira de Entomologia 53 (1): 1-6.
- PERIAGO, M. R.; GUZMÁN, M. G. 2007. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. Revista Panamericana de Salud Pública 21 (4): 187-191.
- PING, L. T.; YATIMAN, R.; GEK, L. S. 2001. Susceptibility of adult field strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore to pirimiphos-methyl and permethrin. Journal of the American Mosquito Control Association 17 (2): 144-146.
- PONLAWAT, A.; SCOTT, J. G.; HARRINGTON, L. C. 2005. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. Journal of Medical Entomology 42 (5): 821-825.
- RAWLINS, R. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Revista Panamericana de Salud Pública 4 (4): 243-251.
- RAYMOND, M. 1985. Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cahiers ORSTOM, série Entomologie Médicale et Parasitologie 22 (2): 117-121.
- RODRÍGUEZ, M.; BISSET, J.; RUIZ, M.; SOCA, A. 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. Journal of Medical Entomology 39(6): 882-888.
- SANTOS, R. P.; NUNES, E. P.; NACIMENTO, R. F.; SANTIAGO, G. M. P.; MENEZES, G. H. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. 2006. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. Journal of the Brazilian Chemical Society 17 (5): 1027-1030.
- SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; FILHO, A. M. O. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue- atividade larvívica de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. Química Nova. 27 (1): 46-49.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A. 1963 Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. Journal of Chromatography A 11: 463-471.
- WANDSCHEER, C. B.; DUQUE, J. E.; SILVA, M. A. N.; FUKUYAMA, Y.; WOHKE, J. L.; ADELMANN, J.; FONTANA, J. D. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. Toxicon 44: 829-835.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 1992. Vector Resistance to pesticides. Fifteenth Report of The WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. WHO Technical Report Series 818: 1-62.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 1981a. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva. 6 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 1981b. Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides. Geneva. 4 p.

Recibido: 23-mar-2011 • Aceptado: 31-oct-2011

Nota científica

Efectos ovicida y larvicida del spinosad en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Ovicidal and larvicidal effects of spinosad in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

ANA L. ARGUETA¹, JAVIER VALLE² y CARLOS F. MARINA³

Resumen: Se evaluaron los efectos ovicida y larvicida del spinosad (Tracer 480SC) en *Aedes aegypti* a concentraciones de 0,1, 5 y 10ppm, a diferentes tiempos de exposición en condiciones controladas de temperatura (25±1°C). En el primer experimento se observó un efecto ovicida bajo (promedio 6,6-8,2% de no eclosión y periodos de 12 a 96h de exposición) y en el segundo un efecto mediano (promedio 27,9-31,9% de no eclosión expuestos a spinosad de 1 a 12 semanas). La mortalidad de larvas se incrementó significativamente a mayor concentración de spinosad (100% a 10ppm a 6h) y a mayor tiempo de exposición (99,9% a 1ppm a 12h). Este bioinsecticida puede ser una buena herramienta para el control de inmaduros de insectos vectores como el mosquito *A. aegypti* por sus características insecticidas y el bajo impacto sobre organismos no blanco y la salud humana. Está claro que su potencial en el control de vectores reside en su efecto larvicida más que en su actividad ovicida.

Palabras clave: Control de vectores. Mortalidad. Toxicidad. Dengue.

Abstract: The ovicidal and larvicidal effects of spinosad were studied in *Aedes aegypti* treated with concentrations of 0.1, 5 y 10 ppm spinosad (Tracer 480SC) during different periods of exposure at a constant temperature of 25±1°C. In a first experiment the ovicidal effects were low (6.6-8.2% of non-eclosion averaged over 12-96h exposure periods), whereas in a second experiment ovicidal effects were moderate (27.9 - 31.9% of non-eclosion in eggs exposed to spinosad suspension of 1-12 weeks old). Mortality of larvae increased significantly with increasing concentration and increasing duration of exposure to this product. Although spinosad has clear applications as a mosquito control product for control of vectors such as *A. aegypti*, it is clear that its vector control potential resides in its larvicidal effects rather than its ovicidal activity.

Key words: Vector control. Mortality. Toxicity. Dengue.

Introducción

El mosquito *Aedes aegypti* (L., 1758) es considerado el principal vector del dengue en el continente Americano. Sin embargo, se sospecha que *A. albopictus* (Skuse, 1894) puede ser un vector secundario, aunque no ha sido involucrado de manera fehaciente en la transmisión de la enfermedad (San Martín *et al.* 2010). El principal método de control de estos vectores es a través de la aplicación de insecticidas químicos, principalmente organofosforados y piretroides de amplio espectro. Sin embargo, el uso excesivo de los insecticidas puede provocar daños a la salud de los seres humanos y al ambiente (Attaran *et al.* 2000; Walker 2000). Por otra parte, un número importante de especies vectores ha desarrollado resistencia hacia los insecticidas sintéticos (Sina y Aultman 2001), por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera necesario el desarrollo de métodos alternativos de control de estos insectos (WHO 1995).

El spinosad, es un bioinsecticida producto de la fermentación del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz y Yao, 1990). Este bioinsecticida ha demostrado ser altamente tóxico para larvas de *A. aegypti* y otros mosquitos en experimentos de laboratorio y campo (Hertlein *et al.* 2010). Sin embargo, los efectos ovicidas del spinosad no han sido determinados de manera clara (Romi *et al.* 2006; Pérez *et al.* 2007). Debido a esto, Hertlein *et al.* (2010) sugieren realizar nuevos estudios para corroborar la actividad ovicida del spinosad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar el efecto

ovicida y larvicida del spinosad en huevos de *A. aegypti* en varias concentraciones y tiempos de exposición a través de bioensayos en laboratorio.

Materiales y Métodos

Los huevos de *A. aegypti* se obtuvieron de una colonia aislada y establecida en 2006 en el Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) en Tapachula, Chiapas; México. Larvas de esta colonia registraron susceptibilidad de 100% en bioensayos realizados en el laboratorio acorde al protocolo estándar (WHO 2005). Por otra parte, otras cepas de *A. aegypti* originarias de Tapachula han registrado susceptibilidad a piretroides (Saavedra-Rodriguez *et al.* 2007). La edad máxima de los huevos en los experimentos fue de 15 días. Los huevos y las larvas se mantuvieron en condiciones controladas a una temperatura de 25±1°C. Las larvas se alimentaron con una dieta compuesta a base de proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y cenizas. La suspensión de spinosad que se utilizó fue una formulación comercial (Tracer 480SC), con ingrediente activo de 480g/L. Para el primer experimento lotes de 200 huevos de *A. aegypti* se expusieron en volúmenes de 100ml, a concentraciones de 0,1, 5 y 10 ppm de spinosad en vasos de plástico de 150ml, por tiempos de exposición de 12, 24, 48 y 96h. En los tiempos de exposición de 48 y 96h se realizaron observaciones cada 24h para registrar la eclosión de huevos y emergencia de larvas de aquellos que permanecían sin eclosionar durante las primeras 24 h de experimento.

¹ Licenciada Química Farmacobióloga. Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Químicas. Tapachula Chiapas 30700, México. ² M. Sc. ECOSUR. Tapachula Chiapas 30700, México. ³ Ph. D. Centro Regional de Investigación en Salud Pública - INSP, Tapachula Chiapas 30700, México. jmarina@insp.mx Autor para correspondencia.

tación. En el segundo experimento se prepararon las mismas concentraciones de spinosad, las cuales permanecieron en el laboratorio a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ desde el inicio hasta el final del experimento que constó de 12 semanas. Cada semana, lotes de 200 huevos de *A. aegypti* se expusieron por 24h a dichas concentraciones. Después del periodo de exposición, los huevos se sometieron a un lavado para eliminar los residuos de spinosad. Los lotes de huevos expuestos al spinosad se sumergieron por tres minutos en un recipiente conteniendo 100ml de agua. Este paso se realizó cuatro veces. Después, los lotes de huevos se pusieron a eclosionar en agua dechlorada por 48h. Luego se registró el número de huevos eclosionados. Las larvas que eclosionaron se criaron por 48h para registrar la sobrevivencia en cada tratamiento.

Se realizaron cuatro repeticiones de cada experimento. Los promedios de la proporción de huevos de mosquitos que no eclosionaron fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores. Uno de los factores fue la concentración del spinosad y el otro el tiempo de exposición de los huevos. Las comparaciones múltiples se hicieron a través de la prueba de Tukey. Debido a que en el primer experimento no hubo una interacción positiva entre las concentraciones y el tiempo, las comparaciones se hicieron con los promedios generales de los tratamientos. Para normalizar la distribución de los porcentajes de huevos no eclosionados, los datos fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. El número de larvas sobrevivientes fue analizado a través de un modelo de regresión logística tipo Probit con estructura de error binomial para verificar las diferencias estadísticas entre los diversos tratamientos. En este modelo una de las covariables fue el logaritmo de la concentración +1 y la otra fue el logaritmo del tiempo. Los datos influyentes fueron detectados mediante un análisis de residuales y excluidos de los análisis posteriores debido a que alteraban los supuestos de normalidad e igualdad de varianza. En el segundo experimento se excluyó una repetición de spinosad a 10ppm en la semana cinco que tuvo 79% de huevos no eclosionados y en la semana siete una repetición de la concentración a 1ppm y otra de 5ppm que tuvieron 66 y 54% de no eclosión respectivamente.

Resultados y Discusión

En el primer experimento hubo huevos no eclosionados en todos los tratamientos (Tabla 1). El promedio más bajo del porcentaje de huevos que no eclosionaron se registró en el control con 2,5% y fue significativamente menor a los promedios registrados en los tratamientos de spinosad (6,6–8,2%) ($F_{3;48}=4,36$; $P=0,007$). No se encontraron diferencias significativas al contrastar los tiempos de exposición ($F_{3;48}=0,76$;

$P=0,5$). Por otra parte, se observó que la mortalidad de larvas se incrementó significativamente a mayor concentración de spinosad ($\chi^2=10,294,5$; $gl=1$; $P<0,0001$). También se observó que a mayor tiempo de exposición la mortalidad de las larvas se incrementó significativamente ($\chi^2=2,063,5$; $gl=1$; $P<0,0001$).

En el segundo experimento se observaron proporciones de huevos no eclosionados más altos que en el primer experimento. Sin embargo, las proporciones de huevos no eclosionados fueron significativamente mayores en los tratamientos de spinosad comparados con el tratamiento control ($F_{3;141}=63,5$; $P<0,0001$). Asimismo, se observaron diferencias significativas en las proporciones de huevos no eclosionados con respecto al tiempo ($F_{11;141}=95,4$; $P<0,0001$). Estas diferencias se registraron entre la segunda y octava semana, y en la décima semana del experimento (Tabla 2). Por otra parte, la mortalidad de larvas *A. aegypti* fue del 100% en las tres concentraciones de spinosad durante las primeras semanas del experimento. Sin embargo, la mortalidad decreció a partir de la cuarta semana en el tratamiento spinosad a 1ppm y en la séptima a 5ppm, en tanto que a 10ppm la mortalidad se mantuvo a 100% durante todo el experimento ($\chi^2=124,8$; $gl=1$; $P<0,0001$). La mortalidad de las larvas en los tratamientos de spinosad fue significativamente dependiente de la concentración del bioinsecticida ($\chi^2=21,594,9$; $gl=1$; $P<0,0001$).

Los resultados de este estudio demuestran que el spinosad tiene un ligero efecto ovicida en *A. aegypti*. Sin embargo, difieren con los obtenidos por Romi *et al.* (2006) quienes observaron en colonias de mosquitos establecidas por más de 30 años que huevos de *A. aegypti* tratados con spinosad a 10 y 1ppm bajo condiciones controladas el 71,5 y 81,5% de los huevos respectivamente, no eclosionaron. Asimismo, observaron que el mayor porcentaje de huevos no eclosionados (85,0%) fue en el tratamiento de 50 ppm que representa una concentración extremadamente alta. También reportaron un 100% de efecto ovicida en huevos de *Anopheles stephensi* (Liston, 1901).

En contraste, Pérez *et al.* (2007) no observaron diferencias significativas en el porcentaje de eclosión de huevos de *A. aegypti* de la cepa Rockefeller expuestos en condiciones controladas a 5 y 20ppm de spinosad. Las diferencias encontradas en los resultados de estos estudios pueden ser debidas a varios factores. Es posible que las cepas de las cuales provienen estas poblaciones de mosquitos difieren en el grosor o consistencia de las capas de protección de los huevos como la cutícula serosa, el exocorión y el endocorión, las cuales les confieren diferente susceptibilidad. La cutícula serosa de huevos en *A. aegypti* está compuesta por quitina y está asociada con la resistencia a la desecación y su impermeabilidad puede impedir el paso del spinosad (Rezende *et al.* 2008).

Tabla 1. Porcentaje promedio de huevos de *A. aegypti* no eclosionados expuestos a concentraciones de spinosad a 1,5 y 10ppm a diferentes tiempos de exposición, bajo condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

	Tiempo (horas)				Promedio
	12	24	48	96	
Control	1,4 $\pm$ 1,0	2,1 $\pm$ 0,8	3,9 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 1,1	2,5 $\pm$ 0,5 ^b
Spinosad 1 ppm	6,1 $\pm$ 0,8	9,7 $\pm$ 3,2	6,0 $\pm$ 1,0	5,5 $\pm$ 0,6	6,8 $\pm$ 0,9 ^a
Spinosad 5 ppm	9,6 $\pm$ 2,5	7,4 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 1,6	4,6 $\pm$ 0,6	6,6 $\pm$ 0,8 ^a
Spinosad 10 ppm	6,7 $\pm$ 2,2	13,1 $\pm$ 4,6	7,4 $\pm$ 1,1	5,5 $\pm$ 2,3	8,2 $\pm$ 1,5 ^a

* Letras diferentes en la columna significan diferencias significativas según la prueba de ANOVA, ($F_{3;48}=4,36$; $P=0,007$), y comparación múltiple por prueba de Tukey $P=0,05$.

Tabla 2. Porcentaje promedio de huevos de *A. aegypti* no eclosionados expuestos a concentraciones de spinosad a 1,5 y 10ppm. Las concentraciones de spinosad después de preparadas permanecieron en condiciones controladas de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$). El periodo de exposición a spinosad fue de 24h.

Control	Tiempo (semanas)												Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	8,9 $\pm$ 0,5 ^a	4,0 $\pm$ 1,9 ^c	6,9 $\pm$ 1,5 ^c	8,4 $\pm$ 1,4 ^c	19,7 $\pm$ 1,4 ^b	0,2 $\pm$ 0,2 ^b	3,2 $\pm$ 0,3 ^c	8,1 $\pm$ 3,1 ^b	49,0 $\pm$ 1,7 ^a	43,4 $\pm$ 1,7 ^b	12,5 $\pm$ 0,6 ^a	11,0 $\pm$ 2,1 ^a	14,6 $\pm$ 2,2
Spinosad 1 ppm	9,6 $\pm$ 2,0 ^a	31,7 $\pm$ 4,4 ^{ab}	32,0 $\pm$ 6,7 ^b	27,5 $\pm$ 3,8 ^b	31,5 $\pm$ 9,9 ^a	3,5 $\pm$ 0,3 ^{ab}	7,5 $\pm$ 0,3 ^{bc}	24,1 $\pm$ 2,7 ^a	50,1 $\pm$ 5,0 ^a	86,1 $\pm$ 2,1 ^a	16,5 $\pm$ 3,2 ^a	9,6 $\pm$ 1,5 ^a	27,9 $\pm$ 3,4
Spinosad 5 ppm	9,9 $\pm$ 2,0 ^a	22,4 $\pm$ 4,2 ^b	23,2 $\pm$ 4,8 ^b	48,5 $\pm$ 4,9 ^a	28,6 $\pm$ 1,9 ^a	11,5 $\pm$ 4,5 ^a	13,2 $\pm$ 6,2 ^{ab}	25,7 $\pm$ 3,4 ^a	46,9 $\pm$ 4,5 ^a	80,5 $\pm$ 4,0 ^a	17,9 $\pm$ 2,4 ^a	17,0 $\pm$ 3,5 ^a	29,1 $\pm$ 3,1
Spinosad 10 ppm	4,9 $\pm$ 0,4 ^a	39,1 $\pm$ 4,2 ^a	51,1 $\pm$ 6,4 ^a	44,0 $\pm$ 7,9 ^a	33,3 $\pm$ 7,6 ^a	6,9 $\pm$ 2,2 ^a	20,9 $\pm$ 4,6 ^a	26,2 $\pm$ 4,8 ^a	49,0 $\pm$ 2,6 ^a	72,1 $\pm$ 1,5 ^a	19,1 $\pm$ 1,6 ^a	17,1 $\pm$ 1,8 ^a	31,9 $\pm$ 3,0

* Letras diferentes en las columnas de las semanas significan diferencias significativas según la prueba ANOVA ($F_{11, 141} = 95,4$; $P < 0,0001$) y Prueba de Tukey $P=0,05$.

Otra razón puede ser que haya habido algunas diferencias en las condiciones de exposición de los huevos en los experimentos ya que en este estudio los huevos fueron sumergidos en los tratamientos, y en los anteriores las hembras ovipositaron en ellos. Asimismo, la manera de evaluar la eclosión puede ser un factor en las diferencias ya que Romi *et al.* (2006) pusieron a secar las tiras de huevos por 24h después de la exposición, en tanto que Pérez *et al.* (2007) los pusieron a eclosionar de inmediato, y en este estudio se realizó una eliminación del exceso de spinosad y se pusieron a eclosionar. La razón de este procedimiento fue para tener un mejor control del tiempo de exposición al bioinsecticida y ha sido utilizado con los mismos propósitos para investigar los efectos subletales de un virus patógeno en larvas de *A. aegypti* (Marina *et al.* 2003). Por otra parte, se observó en el tratamiento control que del 1,4 a 3,9% en el primer experimento y del 0,2 a 49,0% de los huevos no eclosionaron en el segundo experimento. En tanto que Romi *et al.* (2006) reportaron que no eclosionaron los huevos en el tratamiento control del 14,0 al 22,0% y Pérez *et al.* (2007) del 51,3 al 60,5%. Esto puede ser debido características biológicas de la especie, a que no todos los huevos eclosionan al mismo tiempo, o a un factor desconocido.

Factores abióticos como temperatura, bajos o altos niveles de precipitación pueden influir en el retraso de la eclosión de los huevos de mosquitos como se observó en *A. triseriatus* (Say, 1823) (Khatchikian *et al.* 2010). Por otra parte, en *A. albopictus* se demostró que la edad de los huevos no influye en el retraso de la eclosión y que los embriones pueden ser capaces de detectar señales concernientes a la estabilidad o riesgo inherente en el hábitat y responder a través de su plasticidad fenotípica a ese potencial riesgo (Vitek y Livdahl 2009). Este estudio demuestra que el spinosad tiene bajo efecto ovicida. También corrobora los altos niveles de mortalidad en larvas de mosquitos observados en estudios anteriores. El spinosad tiene potencial para utilizarse en los programas de control de inmaduros de insectos vectores como el mosquito *A. aegypti* por sus características insecticidas y el bajo impacto sobre organismos no blanco y la salud humana (Bond *et al.* 2004, Hertlein *et al.* 2010, Marina *et al.* 2011). Los resultados de este estudio sirven para evidenciar que su potencial no reside en su efecto ovicida sino en su alta eficiencia larvicida.

Agradecimientos

Agradecemos a Antonio Morales responsable del insectario del CRISP por habernos proporcionado el material biológico; a Nelva Chirino por su apoyo en el laboratorio y a Trevor Williams por los comentarios al manuscrito. También agradecemos al COCYTECH por el apoyo financiero a través de la beca de Ana L. Argueta y al proyecto CHIS-2005-C03-011, otorgado a C. F. Marina.

Literatura citada

- ATTARAN, A.; ROBERTS, D.; CURTIS, C.; KILAMA, W. 2000. Balancing risks on the backs of the poor. *Nature Medicine* 6 (7): 729-731.
- BOND, J.; MARINA, C.; WILLIAMS T. 2004. The naturally-derived insecticide Spinosad is highly toxic to *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*. *Medical and Veterinary Entomology* 18 (1): 50-56.
- HERTLEIN, M.; MAVROTAS, C.; JOUSSEAU, C.; LYSANDROU, M.; THOMPSON, G.; JANY, W.; RITCHIE, S. 2010. A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 26 (1): 67-87.
- KHATCHIKIAN C.; DENNEHY, J.; VITEK, C.; LIVDAHL, T. 2010. Environmental effects on bet hedging in *Aedes* mosquito egg hatch. *Evolutionary Ecology* 24 (5): 1159-1169.
- MARINA, C.; BOND, J.; CASAS, M.; MUÑOZ, J.; OROZCO, A.; VALLE, J.; WILLIAMS, T. 2011. Spinosad as an effective larvicide for control of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, vectors of dengue in southern Mexico. *Pest Management Science* 67 (1): 114-121.
- MARINA C.; IBARRA, J.; ARREDONDO-JIMÉNEZ, J.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; LIEDO, P.; WILLIAMS, T. 2003. Adverse effects of covert iridovirus infection on life history and demographic parameters of *Aedes aegypti*. *Entomologia Experimentalis et applicata* 106 (1): 53-61.
- PÉREZ, C.; MARINA, C.; BOND, J.; ROJAS, J.; VALLE, J.; WILLIAMS, T. 2007. Spinosad, a naturally-derived insecticide, for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Efficacy, persistence and elicited oviposition response. *Journal of Medical Entomology* 44 (4): 631-638.
- REZENDE G.; MARTINS, A.; GENTILE, C.; FARMESI, L.; PELAJO-MACHADO, M.; PEIXOTO A.; VALLE, D. 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Developmental Biology* 8: 82.

- ROMI, R.; PROIETTI, S.; DI LUCA, M.; CRISTOFARO, M. 2006. Laboratory evaluation of the bioinsecticide spinosad for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22 (1): 93-96.
- SAAVEDRA-RODRIGUEZ K.; URDANETA-MARQUEZ, L.; RAJATILEKA, S.; MOULTON, M.; FLORES, A.; FERNANDEZ-SALAS, I.; BISSET, J.; RODRIGUEZ, M.; MCCALL, P.; DONNELLY, M.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; BLACK IV, W. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16 (6): 785-798.
- SAN MARTÍN J.; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; SOLÓRZANO, J.; BOUCKENOOGHE, A.; DAYAN, G.; GUZMÁN, M. 2010. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (1): 128-135.
- SINA, B.; AULTMAN, K. 2001. Resisting resistance. *Trends in Parasitology* 17 (7): 305-306.
- VITEK, C.; LIVDAHL, T. 2009. Hatch plasticity in response to varied inundation frequency in *Aedes albopictus*. *Journal of Medical Entomology* 46 (4): 766-771.
- WALKER, K. 2000. Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control. *Medical and Veterinary Entomology* 14 (4): 345-354.
- WHO. 1995. Vector control for malaria and other mosquito borne diseases, Report of a WHO study group, Technical report series No. 857. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP. World Health Organization, Geneva.

Recibido: 17-ago-2010 • Aceptado: 22-abr-2011

Nota científica

Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae)

Analysis of mitochondrial DNA sequences (Cytb and ND1) in *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae)

PAULA ANDREA GIRALDO H.¹, SANDRA INÉS URIBE S.² y ANDRÉS LÓPEZ R.³

Resumen: *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) es una especie de importancia forense debido a su asociación con cuerpos en descomposición en Antioquia y otras regiones de Colombia. La implementación de metodologías que permitan la identificación rápida y acertada de esta especie es de gran importancia en entomología forense. En la actualidad las secuencias de ADN mitocondrial son consideradas una herramienta complementaria a la taxonomía clásica y son utilizadas en la tipificación de especies morfológicamente similares o indistinguibles como en el caso de las moscas de importancia forense. En el presente trabajo se estudio la variabilidad de la región mitocondrial (Cyt b-RNAt-Ser-ND1) en un fragmento de 480 pb amplificada por PCR y cuyo ADN fue obtenido de larvas de tercer estadio de *L. eximia* provenientes de Medellín y dos zonas aledañas. Las diferencias en las secuencias en términos de nucleótidos y distancias genéticas permitieron separar los individuos de la especie de interés de otras especies cercanas. Así mismo, al realizar un análisis de NJ (K2P), se observó una agrupación de los haplotipos relacionada con la procedencia geográfica de los individuos.

Palabras clave: Entomología Forense. Citocromo b. Marcadores moleculares.

Abstract: *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) is a species of forensic importance for its association with decomposing bodies in Antioquia and other regions of Colombia. The implementation of methods to allow the rapid and accurate identification of this species is a matter important in forensic entomology. Currently, the mitochondrial DNA sequences are considered to complement classical taxonomy and are used in the characterization of morphologically similar or indistinguishable species as in the case of forensic importance flies. We evaluated the variability of a mitochondrial region (Cytb –RNAt-Ser-ND1) of 480 bp that was amplified by PCR, from *L. eximia* larvae on third stage from Medellín and two other localities. The sequence differences evaluated as nucleotide differences and genetic distances permitted the separation of individuals from the species of interest when compared with morphologically similar and related species. Furthermore, using a N.J analysis (K2p) the haplotype groupings were related to the geographical origin of individuals from *L. eximia*.

Key words: Forensic Entomology. Cytochrome b. Molecular markers.

Introducción

La familia Calliphoridae se considera de importancia en entomología forense debido al comportamiento necrófago de sus especies, las cuales se desarrollan a diferentes tasas de crecimiento sobre cuerpos en descomposición (Anderson 2000). Esto permite utilizar algunas de sus especies como indicadores del tiempo de muerte y como herramienta para calcular el intervalo *post-mortem* en casos legales (Marchenko 2001).

En Colombia se han registrado 12 géneros y 29 especies de califóridos, de las cuales por lo menos 13 son de importancia forense (Amat *et al.* 2008; Amat 2009; Florez y Wolff 2009). De particular interés se considera el género *Lucilia* representado en el país por cinco especies de amplia distribución geográfica, cuatro de ellas asociadas a cadáveres desde los estados tempranos de descomposición (Pérez *et al.* 2005; Salazar 2008; Vélez y Wolff 2008; Segura *et al.* 2009).

Aunque se ha avanzado grandemente en la taxonomía del género y en precisar aspectos como su presencia y distribución en el país, la identificación taxonómica de sus especies

con base en caracteres morfológicos es difícil. Esta situación es cierta en el caso de los estadios inmaduros debido a la similitud de las características anatómicas. La identificación de éstos con base en herramientas como las moleculares es relevante, dado que son éstos, los estados que predominan en escenas de muerte (Wallman y Donellan 2001; Wells *et al.* 2007).

Las especies del género *Lucilia* pueden separarse con base en diferencias sutiles en los adultos, como la coloración de ciertas estructuras, el ancho relativo de la frente y la forma de los genitales en los machos (Withworth 2010). Estas características se consideran válidas en términos taxonómicos pero son difíciles de expresar de un modo objetivo sin la ayuda de un especialista e implicaría la necesidad de criar los estados inmaduros hasta adultos bajo condiciones de laboratorio para su identificación, o disponer de claves taxonómicas y especialistas y un minucioso trabajo con las larvas aumentando la dificultad de su uso potencial en forense.

Entre las metodologías más utilizadas actualmente para complementar estudios de taxonomía clásica, se encuentran

¹ Aspirante a Maestría. Grupo de Investigación en sistemática molecular. Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia. Calle 59ª # 63-20 - Bloque 16. Teléfono 57-4. 4309394. Fax. 57-4 4309394. E-mail: paulagiraldo07@gmail.com. Autora para correspondencia. ² Ph.D. Profesora asociada Universidad Nacional de Colombia. Grupo de Investigación en sistemática molecular. Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia. Calle 59ª # 63-20 - Bloque 16. Teléfono 57-4. 4309394. Fax. 57-4 4309394. E-mail: suribe@unal.edu.co. ³ Ph.D. Profesora asociada Universidad Nacional de Colombia. Grupo de Investigación en sistemática molecular. Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia. Calle 59ª # 63-20 - Bloque 16. Teléfono 57-4. 4309394. Fax. 57-4 4309394. E-mail: suribe@unal.edu.co.

aquellas de tipificación molecular a partir de secuencias de ADN. En el caso de los insectos y en particular de aquellos de importancia forense, se considera ventajoso el hecho de que las moléculas posibilitan la identificación de especímenes en cualquiera de sus estados, e incluso de partes de ellos (Benecke 1998). Esto es relevante en entomología forense, no solo para corroborar la identidad de las especies, sino también por la información que puede obtenerse aun en aquellos casos en los cuales los insectos se encuentran muertos, o afectados por los procesos de depredación propios de la sucesión y en los que el ADN es la única fuente disponible para su identificación (Sperling *et al.* 1994).

En este sentido, el ADN mitocondrial ha sido ampliamente sugerido y utilizado como marcador molecular; su condición haploide, herencia matrilineal, altas tasas de evolución y la presencia de regiones conservadas y variables, facilitan la tipificación molecular de individuos y su uso para la diferenciación de los mismos a diferentes escalas taxonómicas, ventajas que han sido aprovechadas en estudios con diversos grupos de insectos, incluyendo aquellos de importancia médica y forense (Sperling *et al.* 1994; Behura 2006).

Actualmente se han estudiado alrededor de 12 genes mitocondriales para caracterizar insectos de importancia forense (Lessinger y Azeredo-Ezpin 2000), siendo más utilizados los genes que codifican para Citocromo Oxidasa uno y dos (COI y COII) y validados como marcadores consistentes para la diferenciación a nivel de género y entre grupos monofiléticos de la familia Calliphoridae (Nelson *et al.* 2007; Wells y Williams 2007; Wells *et al.* 2007). Sin embargo, en este último se han encontrado bajos niveles de divergencia entre especies hermanas particularmente en los géneros *Calliphora* y *Lucilia* (Wallman y Donellan 2001; Wallman *et al.* 2005; Wells *et al.* 2007). Estudios que involucren especies de importancia forense con estos géneros y con este marcador no han sido publicados en Latinoamérica.

El gen Citocromo b (Cytb) está involucrado en el transporte de electrones en la cadena respiratoria de la mitocondria. La variabilidad exhibida por el gen a diferentes niveles taxonómicos y su uso exitoso como marcador molecular en conjunto con fragmentos de genes mitocondriales vecinos, lo ha convertido en uno de los más usados para análisis filogenéticos (Irwin *et al.* 1991). Así mismo, éste ha mostrado su utilidad en el estudio de complejos de especie, especies morfológicamente similares e incluso al interior de especies (Meyer 1994). Aunque el Cytb ha sido principalmente usado para estudiar mamíferos, también se conocen estudios de

filogenia y sistemática de insectos, y en especial del orden Diptera (Simmons y Weller 2001; Torgerson *et al.* 2003).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la variabilidad molecular de un segmento de ADN mitocondrial amplificado mediante PCR, que corresponde a un segmento de la región 3' del gen Citocromo b (Cytb), el RNA de transferencia para Serina (ARNt-Ser), el espaciador intergénico (IG2) y un segmento de la región 3' del gen NADH deshidrogenasa 1 (ND1) en *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819).

Esta especie de distribución Neotropical, se ha registrado en Colombia en los departamentos de Antioquia, Bolívar, Caquetá, Cundinamarca, Chocó y Santander (Vélez y Wolff 2008), en asocio con estados tempranos de descomposición cadavérica. Estas características la convierten en una especie con gran potencial para ser utilizada en investigaciones legales y en la determinación de intervalos postmortem.

Materiales y Métodos

Obtención de especímenes. Para la obtención de las larvas se realizaron cuatro muestreos con intervalos de dos meses entre Enero y Agosto de 2006, en tres municipios del departamento de Antioquia (Tabla 1). La frecuencia de muestreo se diseñó con el fin de obtener individuos de diferentes cohortes en las poblaciones seleccionadas.

Se utilizó una trampa Van-Someren-Rydon cebada con hígado fresco de cerdo para coleccionar adultos y huevos de acuerdo a la metodología modificada de Stevens y Wall (1997). Posteriormente se establecieron crías de laboratorio con el fin de obtener adultos para la determinación taxonómica de la especie y larvas para la tipificación molecular. La determinación taxonómica de la especie fue realizada de acuerdo con el trabajo de Florez y Wolff (2009) y verificada por el especialista Eduardo Amat del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos - Alexander Von Humboldt (Villa de Leyva, Colombia), siguiendo la propuesta de Whitworth (2010) para individuos adultos.

Como punto de comparación y para evaluar el uso potencial de la secuencias en separar los individuos de otras especies morfológicamente similares y cercanas, se utilizó una secuencia de referencia depositada en genbank correspondiente a *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) y un individuo de *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) recolectado en la ciudad de Medellín, previamente identificado con base en la metodología de Amat *et al.* (2008) y verificado por el especialista Eduardo

Tabla 1. Datos de referencia de los individuos secuenciados

Números de acceso (genbank) de la secuencia de cada individuo	Municipios de Antioquia de donde provienen los individuos	Coordenadas geográficas de la zona de colecta	Zona de vida
FJ686030, FJ686031, FJ686032, FJ686033, FJ686034, FJ686035, FJ686036, FJ686037	Santa Rosa de Osos	06°35'10"N 75°15'02"W	Bosque muy húmedo montano (bmh-MB)
FJ686020, FJ686021, FJ686022, FJ686023, FJ68602	Medellín	(06°15'91"N 75°34'51"W),	Bosque húmedo premontano (bh-PM)
FJ686025, FJ686026, FJ686027, FJ686028, FJ686029	Itagüí	(06°14'09" 75°34'45"W	Bosque húmedo premontano (bh-PM)

Amat, del Instituto Alexander von Humboldt (Villa de Leyva).

Análisis molecular

Preparación de especímenes. Las secuencias fueron obtenidas a partir de la extracción y amplificación de ADN de larvas en tercer estadio obtenidas a partir de hembras paridas en el laboratorio. Como paso previo al procedimiento de extracción de ADN, cada individuo fue tratado con agua caliente por 10 segundos y posteriormente disectado con el fin de conservar las estructuras consideradas de importancia en la determinación taxonómica como son el esqueleto cefalofaríngeo y el segmento terminal donde se encuentran las placas espiraculares. Estas estructuras, fueron aclaradas en KOH al 10% según la metodología de Stehr (1987) y posteriormente fijadas en placa con bálsamo de Canadá. El resto fue preservado en isopropanol al 100% para la extracción de ADN.

Extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó a partir de fragmentos de 4 mm de larvas, siguiendo la metodología de buffer de macerado (Collins y Porter 1990) que ha sido utilizado con modificaciones menores en otros insectos del orden Diptera (Uribe *et al.* 1998; Uribe 1999). La extracción del ADN y su calidad fueron confirmadas por medio de electroforesis en gel de agarosa y la concentración se estimó utilizando un nanodrop 1000 de Thermo Scientific®.

Amplificación del ADN. La amplificación se efectuó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un termociclador (PTC 100 MJ Researcher). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de los genes fueron CB3FC (CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GATGATA) y NINFR (GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCG(T/A)TATGA).

La reacción de PCR se llevó a cabo empleando entre 0,5 y 1,0 mL de ADN al cual se le adicionaron 4mL de MgCl₂ (25mM), 0,8 mL (1mM) de cada deoxinucleótido (Adenina, Timina, Citosina y Timina), 0,4 mL de cada primer (50 mM), y 5mL de Buffer 10X (Fermentas), ajustados con agua bidestilada para un volumen final de 50 mL. Después de la fase de desnaturalización del ADN a 94°C durante tres minutos, los parámetros de amplificación para los siguientes 35 ciclos de la reacción de PCR fueron: desnaturalización por 30 segundos a 93°C, alineamiento por un minuto a 48°C y extensión por un minuto a 70°C. Los productos amplificados fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y empleando un marcador de peso molecular de 100 pb. La visualización de los geles se realizó en cámara de U.V y estos fueron analizados mediante el programa BioDocAnalyze de BIOMETRA®.

Obtención y análisis de secuencias. La secuenciación de ADN se realizó en el Center for Disease Control CDC de Atlanta (Estados Unidos). La edición y el alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa BIOEDIT Sequence Alignment Editor (Hall 1999). Para la totalidad de las secuencias provenientes de los individuos se estimó, la diversidad haplotípica (*h*), la diversidad nucleotídica (*pi*) y el valor neto de sustituciones nucleotídicas (*K*), por medio del programa DnaSP versión 4 (Rozas *et al.* 2004).

El análisis de la variabilidad de *L. eximia* provenientes de los tres sitios de muestreo (municipios), fue realizado con

base en los polimorfismos de ADN. Las secuencias fueron comparadas teniendo en cuenta la composición en términos de nucleótidos, el porcentaje de transiciones y de transversiones, y el número de sitios polimórficos o sus longitudes. Se exploró la región secuenciada en búsqueda de las regiones más conservadas y variables. Como una medida de la variabilidad entre los individuos y las localidades se calcularon las distancias genéticas (Jukes y Cantor 1969). Finalmente se usó el programa MEGA (versión 5) para observar de forma gráfica las similitudes (agrupaciones) de los haplotipos con base en las distancias genéticas intra e interespecíficas, usando un criterio de Máxima Verosimilitud (M.L).

Los resultados y análisis relacionados con la variabilidad de las secuencias se realizaron considerando éste como un estudio exploratorio sobre el uso potencial de la región secuenciada para agrupar individuos de la especie de interés (provenientes de diferentes localidades geográficas) y separarlos de otras especies morfológicamente similares con base en las distancias genéticas y no como un estudio de genética de poblaciones. No obstante, la validación del gen como marcador taxonómico, corresponderá a un estudio con mayor número de individuos, localidades y especies similares como punto de comparación y que se deriva de los resultados del presente estudio.

Resultados

Extracción y amplificación. El búfer de macerado permitió obtener ADN de las larvas en cantidad y calidad suficiente para una amplificación mediante PCR de la región de interés, usando entre 0,5 y 1mL de ADN de extracción en una reacción de PCR de 50mL. Además, se logró extraer exitosamente ADN con calidad para PCR de fracciones de 2, 3, y 4 mm de larvas L1, L2, y L3 respectivamente con una concentración promedio de 86ng/uL de ADN por muestra. Como dato adicional y pensando en las muestras frecuentemente encontradas en los cadáveres, también se usaron para la extracción de ADN otras fuentes o partes del insecto disponibles en la cría al momento de los ensayos moleculares. Al respecto se encontraron extracciones exitosas a partir de tres huevos, pupas completas, dos patas y pequeños fragmentos de tórax extraídos de los adultos. No se recuperó ADN de puparios vacíos, (datos no mostrados).

Análisis de secuencias. El segmento amplificado incluyó 324 pares de bases correspondientes a la región 3' del gen Cytb, además de un segmento de 66 pares de bases de ARNt-ser, 23bp de la región IG2 y un segmento del extremo 3' del gen ND1 de 66 bp. La identidad de las secuencias se verificó por comparación con la secuencia de referencia de *L. sericata*

Tabla 2. Composición nucleotídica expresada en porcentaje.

	T	C	A	G
<i>L. sericata</i> (Gen bank)	38,9	10,9	39,1	11,1
<i>L. cuprina</i>	38,8	12,5	36,7	12,1
<i>L. eximia</i> (M)*	38,4	12,5	37,4	11,7
<i>L. eximia</i> (I)*	38,2	12,5	37,4	11,9
<i>L. eximia</i> (SR)*	38,6	12,3	37,8	11,3
Promedio	38,6	12,2	37,7	11,6

* M= Medellín, I= Itagüí, SR= Santa Rosa.

Tabla 3. Número de transiciones y transversiones en un segmento de 480 pb de ADN mitocondrial.

Número de sustituciones nucleotídicas	<i>L. eximia</i>	<i>L. eximia</i> <i>L. cuprina</i>	<i>L. sericata</i> <i>L. cuprina</i>
Total sustituciones	7	55	21
Transversiones	4	30	17
Transiciones	3	25	4

en relación con la cual el segmento amplificado corresponde a las posiciones 12338 - 12815 del genoma mitocondrial el cual está depositado en GenBank con número de acceso AJ422212. En total se obtuvieron 18 secuencias para igual número de individuos.

Al observar la distribución de la variabilidad entre las posiciones del alineamiento, se evidenció que los sitios con mayor cantidad de polimorfismos se encuentran en los extremos del alineamiento. Estas posiciones corresponden a las regiones terminales 3' de los genes *Cytb* y *ND1* respectivamente, por lo cual se realizaron análisis detallados en términos de haplotipos con énfasis especial en la porción de *ND1*, que fue tomada para caracterizar por tipos los sitios de muestreo. Los sitios conservados, se encontraron distribuidos, en las posiciones centrales del alineamiento.

Los porcentajes de la composición nucleotídica (Tabla 2) mostraron una mayor cantidad de Adenina y Timina (76,1%) con respecto a la cantidad de Citosina y Guanina (23,8%) patrón de composición de bases que corresponde a lo observado en la mayoría de los genomas mitocondriales de insectos, especialmente en las regiones codificantes (Hoy 2003).

Respecto a las sustituciones nucleotídicas, se encontró un mayor número de transiciones que de transversiones (Tabla 3). *L. sericata* y *L. cuprina* se consideran especies morfológicamente similares y diferenciables de *L. eximia*, lo cual se correlaciona con la variación en el número de sustituciones expresada en porcentajes. Se encontró un porcentaje de 11% de variación entre *L. eximia* y *L. cuprina*, 4,2% entre *L. cuprina* y *L. sericata* y 1,4% entre individuos de *L. eximia*.

Variabilidad de *Cytb*. El análisis incluyó 324 nucleótidos de los cuales, 322 sitios fueron conservados y dos polimórficos con mutaciones en las posiciones 23 y 34 de la secuencia que corresponden a las terceras posiciones del codón, este cambio muestra las poblaciones de Medellín e Itagüí con un mismo haplotipo y la población de Santa Rosa como un segundo haplotipo. Los valores de diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica para las secuencias de *L. eximia* (Tabla 4), corresponden con los observados a nivel intraespecífico para datos haploides (Stephan y Langley 1992).

Tabla 4. Diversidad nucleotídica para las secuencias amplificadas.

Valores intraespecíficos	<i>Cytb</i>	<i>ND1</i>
Número de haplotipos	2	3
Diversidad haplotípica (h)	0,523 ± 0,048	0,686 ± 0,054
Diversidad nucleotídica (Pi)	0,00323	0,03912
Promedio de diferencias nucleotídicas (K)	1,04575	2,58170
Valores interespecíficos	<i>Cytb</i>	<i>ND1</i>
Número de haplotipos	4	5
Diversidad haplotípica (h)	0,652 ± 0,069	0,767 ± 0,053
Diversidad nucleotídica (Pi)	0,04938	0,06154
Promedio de diferencias nucleotídicas (K)	16,0	4

Variabilidad de *ND1*. El segmento que codifica para *ND1* de 66 pb, corresponde a la región 414 - 480 de la matriz. En esta fracción, se encontraron 61 sitios conservados y cinco polimórficos que originaron cambios en las primeras y terceras posiciones del codón. Los sitios variables fueron parsimoniosamente informativos con dos estados en las posiciones dos, tres, 55, 57 (416, 417, 469 y 471 de la matriz general) y un sitio igualmente informativo con tres estados en la posición cuatro (418 de la matriz general) en la primera posición del codón. Este fragmento representó la porción más variable de la región de ADN estudiado y con base en el cual se observó una clara separación de los especímenes por localidad.

Al comparar las distancias genéticas Jukes y Cantor (1969) al interior de la especie con base en las regiones (*Cytb*, *ND1*), se encontraron valores entre 0,01 y 0,011, (Tabla 5). Estos resultados son similares a los encontrados a nivel intraespecífico en otras especies del género como *L. sericata* (0,0-2,1) y *L. caesar* (0,0 -0,9) en los cuales se utilizó una región de 268 pb del gen *COI* entre individuos provenientes de diferentes provincias de China (Liu *et al.* 2010). Los valores fueron mayores entre los individuos de Medellín y Santa Rosa y Medellín e Itagüí, que entre los de Itagüí y Medellín, correspondiendo con las mayores distancias geográficas.

De igual forma, los valores de *h* (Nei 1987) encontrados entre los individuos de las diferentes localidades (0,53 y 0,684) están ligeramente por encima de los valores promedio ya que para marcadores de evolución rápida como el ADN mitocondrial, los valores de diversidad haplotípica intra especies generalmente son menores de 0,5. Así mismo, el número promedio de diferencias nucleotídicas entre los haplotipos (*K*) (Tajima 1983) indicó una diversidad genética media-baja.

Tabla 5. Distancias genéticas intra e interespecíficas obtenidas usando un criterio de máxima verosimilitud

	1	2	3	4	5
1	<i>L. sericata</i> (genbank)				
2	<i>L. cuprina</i>	0,046			
3	<i>L. eximia</i> (M)*	0,098	0,114		
4	<i>L. eximia</i> (I)*	0,100	0,116	0,006	
5	<i>L. eximia</i> (SR)*	0,100	0,116	0,015	0,,

*M=Medellín, I= Itagüí. SR= Santa Rosa.

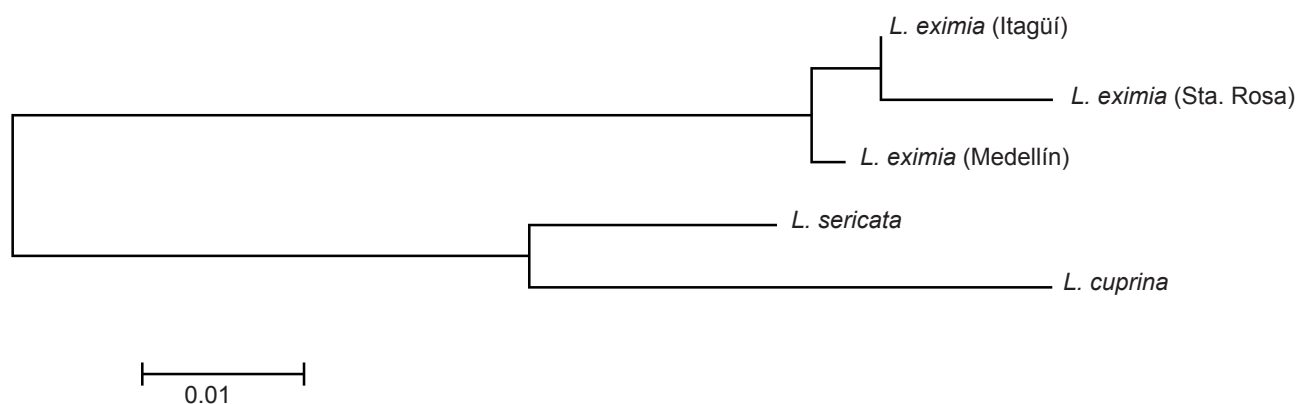


Figura 1. Fenograma de distancias de las muestras de *Lucilia eximia* procedentes de distintos lugares de Antioquia.

La topología obtenida a partir de distancias genéticas de Jukes y Cantor muestra las relaciones entre haplotipos correspondientes a los sitios de muestreo (Fig. 1). En él se observa un único haplotipo por municipio, así como la correspondencia entre las distancias genéticas y las distancias geográficas. El fragmento completo secuenciado permitió discriminar individuos de los tres municipios separados a una distancia mínima de 8 kilómetros.

Discusión

Para las Ciencias Forenses, la aplicabilidad de cualquier método de análisis, depende de varios factores. Entre los más importantes se encuentran la rapidez, eficiencia y costos de la técnica. En cuanto a la obtención y uso de ADN, actualmente se encuentran disponibles y bien documentadas técnicas como RAPDS, RFLPS, y secuenciación de ADN mitocondrial utilizados para análisis de genética de poblaciones, taxonomía molecular y análisis filogenéticos en especies de importancia forense. En la actualidad la obtención directa de secuencias aparece como el método más utilizado y de gran potencial en la sistemática de insectos, mostrando en comparación con otras técnicas excelentes resultados en cuanto a la variabilidad genética de las especies, siendo una información 100% conectable con otros resultados similares y permitiendo a posteriori la implementación de técnicas masivas de caracterización que usen las regiones más variables o conservadas de acuerdo al interés (Infante-Malachias *et al.* 1999; Litjens *et al.* 2001; Stevens y Wall 2001).

En este trabajo realizamos una estandarización de la extracción y amplificación de una región del ADN mitocondrial, Cytb y ND1, (480 pb) y verificamos su uso potencial en la asignación de especímenes o sus partes a una especie de interés forense con identificación taxonómica previamente realizada con base en morfología. Esta región además permitió separar los individuos con base en su procedencia. Adicionalmente, exploramos como el polimorfismo en las secuencias de esta región permite separar de forma correcta individuos de otras dos especies cercanas y morfológicamente similares: *L. sericata* y *L. cuprina*. Las diferencias en términos de número y tipo de haplotipos y distancias genéticas sugieren un uso potencial de este marcador pero que deberá verificarse en un estudio posterior que incluya muestreos en el rango geográfico de distribución de la especie y en relación con otras

especies de forma que se evalué la consistencia del marcador a este nivel taxonómico y de preferencia en el género.

A diferencia de la mayoría de los casos reportados para ciencias forenses, en el presente estudio no se usaron kits comerciales de extracción de ADN que suelen ser costosos en comparación con la solución de lisis con la cual se realizó la extracción. La calidad y cantidad de ADN evaluada con el nanodrop y mediante gel de agarosa, así como la amplificación exitosa de PCR es de resaltar, en especial, si se considera que a partir de pequeñas partes o tejidos de los insectos, con menores costos y en tiempos similares se obtienen resultados adecuados y comparables con los que representa el uso de productos comerciales.

Literatura citada

- AMAT, E. 2009. Contribución al conocimiento de las Chrysomyinae y Toxotarsinae (Diptera: Calliphoridae) de Colombia from Colombia. Revista Mexicana De Biodiversidad 80: 693- 708.
- AMAT, E.; VÉLEZ, C.; WOLFF, M. 2008. Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos (Diptera : Calliphoridae) de Colombia. Caldasia 30(1): 231-244.
- ANDERSON, G.S. 2000. Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). Journal of Forensic Sciences 45: 824-32.
- BEHURA, S. K. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. Molecular ecology 15(11): 3087-113.
- BENECKE, M. 1998. Six forensic entomology cases: description and commentary. Journal of Forensic Sciences 43:797-805; 43:1303.
- COLLINS, F.H; PORTER, C.H. 1990. Comparison of rDNA and mtDNA in the sibling species *Anopheles freeborni* and *A. Hermsi*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 42: 417-423.
- FLOREZ, E.; WOLFF, M. 2009. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. Neotropical Entomology 38(3): 418-429.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- HOY, M. 2003. Insect molecular genetics; an introduction to principles and applications. USA, Academic Press, 544 p.
- INFANTE-MALACHIAS, M.E; YOTOKO, K.S; AZEREDO-ESPIN, A.M. 1999. Random amplified polymorphic DNA of Screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil and Northern Argentina. Genome 42: 772-779.

- IRWIN D.M.; KOCHER T.D.; WILSON, A.C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene in mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32: 128-144.
- JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. (Munro H N, ed.) *Mammalian protein metabolism*. III. New York: Academic Press. 21-132 p.
- LESSINGER, A.C.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L. 2000. Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of miasis-causing blow flies. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 71-80.
- LIU, Q.L.; CAI, J.F.; CHANG, Y.F.; GU, Y.; GUO, Y.D.; WANG, X.H.; WENG, J.F.; ZHONG, M.; WANG, X.; YANG, L.; WU, K.L.; LAN, L.M.; WANG, J.F.; CHEN, Y.Q. 2010. Identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in China by mitochondrial cytochrome oxidase I gene differentiation. 18: no. doi: 10.1111/j.1744917.2010.01377.x.
- LITJENS, P.; LESSINGER, A.C.; AZEREDO-ESPIN, A.M. 2001. Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Medical and Veterinary Entomology* 15: 183-188.
- MARCHENKO, M.I. 2001. Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. *Forensic Science International* 120: 89-109.
- MEYER, A. 1994. Shortcomings of the Cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 278-280.
- NELSON, L. A.; WALLMAN, J. F.; DOWTON, M. 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology* 21(1): 44-52.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- PÉREZ, S. P.; DUQUE, P.; WOLFF, M. 2005. Successional behavior and occurrence matrix of carrion-associated arthropods in the urban area of Medellín, Colombia. *Journal of Forensic Sciences* 50(2): 448-54.
- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DEL BARRIO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. 2004. DNASP Dna sequence polymorphism. Version 4.0, Barcelona, Universidad de Barcelona.
- SALAZAR, J. 2008. Estudio de la entomofauna sucesional asociada a la descomposición de un cadáver de cerdo doméstico *Sus scrofa* en condiciones de campo. *Universitas Scientiarum* 13(1): 21-32.
- SEGURA, N. A.; USAQUÉN, W.; SÁNCHEZ, M. C.; CHUAIRE, L.; BELLO, F. 2009. Succession pattern of cadaverous entomofauna in a semi-rural area of Bogotá, Colombia. *Forensic Science International* 187(1-3): 66-72.
- SIMMONS, R.B.; WELLER, S.J. 2001. Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 20 (2): 196-210.
- SPERLING, F.H.A.; ANDERSON, G.S.; HICKEY, D.A. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Science* 39: 418- 427.
- STEVENS, J.; WALL, R. 1997. The evolution of ectoparasitism in the genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae). *International Journal of Parasitology* 27(1): 51-59.
- STEVENS, J.; WALL, R. 2001. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Science International* 120: 116-123.
- STEHR, F. W. 1987. *Techniques for collecting, rearing, preserving and studying immature insects*, vol1, Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa, USA. 754 p.
- STEPHAN, W.; LANGLEY, C.H. 1992. Evolutionary consequences of DNA mismatch inhibited repair opportunity. *Genetics* 132: 567-574.
- TAJIMA, F. 1983. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- TORGERSON, D.G.; LAMPO, M.; VELÁZQUEZ, Y.; WOO, P. 2003. Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Higiene* 69: (5) 484-493.
- URIBE S, PORTER CH; VÉLEZ ID. 1998 Amplificación y Obtención de Secuencias de rRNA Mitocondrial en *Lutzomyia* spp (Diptera: Psychodidae) Vectores de Leishmaniosis. *Revista Colombiana de Entomología* 23 (3-4): 177-185.
- URIBE S. 1999 Polimorfismo entre Poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) Vector de Leishmaniosis Sugiere la Existencia de un Complejo de Especies. *Revista Biomédica* 19(1): 56-66.
- VÉLEZ, M. C.; WOLFF, M. 2008. Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 48(6): 41-48.
- WALLMAN, J.F.; DONELLAN, S.C. 2001. the utility of mitochondrial DNA sequences for identification of forensically important blowflies. (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Science International* 120 (1): 11-115.
- WALLMAN, J.F.; LEYS, R.; HOGENDOORN, K. 2005. Molecular systematics of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. *Invertebrate Systematics* 19: 1-15.
- WELLS, J.; WALL, R.; STEVENS, J. 2007. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *International Journal of Legal Medicine* 121(3): 229-33.
- WELLS, J.; WILLIAMS, D. 2007. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. *International Journal of Legal Medicine* 121(1): 1-8.
- WHITWORTH, T. 2010. Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of the West Indies and description of a new species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy. *Zootaxa* 2663: 1-35.

Recibido: 19-may-2010 • Aceptado: 7-may-2011

Sección Básica

Wasmannia auropunctata (Hymenoptera: Formicidae): ¿unicolonial o multicolonial? en el valle geográfico del río Cauca

Wasmannia auropunctata (Hymenoptera: Formicidae): ¿Unicolonial o multicolonial? in the valley Cauca river

BEATRIZ SALGUERO R.¹, INGE ARMBRECHT², HERNANDO HURTADO T.³ y ÁNGELA MARÍA ARCILA C.⁴

Resumen: Con el objetivo de identificar la estructura social de la pequeña hormiga de fuego *Wasmannia auropunctata*, en ambientes drásticamente perturbados, se modeló la distribución espacial de esta especie en dos parches de bosque seco con grados de perturbación contrastantes, ubicados al sur y norte del valle geográfico del río Cauca, regiones para las cuales *W. auropunctata* es considerada nativa con estructura social multicolonial. Para los análisis se tuvieron en cuenta las variables densidad poblacional y nidos/m² en los biotopos: borde, interior de bosque y potrero. La modelación estuvo enmarcada en el campo de la geoestadística, donde se estimaron los modelos de semivariogramas y parámetros asociados, que definieron la continuidad espacial de las variables de interés y que fueron utilizados para la interpolación y construcción de mapas en regiones del espacio no muestreadas, a través del krigado. Se encontró que la distribución espacial estuvo bien descrita por modelos de semivariogramas esféricos y exponenciales, que explicaron el patrón de autocorrelación espacial. Los mapas de interpolación de obreros por cebo y de nidos/m², permitieron mostrar como la pequeña hormiga de fuego presenta una estructura social unicolonial en el parche de bosque de San Julián, al sur del departamento del Valle asociado a un mayor grado de perturbación, lo que puede llegar a justificar su baja agresividad intraespecífica en su rango nativo. En contraste, en el parche de bosque de Alejandria al norte del departamento y con un menor grado de perturbación, presentó una estructura social multicolonial con alta agresión intraespecífica.

Palabras clave: Estructura social. Fragmentación. Colombia. Modelación matemática. Hormiga del fuego.

Abstract: With the aim of identifying little fire ant *Wasmannia auropunctata*'s social structure in drastically disturbed environments, we modeled the spatial distribution of this species in two patches of dry forest with contrasting levels of disturbance, at south and north of the Cauca river valley, a region for which *W. auropunctata* is considered native with a multicolonial social structure. For the analysis, we took into account both, population density and nests/m², in biotopes: edge, interior forest and pasture. The modeling was framed in the field of geostatistics, where, by the estimation of semivariograms' models and parameters, the spatial continuity of variables we were interested in was defined. They were used to interpolate and construct the maps for those regions not sampled all of this through kriging. It was found that the spatial distribution model was well described by spherical and exponential semivariograms, which explained the pattern of spatial autocorrelation. Interpolation maps of workers per bait and nests/m² allowed us to show that the little fire ant has a unicolonial social structure in the patch of San Julian's forest, at south of the valley. That was associated with a greater degree of disturbances, which may justify their low intraspecific aggression in its native range. In contrast, in the Alejandria's forest patch situated at north of the department and which exhibited a lower disturbance, it introduced a social structure multicolonial and high intraspecific aggression.

Key words: Social structure. Fragmentation. Colombia. Mathematical modeling. Fire ant

Introducción

En Colombia, el valle geográfico del río Cauca, alguna vez estuvo dominado por una espesa vegetación arbórea propia de bosque seco tropical (bs-T), pero debido a la actividad antrópica sufrió una drástica fragmentación (Velasco 1982), quedando tan solo con 2% de cobertura boscosa (Arcila 2007). Este escenario fue parte de un fenómeno más amplio, y hoy se considera al bs-T como uno de los ecosistemas más amenazados en el Neotrópico (Didier *et al.* 2001). El reemplazo de casi la totalidad del bosque por cultivos, convierte el paisaje en parches de bosque rodeados por una matriz altamente transformada, hostil para la conservación de especies que requieren grandes extensiones de bosque continuo para su desarrollo y que facilita la invasión de especies generalistas (Kattán 2002).

Aunque se conoce poco de los efectos de la fragmentación del hábitat sobre las comunidades de invertebrados (Didham *et al.* 1998), se ha documentado que algunas es-

pecies son insensibles a los cambios estructurales y utilizan hábilmente los hábitats del borde (Kotze y Samways 2001), mientras que otras, incluyendo varias especies de insectos, responden rápidamente a factores relacionados con los bordes (Laurance y Vasconcelos 2001). En la evaluación de ambientes perturbados, los insectos son de gran utilidad pues cumplen con una serie de criterios ecológicos, biogeográficos, de conservación, monitoreo y calidad del ambiente (Brown 1991; Kremen *et al.* 1993; IAvH 1998). Las hormigas (Hymenoptera: Formicidae) cumplen con las condiciones requeridas (Brown 1991) y pueden reflejar la naturaleza de la vegetación, las condiciones físicas, perturbación y posiblemente la variedad de otros invertebrados que están presentes en un área dada (Burbidge *et al.* 1992). En Colombia se han realizado estudios sobre la fauna de hormigas en pequeños parches de bosque seco a lo largo del valle geográfico del río Cauca y se han encontrado más de 200 especies de hormigas (Armbrecht y Chacón de Ulloa 1999; Chacón de Ulloa y Armbrecht 2006).

¹ M.Sc. Departamento de Matemáticas Universidad Autónoma de Occidente, Cali, Colombia. bsalguero@uao.edu.co autora para correspondencia. ² Ph.D. Departamento Biología Universidad del Valle. Cali - Colombia. inge.armbrecht@correounivalle.edu.co. ³ M.Sc. Departamento Estadística Universidad del Quindío. Armenia - Quindío lhurtado@uniquindio.edu.co. ⁴ Ph.D. Corpoica-Caribia, Zona Bananera-Magdalena. aarcila@corpoica.org.co

Dentro de este gran grupo se destaca la pequeña hormiga de fuego *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863), por su abundancia, facilidad para identificar y coleccionar. Se distribuye en un rango geográfico bastante amplio, es nativa de los trópicos americanos y ha invadido zonas tropicales y subtropicales de otros continentes del mundo (Silberglied 1972; Wetterer *et al.* 1999; Ulloa - Chacón y Cherix 1990). Esta hormiga es una especie generalista en su dieta, anida en hojarasca y posee características propias de las especies vagabundas ("tramp"), descritas por Holldobler y Wilson (1990), como poliginas, uniclonales, reproduciéndose por fisión de las colonias y dispersándose por las actividades humanas (Ulloa-Chacón y Cherix 1990; Passera 1994).

En parches de bosque seco tropical del Valle del río Cauca se ha encontrado una correlación negativa entre la incidencia de captura de *Wasmannia auropunctata* y la riqueza de otras hormigas, por esta razón ha sido propuesta por Armbricht y Ulloa - Chacón (2003), como un indicador de baja biodiversidad de la comunidad de hormigas. Todo parece indicar que la fragmentación causa pérdidas de especies por aislamiento liberando recursos y nichos que son aprovechados por *W. auropunctata* favoreciendo así la colonización de estos hábitats perturbados (Arcila 2007; Philpott *et al.* 2010).

En su rango introducido, la pequeña hormiga de fuego no exhibe agresividad hacia sus congéneres (Clark *et al.* 1982; Ulloa - Chacón 1990). En su rango nativo, se ha reportado estructura social multiclonal con agresividad intraespecífica. Sin embargo, López (2005) encontró estructura uniclonal con baja agresión intraespecífica en zonas agrícolas altamente perturbadas, donde se comporta como especie invasora, mas no dentro de los bosques relativamente bien conservados en el valle geográfico del río Cauca. A nivel interespecífico, la pequeña hormiga de fuego sí presenta un comportamiento agresivo (Wetterer y Porter 2003) especialmente donde ha sido introducida afectando negativamente otras especies silvestres (Silberglied 1972; Clark *et al.* 1982).

Los diferentes comportamientos de agresividad de *W. auropunctata* se expresan claramente en la distribución espacial que exhibe la hormiga, tanto en hábitats perturbados como naturales. Cuando su distribución es muy agregada, su tendencia es a comportarse como en su rango nativo y cuando su distribución tiende a uniforme se comporta como invasora, exhibiendo uniclonalidad, es decir, múltiples nidos interconectados y poca agresividad intraespecífica (Ulloa-Chacón y Cherix 1990; López 2005).

Dada la anterior problemática con la pequeña hormiga de fuego, es necesario explorar el comportamiento de las poblaciones en su rango nativo utilizando herramientas de la estadística espacial. Usualmente, se utilizan métodos de la estadística clásica para los análisis de distribución espacial, basados en índices de dispersión, que no tienen en cuenta la localización exacta de la muestra. Estos métodos suponen independencia en los datos e igual distribución, por lo que pueden errar en la diferenciación de patrones espaciales disímiles (Ramírez-Dávila y Porcayo-Camargo 2008; Robertson 1987). Al no tener en consideración toda la información espacial, los investigadores podrían llegar involuntariamente a resultados y predicciones erróneas (Carroll y Pearson 2000; Rossi *et al.* 1992; Moral 2004), debido a que se puede presentar autocorrelación.

El uso de la Geoestadística ha ido en incremento, para fortalecer estudios donde se presenta autocorrelación espacial, puesto que comprende un conjunto de herramientas y

procedimientos estadísticos que permiten analizar, modelar y predecir los valores de una variable que se muestra distribuida en el espacio o en el tiempo en forma continua y autocorrelacionada (Isaaks y Srivastava 1989; Díaz - Francés 1993). A diferencia de los índices de dispersión, que ignoran la localización de las muestras (Taylor 1984), los métodos geoestadísticos requieren información georreferenciada obteniéndose la localización espacial bidimensional exacta de la variable de estudio, adicionalmente el tratamiento de la información con estas técnicas permite elaborar mapas de interpolación muy útiles, para establecer centros de concentración de las poblaciones. En las dos últimas décadas se han utilizado en ecología técnicas geoestadísticas con notable éxito (Rossi *et al.* 1992), para obtener mapas de interpolación de variables ecológicas en regiones del espacio no muestreadas (Isaaks y Srivastava 1989; Rossi *et al.* 1992; Díaz - Francés 1993) donde al conocer la distribución espacial de un insecto plaga en alguna región geográfica, se pueden aplicar controles para disminuir sus poblaciones (Díaz-Francés 1993; Liebhold *et al.* 1993; Ramírez-Dávila *et al.* 2005; Ramírez-Dávila y Porcayo-Camargo 2008; Nordmeyer 2009).

Dada la necesidad de conocer la distribución espacial de *W. auropunctata* en los parches de bosque seco tropical existentes en el valle geográfico del río Cauca, especialmente en el bosque de San Julián al sur, un sitio altamente perturbado y en el bosque Alejandría al norte, un sitio poco perturbado, se planteó el presente estudio que propone presentar con herramientas de la geoestadística, la modelación matemática de la distribución de la hormiga *W. auropunctata*. El estudio modela dos variables, obreras por cebo y nidos/m², (en adelante "nidos" y "agregados" significarán lo mismo) en los biotopos, interior de bosque, borde de bosque y matriz circundante. Se espera que la modelación actúe como un ente informador desde el cual se pueda discutir la estructura social de la pequeña hormiga de fuego en dos parches de bosque altamente contrastantes de acuerdo a su grado de perturbación. Los resultados permitirán establecer estrategias de manejo de estos ecosistemas encaminados a la coexistencia de otras especies de hormigas con *W. auropunctata*.

Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en dos etapas: el muestreo de *W. auropunctata*, siguiendo los protocolos de muestreo optados por Arcila (2007) y la modelación matemática de la distribución espacial de la pequeña hormiga de fuego. Arcila (2007) seleccionó 10 parches de bosque a lo largo de la cuenca alta del río Cauca, de los cuales dos fueron seleccionados para el presente estudio: San Julián (3°6'38,8"N 76°31'41,2"W) en el sur limitando con el departamento del Cauca y Alejandría (4°49'58,6"N 75°53'2,4"W) en el norte limitando con el departamento de Risaralda. Para estos sitios se registró una altura sobre el nivel del mar entre 900 y 1100m respectivamente, con temperaturas promedio de 24°C y precipitaciones anuales fluctuando entre 1000 y 2000mm (CVC 1990), características propias del bosque seco tropical (bs-T) (Fig. 1). Los parches de bosque presentan una estructura interna muy similar (Armbricht y Ulloa - Chacón 2003), pero fueron diferentes en tamaño, forma, grado de aislamiento y tipo de matriz que los rodea, la cual por lo general se encontró constituida por cultivos de caña de azúcar y potreros. El área total de los parches fue de 10,6 hectáreas para San Julián y de 15,3 hectáreas para Alejandría, con una extensión interna de bos-



Figura 1. Ubicación del departamento del Valle del Cauca en el territorio colombiano y de las localidades de muestreo en la cuenca alta del río Cauca, departamentos del Cauca, Valle del Cauca y Risaralda. (Tomado de Arcila 2007).

que sucesional tardío del orden de 3,5 Ha, caracterizándose como bosques muy pequeños (Arcila 2007).

En San Julián y Alejandría se obtuvieron datos del número de obreras y nidos/m², en el borde de bosque, interior de bosque y matriz circundante (potrero o caña de azúcar). Para el análisis se tomaron sólo los registros que permitieran información en términos de un arreglo en el plano así fuese irregular, situación recomendable para los análisis de estructura espacial (Giraldo 2002; Isaaks y Srivastava 1989; Díaz - Francés 1993; Zas 2006).

Arcila (2007) y López (2005) seleccionaron para la matriz que fue el elemento más extenso del paisaje, un borde consistente en una franja de 50m de ancho a partir del límite entre el parche y la matriz. De acuerdo con Didham *et al.* (1998), ésta debe ser superior a los 100 metros, pero dada el área tan pequeña de la zona boscosa, este ancho dejaría las zonas de estudio sin interior de bosque. En cada uno de los biotopos se trazaron aleatoriamente transectos lineales, con estaciones de muestreo separadas 20m, procurando que su distribución fuera uniforme en todo el área, se alcanzaron cerca de 30 estaciones para cada biotopo, para un total de 90 para cada localidad. Los transectos de la matriz se dispusieron de forma paralela a 50m de los bordes del bosque (López 2005).

En cada estación de muestreo se colocaron cebos de atún, en cuadros de papel blanco de 4cm x 4cm, expuestos por 3 horas, después de las cuales fueron revisados para registrar la

presencia de *W. auropunctata*, posteriormente se colectaron y se llevaron al laboratorio para realizar el conteo de obreras capturadas. En aquellas estaciones de muestreo donde se registró la presencia de *W. auropunctata* se colocaron cuadrantes de 1m² separados por una cuadrícula de 20cm x 20cm. En cada uno de los cuadrantes se realizó la búsqueda directa en hojarasca y tronquitos huecos, para establecer la densidad de nidos/m² de *W. auropunctata*. Cada estación de muestreo fue georreferenciada usando un geoposicionador portátil Garmin 12 XL.

Análisis Geoestadístico. A través del análisis geoestadístico se determinó la estructura de autocorrelación entre los datos y su uso en la predicción o interpolación a través de las técnicas conocidas como kriging (Hurtado *et al.* 2007). Inicialmente, la información se organizó en bases de datos Excel georreferenciadas en un sistema de coordenadas UTM, con origen en centro - occidente (4°35'56,57"N 77°4'51,3"W) (Com. Per. 2007, Jorge Mejía PhD, OSSO Observatorio Sismológico del Sur Occidente). Se realizó con el software statgraphics Plus 5.1, el análisis exploratorio de datos originales para obreras por cebo y nidos/m², para reconocer valores atípicos, analizar las medidas de tendencia central en los datos. Con el software GS+ (versión 5.1) se obtuvieron los mapas de ubicación de los sitios de muestreo con su respectivo registro. Cuando el supuesto de normalidad no se satisfizo, se realizó una transformación Box - Cox tipo potencia, la cual suaviza la varianza Cabe anotar, que esta transformación es reversada para la interpolación e interpretación de los resultados. En cada sitio de estudio se estimó un semivariograma experimental a partir de los registros de obreras por cebo y nidos /m², a través de la siguiente ecuación (Isaaks y Srivastava 1989)

$$\hat{\gamma}(h) = \frac{1}{2N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} \{[Z(x_i+h) - Z(x_i)]^2\}$$

Donde $\hat{\gamma}(h)$ corresponde al semivariograma experimental para el intervalo de distancia h ; $N(h)$ corresponde al número de pares de puntos muestrales separados por el intervalo de distancia h ; $Z(x_i)$ es el valor de la variable regionalizada de estudio en el punto x_i y $Z(x_i+h)$ es el valor de la variable regionalizada de estudio en el punto x_i+h .

En Geoestadística, las variables regionalizadas, son aquellas variables aleatorias medidas en el tiempo o en el espacio y que presentan estructura de correlación, son funciones $Z(x)$ que toman un valor en cada punto x del espacio y que definen un proceso estocástico (Hurtado *et al.* 1996). Se consiguieron semivariogramas experimentales, a los cuales se les ajustó un modelo teórico que corresponde a una función definida positiva (Isaaks y Srivastava 1989), la gráfica resultante de $\hat{\gamma}(h)$ en función de h , describe el grado de autocorrelación presente.

La mayoría de los modelos teóricos de ajuste, contienen tres parámetros comunes: el efecto pepita o nugget effect, que corresponde a la variación causada por errores experimentales o de muestreo, generalmente ocasionados por una microvariabilidad en la variable de estudio, la meseta o sill que es la cota superior del semivariograma y corresponde a la máxima variabilidad de la variable regionalizada y el rango o alcance, que es aquel valor de h para el cual el semivariograma alcanza la meseta, en términos prácticos es la distancia a partir de la cual dos observaciones son independientes, (Fig. 2).

En los anteriores ajustes, es importante determinar el nivel de dependencia espacial. Este valor se obtiene del cociente entre los valores del efecto pepita y la meseta, expresando su resultado como un porcentaje. Si este valor es menor del 25% se considera como un nivel de dependencia alto; un valor entre 26% y 75% corresponde a un nivel de dependencia moderado; finalmente un nivel por encima del 76% corresponde a un nivel de dependencia bajo (Cambardella *et al.* 1994). También, como establece Díaz - Francés (1993) para que el modelo de correlación describa la realidad es recomendable que el valor del efecto pepita no supere el 50% del valor de la meseta ó cota superior.

Posterior al establecimiento de la dependencia espacial, se usa el modelo del semivariograma ajustado, para realizar la interpolación en aquellos puntos que no fueron muestreados, usando algoritmos del kriging, los cuales permiten estimar el valor de la variable de interés en un punto muestral específico a partir de los restantes valores muestrales. El procedimiento anterior permitió elaborar un mapa representando el comportamiento de las dos variables de densidad de *W. auropunctata* en la zona estudiada. También se realizaron en Arc Map versión 9, los mapas de distribución de obreras por cebo con las isoclinas de la variable nidos/m² superpuestas.

Resultados

De acuerdo con el análisis exploratorio de los datos, San Julián presentó 657 obreras por cebo y 4,2 nidos /m² en promedio, mientras que en Alejandría los registros fueron de 20 y 1,31 respectivamente. En ambos parches de bosque, el coeficiente de variación para obreras por cebo y para nidos/m², fue mayor a 100%.

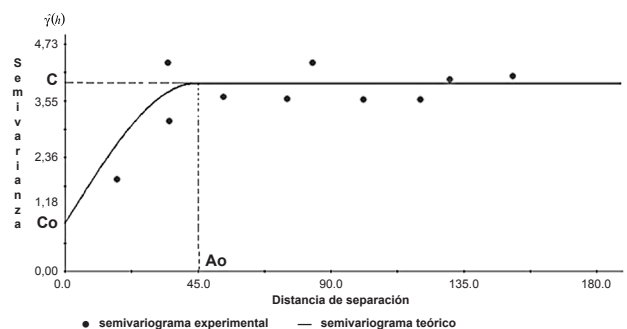


Figura 2. Representación de la estructura de correlación con los parámetros del variograma.

Para todas las variables se estimaron variogramas acotados o con meseta finita, en ningún caso exhibieron semivarianza constante en función de la distancia, (pepita puro) lo que muestra que los modelos encontrados, si reflejaron una estructura de dependencia espacial para las variables. Las variables en las dos localidades se llevaron a los datos originales por la transformación inversa y muestran que el valor del efecto pepita fue menos del 48,1% del valor de la meseta en la mayoría de los modelos, esto conduce a establecer que al menos el 51,9% de la variabilidad total es debida a la dependencia alta en estas escalas de muestreo, resultando en la mayoría de los modelos con una dependencia espacial moderada (Tabla 1). El valor de la pepita o nugget no superó el 50% de la meseta ó cota superior del variograma, por lo que los modelos conseguidos para este estudio describen correctamente la variabilidad total, con una dependencia espacial moderada.

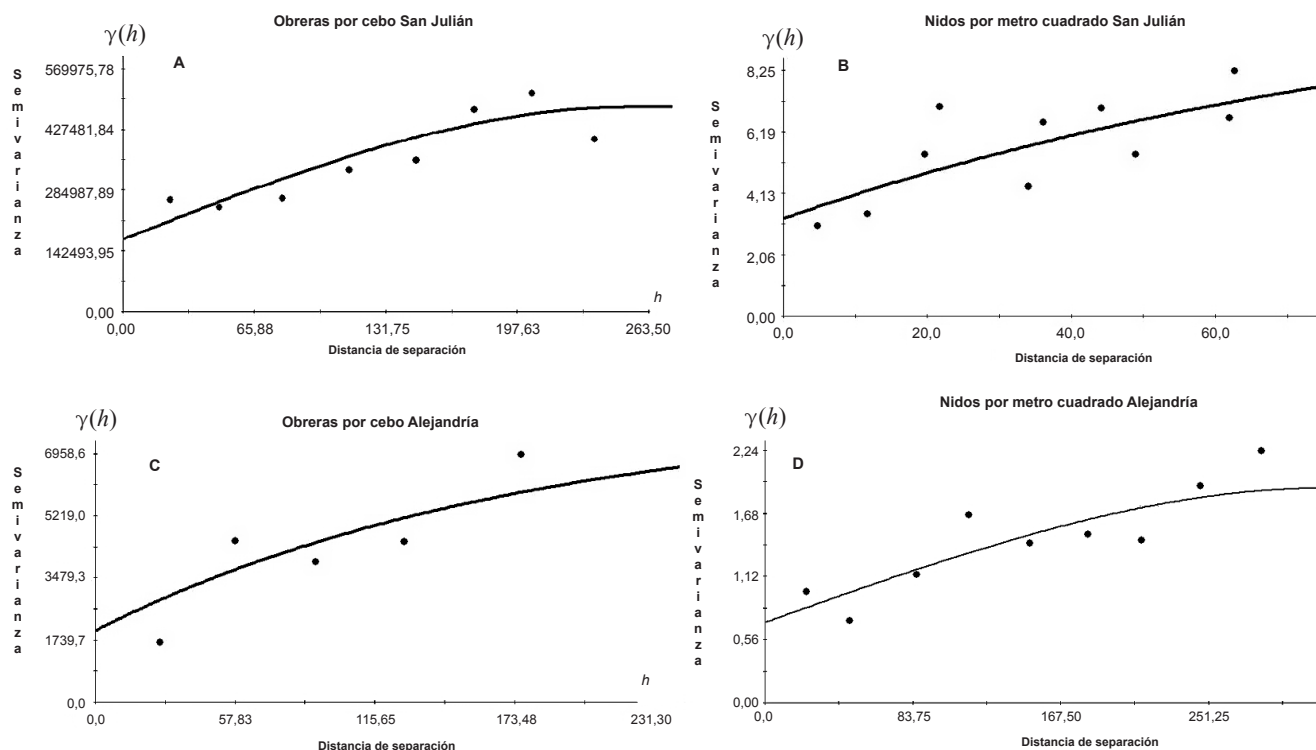


Figura 3. Variograma experimental y teórico ajustado, parámetros para obreras por cebo y agregados/m² para las localidades de San Julián y Alejandría. A obreras/cebo San Julián, B agregados/m² San Julián, C obreras por cebo Alejandría, D agregados/m² Alejandría.

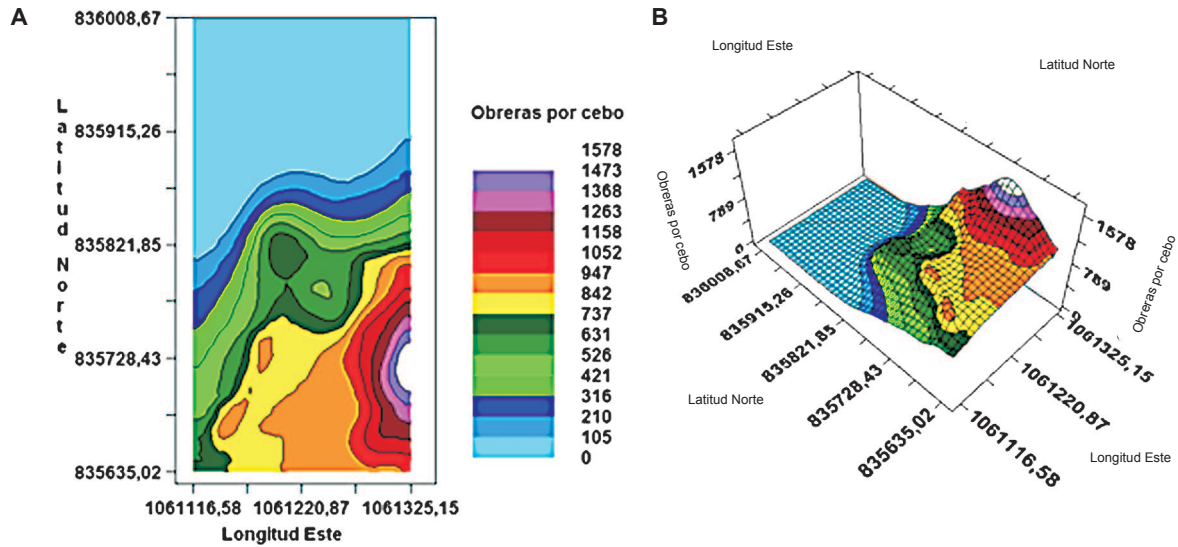


Figura 4. Mapas de interpolación obreras por cebo para el bosque de San Julián. **A.** Representación bidimensional. **B.** Representación tridimensional.

El coeficiente R^2 para obreras por cebo, igual a 0,924 en San Julián y a 0,789 en Alejandría, indicaron la calidad del ajuste del semivariograma teórico al semivariograma experimental. En la figura 3 se presentan los modelos de semivariogramas para las variables descritas en las dos localidades.

Los mapas de distribución bi y tridimensional de obreras por cebo para San Julián muestran un gradiente positivo, con una agregación hacia la región suroriente de la localidad (Fig. 4). El mapa geográfico correspondiente a la zona de estudio, permitió evidenciar la tendencia de la densidad obreras por cebo hacia la zona del borde en la esquina suroriente, en límites con la matriz de caña (Fig. 5). Los mapas de distribución bi y tridimensional de agregados o nidos por metro cuadrado para Alejandría muestran tres agrupamientos (Fig. 6): uno en potrero, al noroeste, y los otros dos en el borde, hacia el costado este en el norte y en cercanías al sur. Similar a San Julián el mapa geográfico correspondiente a la zona de estudio, permitió evidenciar la tendencia de la densidad obreras por cebo

hacia las zonas del borde en cada una de las concentraciones (Fig. 7).

Los mapas de distribución de obreras por cebo junto con las isolíneas de nidos por metro cuadrado para las dos localidades exhibieron una interpolación muy similar al de obreras por cebo, se observa como densidades altas de obreras por cebo, coinciden con los mayores registros de nidos por metro cuadrado, que en San Julián alcanzó 15 nidos/m² y en Alejandría llegó hasta 9 nidos/m² (Fig. 8).

Discusión

Mediante herramientas de la geoestadística, este estudio permitió conseguir modelos teóricos de semivariogramas ajustados a los semivariogramas experimentales, con el valor de R^2 y el cociente valor de la pepita sobre el valor de la meseta, lo cual verificó la calidad del ajuste. Los semivariogramas ex-

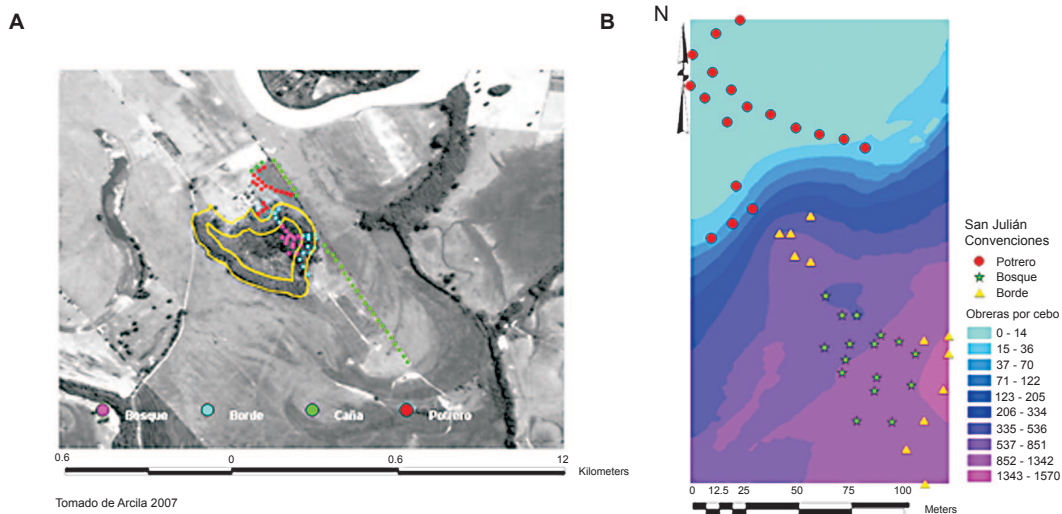


Figura 5. San Julián. **A.** Mapas de localización estaciones de muestreo. **B.** Mapa de distribución de obreras por cebo y estaciones de muestreo.

Tabla 1. Parámetros de los modelos ajustados a los semivariogramas de obreras por cebo y agregados/m².

Localidad	Variable	Modelo	Pepita	Meseta	Alcance o rango (m)	R ²	Pepita/Meseta (%)	Nivel de dependencia espacial
San Julián	Obreras/cebo	Exponencial	121	279	162,40	0,924	43,36	Moderado
	Agregados/m ²	Exponencial	1,4	2,91	97,40	0,398	48,10	Moderado
Alejandría	Obreras/cebo	Exponencial	5,25	44	137,3	0,789	11,93	Alto
	Agregados/m ²	Esférico	0,6	2,0	85,2	0,475	30	Moderado

perimentales encontrados, presentaron estructura de dependencia espacial, puesto que en ningún caso la semivarianza fue constante en función de la distancia, es decir, ninguno de los variogramas estimados exhibió una línea recta horizontal (Giraldo 2002; Díaz - Francés 1993; Isaaks y Srivastava 1989). Se ajustaron semivariogramas teóricos exponenciales y esféricos, acotados, exhibiendo una meseta u horizonte de correlación finito (Samper y Carrera 1990). Estos modelos son apropiados, para el análisis de una variable como la densidad de insectos en una zona de estudio, por ser los que mejor describen la distribución errática de la población en distancias pequeñas o reducidas (Isaaks y Srivastava 1989).

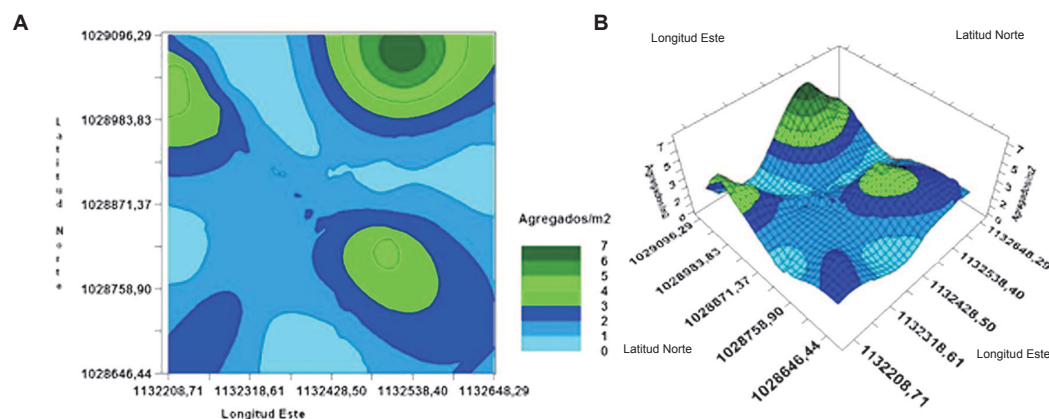
En ninguno de los ajustes el valor de la pepita o *nugget*, superó el 50% de la meseta ó cota superior del variograma, una característica que según Díaz - Francés (1993), es recomendable para que el modelo de correlación describa bien la realidad. Los mapas de distribución o de predicción permitieron identificar tendencias y agrupaciones de las variables. El número de obreras por cebo y el número de nidos/m² mostraron para los dos parches de bosque, un gradiente positivo desde el interior del bosque hacia el borde y un comportamiento agregado de *W. auropunctata* en todos los parches de bosques y sus matrices aledañas. En resumen, los resultados del modelamiento matemático en los fragmentos bosques fueron consistentes, es decir, el nivel de dependencia espacial indica una distribución agregada de la hormiga, y el comportamiento de la densidad y los nidos de obreras fue coherente respecto a un gradiente hacia los bordes, como lo exhiben los mapas de distribución de abundancia junto con las isoclinas de nidos/m², donde se muestra una relación directa entre las dos variables (Salguero 2008).

Los mapas de distribución para obreras por cebo y nidos/m², presentaron agregaciones con diferentes densidades

poblacionales, considerablemente altas para la localidad de San Julián con un poco más de 1600 obreras por cebo, comparada con Alejandría, la cual fue aproximadamente de 141 obreras/cebo. Para ambos sitios los valores máximos de la variable coincidieron con los de agregaciones de nidos/m². La distribución y densidad de la pequeña hormiga de fuego fue sorprendentemente contrastante en los dos bosques, pues estando en su rango nativo se esperaba que el comportamiento de la especie fuese multicolonial (Le Breton *et al.* 2004), donde la agresividad intraespecífica fuese muy común, con tendencia a exhibir muchas colonias que presentasen límites territoriales definidos.

Los resultados de este estudio pueden analizarse a la luz de los estudios de agresividad realizados por López (2005) en tres bosques secos de la cuenca media del río Cauca: San Julián, El Medio y Alejandría. Esta investigadora encontró que cuando está en altas densidades poblacionales, la hormiga presenta muy bajos índices de agresividad y viceversa. Así, se justifica que la habilidad de *W. auropunctata* para alcanzar altas densidades poblacionales en San Julián se debe al hecho que presenta una baja agresividad intraespecífica en su rango nativo, fenómeno que también ocurre en los sitios donde la especie es introducida (Ulloa-Chacón y Cherix 1990).

No sucedió lo mismo con Alejandría, bosque donde presentó una baja densidad poblacional y que de acuerdo con López (2005), presentaría una alta agresividad intraespecífica en su rango nativo. Por lo anterior, es posible afirmar que, desde la interpolación exhibida en los mapas de distribución de obreras por cebo para San Julián, se concibe esta localidad como una gran unicolonial, para la cual la agresión intraespecífica no está (Le Breton *et al.* 2004), lo que permite un libre intercambio entre los aproximadamente 15 nidos comprendidos en ella.

**Figura 6.** Mapas de interpolación agregados por metro cuadrado para el bosque de Alejandría. A. Representación bidimensional. B. Representación tridimensional.

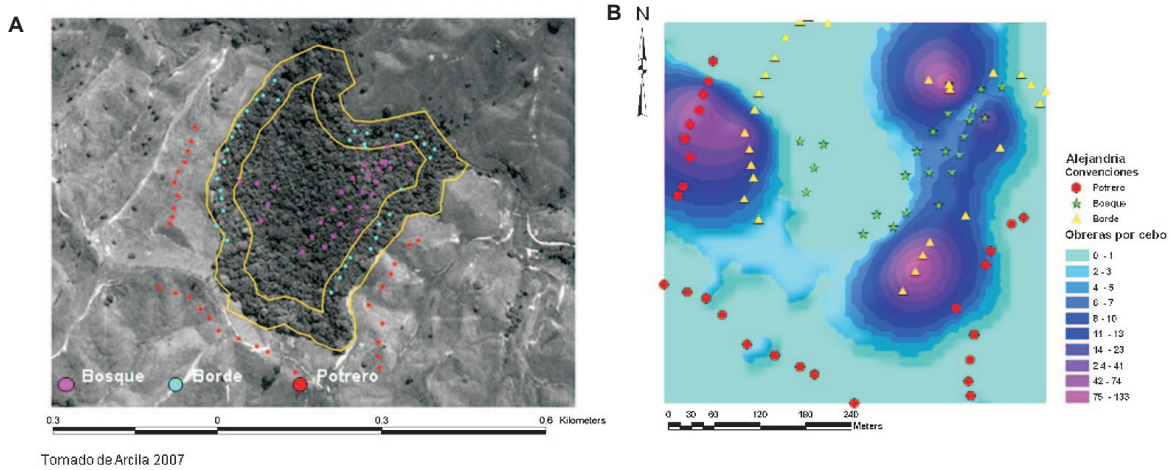


Figura 7. Alejandría. **A.** Mapas de localización estaciones de muestreo. **B.** Mapa de distribución de obreras por cebo y estaciones de muestreo.

En Alejandría, el mapa de distribución de obreras por cebo exhibió tres agregaciones, con agrupaciones hasta de 7 nidos/m², donde es posible que se presenten eventos de agresión intraespecífica y permite ratificar así su estructura social multicolonial, como se predice para su rango nativo. La riqueza de hormigas para este bosque alcanza las 69 especies (Armbrrecht 1995; Armbrrecht 1996; Armbrrecht y Chacón de Ulloa 1997; Lozano-Zambrano 2002), por lo que se podría hipotetizar que la competencia contribuye a regular las poblaciones de la pequeña hormiga de fuego en esta localidad.

Por otro lado, para San Julián, los parámetros del variograma para obreras por cebo, se estimó un rango Ao de 162,4 m (Tabla 1), el cual parece relativamente alto, teniendo en cuenta que la distancia máxima entre dos puntos extremos de la localidad uno ubicado en el potrero al norte y otro en el borde al sur no superaron los 310m, este resultado según Giraldo 2002, es un indicador de fuerte dependencia espacial para el caso considerado. Dada la estructura social unicolonial para el bosque de San Julián discutida anteriormente, se puede establecer que para la variable obreras por cebo, las

distancias hasta de 162,4m desde la esquina sureste, corresponderá a hormigas de la misma supercolonia.

Para Alejandría el valor del rango para obreras por cebo fue de 137,3m (Tabla 1), y la distancia entre las tres agregaciones fueron de 319,4m, 481,1m y 373,24m, mayores que el rango, lo que permitiría establecer que son colonias independientes, con lo que se estaría corroborando la naturaleza multicolonial discutida anteriormente para esta localidad.

Es posible que la perturbación y aislamiento de los bosques secos del valle geográfico del río Cauca, provoquen cambios demográficos en la pequeña hormiga de fuego y en el resto del ensamblaje de hormigas. Tres factores podrían explicar la dominancia de la pequeña hormiga de fuego: una de carácter genético, otra relacionada con su organización social y una tercera de carácter ecológico, relacionada con la perturbación humana mediante análisis con microsatélites en poblaciones nativas de *W. auropunctata* sugirieron que la dominancia de esta hormiga está relacionada con la perturbación humana (Foucaud *et al.* 2009). Foucaud y colegas (2009) mediante análisis con microsatélites en poblaciones nativas de *W. auropunctata*

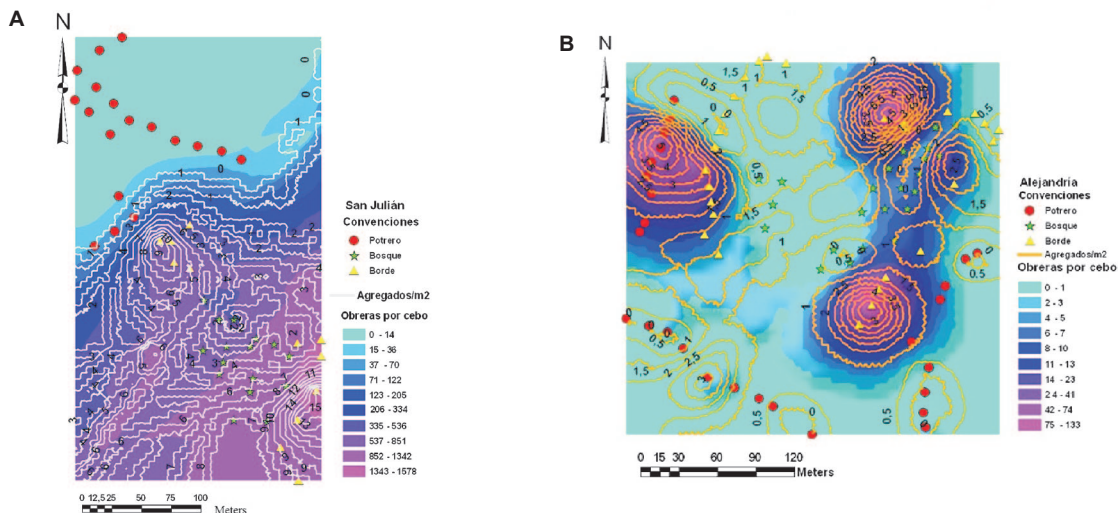


Figura 8. Mapas de distribución de obreras por cebo vs. Isolineas de nidos/m². **A.** San Julián **B.** Alejandría.

sugirieron que la dominancia de esta hormiga está relacionada con la perturbación humana. En el presente estudio, el parche de bosque San Julián ubicado al sur del área de estudio, ha sido uno de los más perturbados con una fragmentación severa, causada por la enorme intervención antrópica, y labores productivas más intensas (Arcila 2007). Además, este bosque es uno de los que mayor índice de aislamiento presentan (Arcila 2007).

El deterioro ambiental de los bosques se manifiesta al comparar dos estudios separados por diez años. Armbrrecht (1996), reportó una extensión de 6 hectáreas para San Julián, mientras que Arcila (2007) reportó 3,5 hectáreas para este mismo bosque. Además, la zona exhibe paisajes convertidos en guaduales y monocultivos de caña de azúcar, y hasta con penetración de ganado. Al tratarse de un bosque muy perturbado, hay un aumento de ramas y troncos caídos los cuales son aprovechados eficientemente por *W. auropunctata* para anidar (Armbrrecht y Ulloa-Chacón 2003), lo que posiblemente contribuye a elevar su densidad de población. De lo anterior se puede concluir, que la connotación de *W. auropunctata* como especie vagabunda, que es atraída hacia hábitats perturbados (Fowler *et al.* 1990), es soportada por Armbrrecht y Ulloa-Chacón (2003) en un estudio sobre el desempeño de la pequeña hormiga de fuego como bioindicadora de la diversidad de otras hormigas. Las investigadoras encontraron que en catorce parches de bosque seco tropical en el valle geográfico del río Cauca (Colombia), los bosques más al sur (San Julián y otro llamado Colindres), fueron menos diversos y exhibieron las más altas abundancias de *W. auropunctata*, no tuvieron barreras protectoras en el borde del bosque y mostraron más signos de penetración humana y de ganado en su interior afectando la vegetación del sotobosque y calidad del suelo. Los anteriores resultados fueron corroborados posteriormente para los mismos bosques por Achury *et al.* (2012).

Es digno de atención que precisamente aquellos bosques en los cuales *W. auropunctata*, y no especialmente otras especies de hormigas fue dominante, eran los menos diversos. Se sospecha que la tendencia de las poblaciones de esta hormiga a crecer en la dirección norte - sur en la zona de estudio, se debió precisamente a su preferencia por ambientes perturbados, con matrices manejadas intensamente en las cuales la transformación hacia monocultivos de azúcar está tomando lugar.

Conclusiones

Este estudio corrobora una vez más el valor de usar herramientas de la Geoestadística para el modelamiento de fenómenos biológicos (Rossi *et al.* 1992; Díaz y Casar 2004) tales como la densidad y distribución espacial de *W. auropunctata*. El modelo permitió revelar características en su rango nativo que explican por qué la especie es invasora en otros continentes o en islas. La obtención de una estructura de correlación espacial permite establecer si la escala y los métodos de muestreo utilizados fueron los apropiados en éste. Se logró evidenciar como en el parche de bosque de San Julián, que presenta la mayor intervención humana, la hormiga presenta una estructura social unicolonial, con altísima densidad (33 veces más que Alejandría) y tendencia a alcanzar los bordes. En contraste, la estructura social de *W. auropunctata* es multicolonial en el bosque de Alejandría, que es uno de los bosques más conservados del valle geográfico, y en este caso

la hormiga se comporta espacialmente conforme con lo predicho para su rango nativo.

Agradecimientos

A María Dolly García y Gladys Elena Salcedo por su invaluable asesoría académica. A los grupos de investigación GEADES de la Universidad Autónoma de Occidente; Biología, Ecología y Manejo de Hormigas de Universidad del Valle, GEAHNA de Universidad del Valle por sugerencias durante el estudio. Este estudio fue parcialmente financiado por la Universidad Autónoma de Occidente y el Instituto Alexander von Humboldt (obtención datos de campo).

Literatura citada

- ACHURY, R.; CHACÓN DE ULLOA, P.; ARCILA, A. 2012. Effects of the heterogeneity of the landscape and the abundance of *Wasmannia auropunctata* on ground assemblages in a Tropical Dry Forest. *Psyche*. Doi:10.1155/2012/960475.
- ARCILA, A.M. 2007. Determinantes paisajísticos de la dinámica poblacional de la pequeña hormiga de fuego *Wasmannia auropunctata* (Roger) en fragmentos de bosque seco tropical. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad del Valle, Cali, Colombia. 125 p.
- ARMBRECHT, I. 1995. Comparación de la mirmecofauna en fragmentos boscosos del Valle geográfico del río Cauca, Colombia. *Boletín Museo de Entomología Universidad del Valle* 3(2): 1-14.
- ARMBRECHT, I. 1996. Análisis de la diversidad del ensamblaje de hormigas en fragmentos de bosque seco en el Valle del Cauca, Colombia. Tesis de Maestría en Biología. Universidad del Valle. Cali. 130 p.
- ARMBRECHT, I.; ULLOA - CHACÓN, P. 2003. The Little Fire ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) as a diversity Indicator of Ants in Tropical Dry Forest Fragments of Colombia. *Environmental Entomology* 32 (3): 542-547.
- ARMBRECHT, I.; CHACÓN DE ULLOA, P. 1999. Rareza y diversidad de hormigas en fragmentos de bosque seco colombianos y sus matrices. *Biotrópica* 31: 646-653.
- ARMBRECHT, I.; CHACÓN DE ULLOA, P. 1997. Composición y diversidad de hormigas en bosques secos relictuales y sus alrededores, en el Valle del Cauca, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 23: 45-50.
- BROWN, K. S. Jr. 1991. Conservation of neotropical environment, insects as indicators, pp. 305-404. En *Conservation of insects and their habitats*. Collins, N. M.; Thomas, J. A. (eds.). Academic Press. San Diego.
- BURBIDGE, A. H.; LEICESTER, K.; MCDAVITT, S.; MAJER, J. D. 1992. Ants as indicators of disturbance at Yanchep National Park, Western Australia. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 75: 89-95.
- CAMBARDELLA, C.; MOORMAN, T.; NOVAK, J.; PARKIN, T.; KARLEN, D.; TURCO, R.; KONOPKA, A. 1994. Field scale variability of soil properties in central Iowa soils. *Soil Science Society of American Journal* 58: 1501-1511.
- CARROL, S. S.; PEARSON, L. 2000. Detecting and modeling spatial and temporal dependence in conservation biology. *Conservation Biology* 14 (6): 1893-1897.
- CHACÓN DE ULLOA, P.; ARMBRECHT, I. 2006. Las hormigas del ecosistema bosque seco tropical. Tomo II, pp. 345-351. En Chávez, M. E.; Santamaría, M. (eds.). *Informe Nacional sobre el Avance en el Conocimiento y la Información de la Biodiversidad 1998-2004*. Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D.C., Colombia. 2 Tomos.
- CLARK, D. B.; GUAYASAMÍN, C.; PAZMINO, O.; PAEZ DE VILLACÍS, Y. 1982. The tramp ant *Wasmannia auropunctata*: au-

- toecology and effects on ant diversity and distribution on Santa Cruz Island, Galápagos. *Biotrópica* 14: 196-207.
- CVC. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca. 1990. Comparación de la cobertura de bosques y humedales entre 1957 y 1986 con delimitación de las comunidades críticas del valle geográfico del río Cauca. Informe. Cali. 49 pp.
- DÍAZ-FRANCÉS, E. 1993. Introducción a Conceptos Básicos de geoestadística. Memorias seminario Estadística y Medio Ambiente. Centro de Investigación en Matemáticas, CIMAT, Guanajuato. México.
- DIAZ-VIERA, M. A.; CASAR-GONZÁLEZ, R. 2004. Geoestadística aplicada. Tema: Geoestadística fractal. [online] [consultado 2 julio, 2011] Available from World Wide Web: (URL: <http://132.248.182.189/cursos/geoest/Presentaciones/CG8a.pdf>).
- DIDHAM, R. K.; HAMMOND, P. M.; LAWTON, J. H.; EGGLETON, P.; STORK, N. E. 1998. Beetle species responses to tropical forest fragmentation. *Ecological Monographs* 68: 295-303.
- DIDIER, G.; LOZANO, F.; OSPINA, J. L.; QUICENO, M. P. 2001. Plan de acción regional en biodiversidad para norte de Santander. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Cúcuta, 200 p.
- ESRI® ARCGIS™ 9.0 GIS and mapping software.
- FOUCAUD, J.; ORIVEL, J.; FOURNIER, D.; DELABIE, J. H. C.; LOISEAU, A.; LE BRETON, J.; CERDAN, P.; ESTOUP, A. 2009. Reproductive system, social organization, human disturbance and ecological dominance in native populations of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata*. *Molecular Ecology* 18 (24): 5059-5073.
- FOWLER H. G.; BERNARDI, J.; DELABIE, J.; FORTI, L.; PEREIRA DA SILVA, V. 1990. Major ant problems in South America. pp. 3-14. In *Applied myrmecology: A world perspective*. Vander Meer, R.K.; Jaffe, J.; Cedeño, A., (eds). Westview press. Inc Boulder, Colorado.
- GIRALDO, H. R. 2002. Introducción a la Geoestadística. Teoría y aplicación. Universidad Nacional de Colombia. Simposio de Estadística. 250 p.
- GS+ Geostatistics for the Environmental Sciences Version 5.1. Gamma Design Software 1982- 2002 Stanford Center for reservoir Forecasting.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. 1990. The ants. Springer – Verlag, Berlin. 450 p.
- HURTADO, H.; SALCEDO, G. E.; SERRANO, A. J. 1996. Modelos Estadísticos para información autocorrelacionada. Cuadernos de Biomatemáticas 2. Universidad de Quindío. 60 p.
- HURTADO, L. H.; SALCEDO, G. E.; GARCÍA, M. D. 2007. Design and validation of an optimal network for monitoring the Water quality in a hydrological system: A case study. Proceedings. of the 2006 International of Mathematical and Computational Biology. Biomat 2006 322-336. E - paper serviços editorial is Ltda. Rio de Janeiro - Brasil.
- IAvH, 1998. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Informe Nacional sobre el estado de la biodiversidad 1997 - Colombia. Bosque seco tropical, pp. 56-71. En Chávez, M.E.; Arango, N. (eds.). Tomo I: Diversidad Biológica. Instituto Humboldt, PNUMA, Ministerio del Medio Ambiente, vol. 3. Santafé de Bogotá, Colombia.
- ISAACS, E. H.; SRIVASTAVA, R. M. 1989. An introduction to applied geostatistics. Oxford University Press, New York.
- KATTAN, G. H. 2002. Fragmentación: patrones y mecanismos de extinción de especies, pp. 561-590. En Guariguata, M.R.; Kattan, G.H. (eds.). Ecología y conservación de bosques. Libro Universitario Regional. Editorial Tecnológica de Costa Rica.
- KOTZE, D.; SAMWAYS, M. J. 2001. No general edges effects for invertebrates at Afromontane forest / grassland ecotones. *Biodiversity and Conservation* 10: 443-446.
- KREMEN, C.; COLWELL, R. K.; ERWIN, T. L.; MURPHY, D. D.; NOSS, R. F.; SANJAYAN, M. A. 1993. Terrestrial arthropod assemblages: their use in conservation planning. *Conservation Biology* 7: 796-808.
- LAURANCE, W. F.; VASCONCELOS, H. L. 2001. Ecological Effects of Habitat Fragmentation in the Tropics, pp. 33 -49. En Schroth G.; Da Fonseca, G. A. B.; Harvey, C. A.; Gascon, C.; Vasconcelos, H. L.; Izac, A. M. N. (eds.). *Agroforestry and Biodiversity Conservation in Tropical*. Island Press.
- LE BRETON, J.; DELABIE, J. H. C.; CHAZEAU, J.; DE JEAN, A.; JOURDAN, H. 2004. Experimental evidence of Large - scale unicoloniality in the tramp ant *Wasmannia auropunctata* (Roger). *Journal of Insect Behavior*. 17 (2): 263-271.
- LIEBHOLD, A. M.; ROSSI, R. E.; KEMP, W. P. 1993. Geostatistics and geographic information systems in applied insect ecology. *Annual Review of Entomology* 38: 303-327.
- LÓPEZ, M. P. 2005. Colonias de *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) Composición y agresividad en biotopos con diferente grado de perturbación en el Valle del Cauca. Trabajo de grado. Programa de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad del Valle. Cali, Colombia. 55 pp.
- LOZANO-ZAMBRANO, F. H. 2002. Hormigas, diversidad y relaciones especies/área en fragmentos de bosque seco Tropical- Tesis de Maestría. Programa de postgrado en Ciencias - Biología. Facultad de Ciencias. Universidad del Valle, Cali - Colombia.
- MORAL, F. J. 2004. Aplicaciones de la Geoestadística en las Ciencias Ambientales. [online] [consultado 2 julio, 2006] Ecosistemas 2004/1 Available from World Wide Web: (URL: <http://www.aet.org/ecosistemas/041/revision3.htm>).
- NORDMEYER, H. 2009. Spatial and temporal dynamics of *Apera spica-venti* seedling populations. *Crop Protection*. 28 (10): 831-837.
- PASSERA, L. 1994. Characteristics of tramp species, pp. 23-41. En Williams, D.F. (eds.). *Exotic Ants Biology, impact and control of Introduced species*. Westview Studies in Insect Biology. Boulder. Colorado.
- PHILPOTT, S. M., I. PERFECTO, I.; ARMBRECHT, I.; C. L. 2010. Effects of disturbance and habitat transformation on ant diversity and function. Chapter 8. Pag. 137-156 En: L. Lach, C. Parr & K, Editors. *Abbott Ant Ecology*. Oxford University Press. Oxford, UK.
- RAMÍREZ - DÁVILA, J. F.; PORCAYO-CAMARGO, E. 2008. Distribución espacial de las ninfas de *Jacobiasca lybica* (Hemiptera: Cicadellidae) en un viñedo de Andalucía, España. *Revista Colombiana de Entomología* 34 (2): 169-175.
- RAMÍREZ - DÁVILA, J. F.; GONZÁLEZ - ANDUJAR, J. L.; LÓPEZ - MARTÍNEZ, M. A.; OCETE, R. 2005. Modelización y mapeo de la distribución espacial de las ninfas del mosquito verde *Jacobiasca lybica* (Bergenin & Zanon) (Hemiptera: Cicadellidae) en viñedo modelización y mapeo. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 31: 119-132.
- ROBERTSON, G. P. 1987. Geostatistics in Ecology: Interpolating with known variance. *Ecology* 68 (3): 744-748.
- ROSSI, R. E.; MULLA, D. J.; JOURNAL, A. G.; FRANZ, E. H. 1992. Geostatistical tools for modelling and interpreting ecological spatial dependence. *Ecological Monographs*, 62 (2) pp. 277-314.
- SALGUERO, B. 2008. “Modelación matemática de la distribución espacial de *Wasmannia auropunctata* (Roger) y su relación con el hábitat en parches de bosque seco tropical en el valle geográfico del río Cauca” Tesis de Maestría. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. 235 p.
- SAMPER, F. J.; CARRERA, J. 1990. Geoestadística. Aplicaciones a la Hidrogeología Subterránea. Centro Internacional de Métodos Numéricos en Ingeniería. Universidad Politécnica de Catalunya. Barcelona. 250 p.
- SILBERGLIED, R. 1972. The little fire ant, *Wasmannia auropunctata* serious pest in the Galapagos Island. *Noticias de Galápagos* 19/20: 13-15.
- STATGRAPHICS 5 PLUS 2000. A manugistic product. Statistical Graphics Corporation.

- TAYLOR, L. R. 1984. Assessing and interpreting the spatial distributions of insect populations - Annual Review of Entomology 29: 321: 357.
- ULLOA - CHACÓN, P. 1990. Biologie de la reproduction chez la petite fourmi de feu *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae). Tesis de doctorado. University de Lausanne. 161 p.
- ULLOA-CHACÓN, P.; CHERIX, D. 1990. The little Fire Ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae), pp. 281-289 In: Vander Meer, R. K.; Jaffe, K.; Cedeño, A. (eds.). Applied Myrmecology: a world perspective. Westview Press, Boulder, Colorado.
- VELASCO, L. M. 1982. Historia del hábitat vallecaucano 1536-1982. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC, Cali Colombia. 105 pp.
- WETTERER, J. K.; PORTER, S. D. 2003. The little fire ant, *Wasmannia auropunctata* (Roger): distribution, impact and control. Sociobiology 42: 1-41.
- WETTERER, J. K.; WALSH, P. D.; WHITE, L. J. T. 1999. *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae), a highly destructive tramp ant, in wildlife refuges of Gabon. West Africa. African Entomology 7: 292-294.
- ZAS, R. 2006. Consecuencias de la estructura especial en el diseño y análisis de experimentos en campo. [online] [citado 2 julio, 2006] Ecosistemas 15 (3): 107-114. Available from World Wide Web: (URL: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=434>).

Recibido: 3-mar-2011 • Aceptado: 30-oct-2011

Within tree distribution of a discoid gall on *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae)

Distribución de una agalla discoide en el dosel de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae)

GERMANO LEÃO DEMOLIN LEITE¹, ALINE FONSECA DO NASCIMENTO², FABIENE MARIA DE JESUS¹, SÉRGIO MONTEZE ALVES¹, and GERALDO WILSON FERNANDES²

Resumen: Se evaluó la distribución de agallas discoide en el dosel de *Caryocar brasiliense* en dos áreas de pastos y cerrado. El mayor número de agallas discoide se observó en el cerrado. Más agallas discoide se encuentran en la cara noreste, mientras que menor número se observaron en el follaje hacia el sur en la sabana. Sin embargo, en un potrero, el menor número de agallas discoide se observó en la cara este. Más agallas discoide se encuentran en las hojas de interior de la copa (hojas uno y dos) que en el borde (hojas tres y cuatro), especialmente en la posición de la hoja tres en el cerrado. Hojas de posición tres y cuatro reportan 83,6% de todas las agallas en la muestra. Este insecto cambia su comportamiento en potreros, atacando más en la segunda hoja y en este caso, las hojas de posición tres y cuatro llevaban el 32,8% de todas las agallas en la muestra. En sabana y pastizales se encontraron más agallas discoide en la línea media en comparación con la porción distal y proximal al eje longitudinal de las láminas en una. La agalla discoide prefiere colonizar la parte central de la hoja o cerca de la vena principal de las hojas en toda la región en una pradera. En el cerrado, este insecto sigue la misma tendencia, pero quizás debido a una mayor población, se extendió sobre la hoja.

Palabras clave: Sabana. Insectos agalla. Pequi. Hymenoptera. Competencia.

Abstract. We recorded the discoid gall spatial distribution within *Caryocar brasiliense* trees in two areas of pasture and one of savanna. A higher number of discoid gall/leaflet was observed in savanna than in the pastures. More discoid galls were found on the eastern slope trees followed by the northern slope trees while fewer galls were found on the foliage in the southern slope trees in savanna. However, in the pasture one, the lower discoid galls were observed on the eastern slope. More discoid galls were found on the leaves in the interior (leaves one and two) of the tree crown than at the border (leaves three and four), principally in the leaf position three in savanna. Leaf positions three and four supported 83.6% of all galls sampled. On the other hand, this insect changed its behavior in pasture one, attacking more the second leaf and, in this case, leaf positions three and four supported 32.8% of all galls sampled. More discoid galls were found on the median region compared to the distal and proximal longitudinal regions on leaflet in savanna and in pasture one. The discoid gall insect preferred colonized the central portion than the border portion or near mid vein on transversal regions on a leaflet in the pasture one. In the savanna, followed the same trend, but perhaps due to greater population, the discoid galls have spread more evenly by the leaf of the tree.

Key words: Cerrado. Insect galls. Pequi. Hymenoptera. Competition.

Introduction

Insect galls are known to distribute differentially within host organs. Many galling larva achieve higher density, size, and even higher fitness at the proximal portion compared to more distal portion of the leaf due to be the more rapid and efficient interception of plant photosynthates at the leaf base (Auslander *et al.* 2003; Leite *et al.* 2009). In a similar way, galls are also more abundant and larger at the basal portion of the stems of its host plant perhaps due to stronger sinks in this region of the plant (De Souza *et al.* 2001). On the other hand, more galls of *Eurytoma* sp. (Hymenoptera: Eurytomidae) were found on the median region of the leaf compared to the distal and proximal areas of *Caryocar brasiliense* Cambess. (Caryocaraceae) leaves maybe due to the lower density of trichomes in this portion (Leite *et al.* 2009). Leaf trichomes are known to have a strong influence on the behavior, selection, and fitness of insect herbivores (Agrawal 2004; Leite *et al.* 2009).

Galling larva achieve higher density at leaf margin compared to more central portion of the leaf, like observed for *Eurytoma* sp. galls in leaves of *C. brasiliense* (Leite *et al.* 2009), although the density of trichomes are higher on the leaf margin than on the other transversal leaf portions (Leite

et al. 2009), extra floral nectaries were also mostly frequent on the leaf margins (Rezende 1998). The role of extra floral nectaries on the host plant interaction with galling insects is not well known (Lach and Hoffmann 2011). Otherwise, Leite *et al.* (2009) postulated that they might influence the *Eurytoma* sp. female preference as they may have an indirect positive role in protecting the galling insects against natural enemies by attracting ants. Ants were reported to be associated with extra floral nectaries of *Caryocar* (Oliveira 1997) and in the studied plants they were commonly seen associated with the leaf extra floral nectaries.

The position of the leaves in the stems can also affect the colonization of gall insects. More *Eurytoma* sp. galls were found on the leaves of *C. brasiliense* in the interior of the tree crown than at the border, i.e. leaf positions three and four supported 66.7% of all galls sampled (Leite *et al.* 2009). Several mechanisms may influence the trend found. First, differential mortality caused by parasitoids, predators, and even differential plant resistance could diminish the galling success on the more proximal region of the stems (Leite *et al.* 2009). Even if females prefer leaves at the border, stronger selective pressures would impair their success at such habitat (Leite *et al.* 2009). An alternative hypothesis is that the most distal leaves (leaves one and two) were too young to be found by

¹ Insetário G.W.G. de Moraes, ICA/UFMG, CP: 135. Montes Claros, MG, Brasil. Endereço eletrônico: gldleite@ig.com.br. Autor para correspondencia. D.Sc., M.Sc., D.Sc., and M.Sc., respectively. ² Ecologia Evolutiva & Biodiversidade/DBG/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil. PhD.

the galling insects while leaves three and four were exposed to galling for a longer period (Leite *et al.* 2009). The last hypotheses can explain this trend is the microclimatic differences between the interior of the tree crown and the border.

Insect galls may also distribute differentially between habitats as well as within the host crown. Plants in sunny habitats are known to support higher density of galls compared to plants in shaded habitats (Fernandes and Price 1992; Auslander *et al.* 2003; Leite *et al.* 2009) due to sun exposure may influence the quality of the host plant tissue as well as the gall tissue or even the plant ability to find and elicit induced responses to the invading organism (Fernandes *et al.* 2000, 2005). Furthermore, natural enemies could also be strong selective forces against galling on more favorable, shaded habitats (Fernandes and Price 1992). Therefore, differential selection could lead to female preference and larval fitness for foliage in sunny habitats. More *Eurytoma* sp. galls were found on the eastern slope tree compared to the other slopes tree while fewer galls were found on the foliage in the northern slope of *C. brasiliense* tree maybe due to the dispersion by winds (Leite *et al.* 2009). These authors postulated that the foliage on the eastern slope of the host trees are the most exposed to higher winds and strong sunlight in the South Hemisphere.

Caryocar brasiliense Camb. (Caryocaraceae) is one of the most common and important plant species in the dry and harsh semi arid vegetation of Brazil, called cerrado (Leite *et al.* 2006). It is host to a large number of invertebrate and vertebrate herbivores (Oliveira 1997; Leite *et al.* 2011) as the gall insects (Oliveira 1997; Leite *et al.* 2009), showing four species of leaf galls in the cerrado of northern Minas Gerais State, Brazil.

In an effort to initiate ecological studies in this system, we obtained the first data on spatial distribution of a discoid galling insect (Hymenoptera) (Fig. 1) at the tree level aimed at sampling because this plant has been domesticated for future commercial plantations. This gall is discoid with 3.70

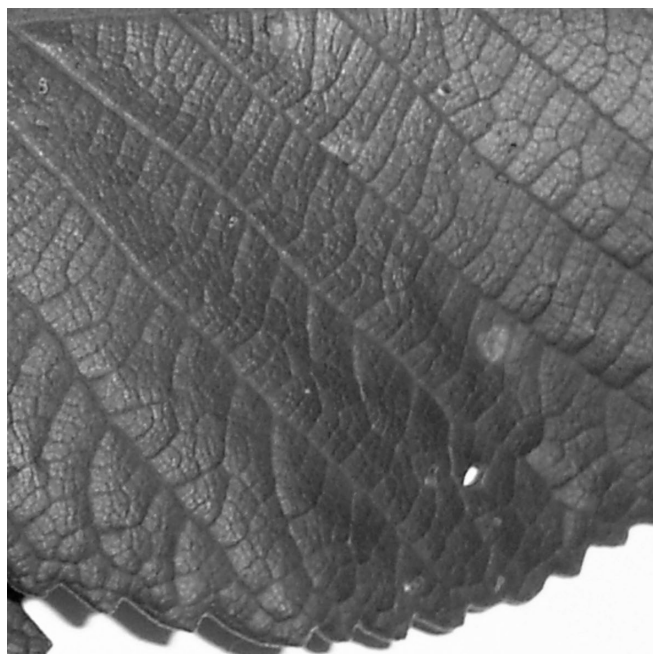


Figure 1. Discoid galls on *Caryocar brasiliense* leaflet.

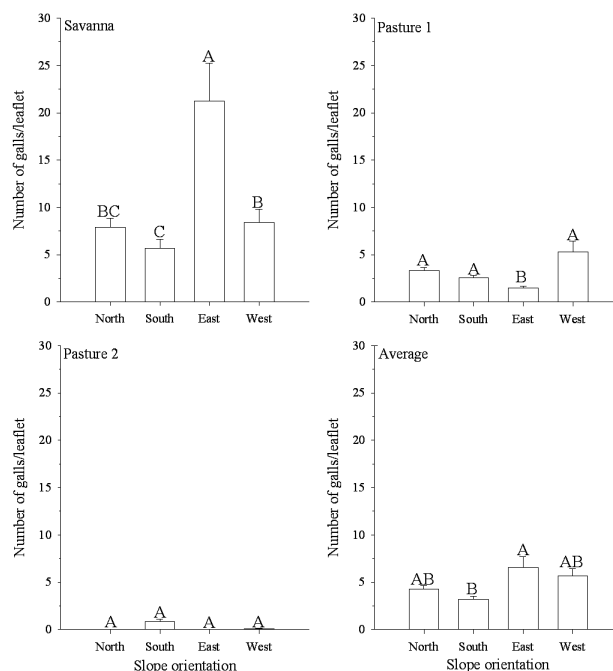


Figure 2. Number of discoid galls induced according to stem orientation on *Caryocar brasiliense* leaves. Averages followed by the same letters did not differ statistically at $P < 0.05$ (Tukey test). The bars represent the standard error.

mm² of diameter and 0.57 mm of height, without hairs, its color is light green, and located between the leaf veins (Fig. 1). As *C. brasiliense* has three leaflet compound leaves we firstly asked whether gall abundance would differ among the leaflets on a single leaf. Second, we studied the effect of foliage slope orientation on gall abundance. A third analysis addressed the distribution of the galls on the leaves along the host stem (within tree). Fourthly, because the grouping of galls on a given leaf portion may indicate site preference, we analyze the within leaf (longitudinal) distribution of galls, and addressed the transversal zonation of discoid galls within leaves. Finally we studied the differences among areas of pasture and savanna.

Material and Methods

This work was developed in one savanna and two pastures (prior savanna) of the Municipality of Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil in April, June, August and October 2006, where the average temperatures were 22.5, 19.0, 22.3 and 23.5°C; air relative humidity 80.0, 68.0, 54.0 and 78.0%, month round accumulated precipitation of 211.5, 0.3, 3.8 and 279.0mm; winds prevailed from the northeast at an average speed of 1.60, 1.70, 2.10 and 2.0m/s; insolation 7.21, 8.3, 9.4 and 4.7h, respectively, obtained from the main climate station of Montes Claros of the “Estação Nacional de Meteorologia” (see Leite *et al.* 2006). The north of Minas Gerais State has a climate Aw: tropical of savanna, according to the classification of Köppen, with dry winter and rainy summer (Vianello & Alves 2000). The areas studied were: savannah vegetation *stricto sensu*, pasture 1 (in activity) and pasture 2 (abandoned pasture = savanna in recovery). These areas show different characteristics of soil and floristic diversity. The geographical coordinates, altitude, soil type, physiochemical characteris-

tics of the soil, floristic density, height and width of the crown as well as diameter at breast height of *C. brasiliense* were published in Leite *et al.* (2011).

As the discoid gall density on *C. brasiliense* leaves is highly variable among trees - (data not published), we chose 10 trees per area that had the discoid gall infestation. To evaluate the distribution of discoid galls within the tree crown we recorded the number of galls on the compound leaves of *C. brasiliense* of four randomly selected stems positioned on north, south, east, and west slope trees of ten adult trees per area. To evaluate the distribution of discoid galls among the leaflets we recorded: i) gall abundance according to foliage orientation (slope); ii) the differential abundance of galls on the right, central and left leaflets (Leite *et al.* 2009); iii) gall abundance on the distal, median, and proximal region of a leaflet (see Leite *et al.* 2009); iv) gall abundance on the leaflet border, central area, and adjacent to the mid leaf vein of the leaflet (Leite *et al.* 2009), and v) difference among areas. 1.269 leaflets of 423 leaves in savanna, 3.030 leaflets of 1010 leaves in pasture 1 and 2.613 leaflets of 432 leaves in pasture 2 were censused for discoid galls.

All data were transformed to $\sqrt{x} + 0.5$ and were analyzed by analysis of variance and followed by the Tukey test at the significance level $P < 0.05$.

Results and Discussion

The higher number of discoid galls was observed in savanna (10.86 ± 1.17 A - Tukey test), followed by pasture one (3.17 ± 0.31 B) and pasture two (0.23 ± 0.08 C) ($F=76.955$; $df=1563$; $P < 0.001$). The pasture one (in activity) has less floristic diversity (< trees, groves, shrubs and herbs) and more soil covering by grass than pasture two - savanna in recovery - and

savanna, without differences between last two areas (Leite *et al.* 2011). Savanna has less *C. brasiliense* per hectare than the pastures and these trees are higher in pasture one than other areas (Leite *et al.* 2011). In addition, the soils in the pasture one and savanna are more acid, pasture one is richer in aluminum and sum of bases and less sandy than the other areas (Leite *et al.* 2011). Perhaps these variables can explain the difference in density of the discoid gall among savanna and pastures studied (Fernandes and Price 1988, 1992; Gonçalves-Alvim and Fernandes 2001; Fernandes *et al.* 2005). With the increase in the floristic diversity increases the diversity of leaf galls species (total four species) on *C. brasiliense* as well as increased the density of other galls while decreases that of *Eurytoma* sp. (Hymenoptera: Eurytomidae), the most abundant species (unpublished data). Moreover, in the pasture one had more galls of *Eurytoma* sp. (~ 3 /leaflet) than the savanna (~ 0.8 /leaflet) (unpublished data) and pasture two ~ 0.3 /leaflet, (Leite *et al.* 2009). Maybe this fact is due to a competition between discoid gall and *Eurytoma* sp. explaining why we observed more discoid gall in savanna than in the pastures.

We did not find significant differences in the distribution of discoid galls in pasture two ($P > 0.05$) according to slope orientation of the tree crown, leaf position in the branches, longitudinal and transversal regions on a leaflet on *C. brasiliense* (Figs. 2-6) probably due to the low density of this gall in this area. On the other hand, more discoid galls were found on the eastern slope tree followed the northern slope tree while fewer galls were found on the foliage in the southern slope tree in savanna ($F=8.477$; $df=408$; $P < 0.001$), and in the pasture one, the lower discoid galls were observed on the eastern slope tree ($F=8.076$; $df=1004$; $P < 0.001$) (Fig. 2). Leite *et al.* (2009) observed more *Eurytoma* sp. galls on

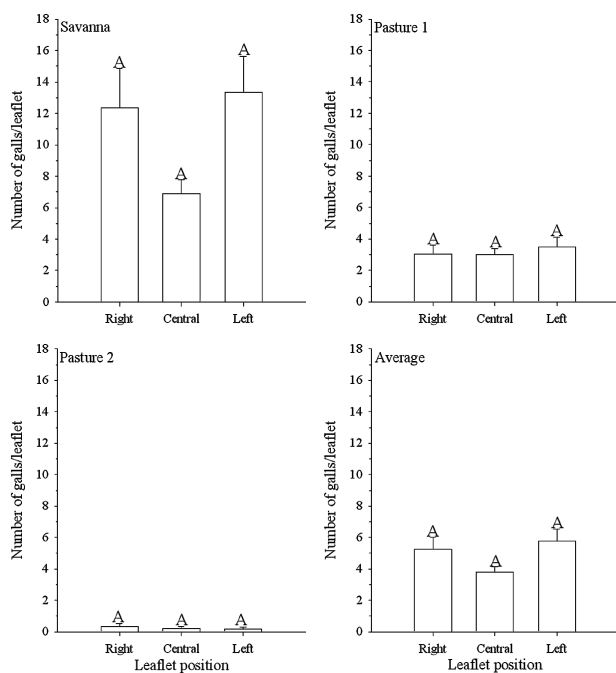


Figure 3. Number of discoid galls induced according to position leaflet on *Caryocar brasiliense* leaves. Averages followed by the same letters did not differ statistically at $P < 0.05$ (Tukey test). The bars represent the standard error.

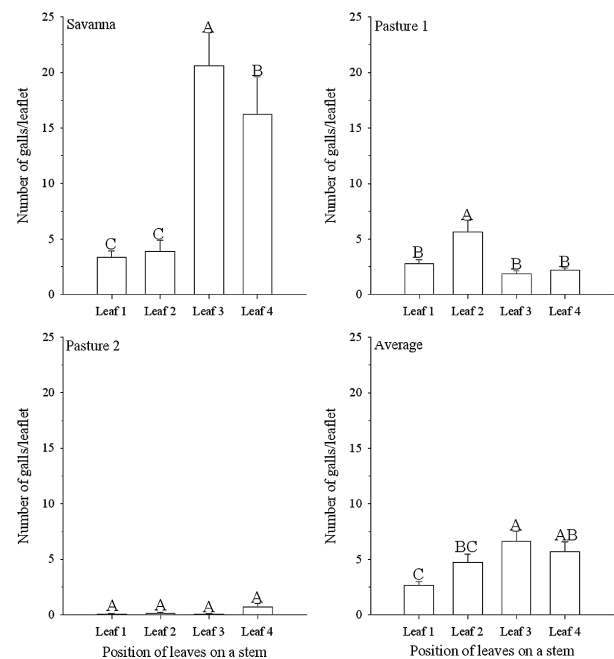


Figure 4. Number of discoid galls induced according to position leaves on *Caryocar brasiliense* stem. Averages followed by the same letters did not differ statistically at $P < 0.05$ (Tukey test). The bars represent the standard error.

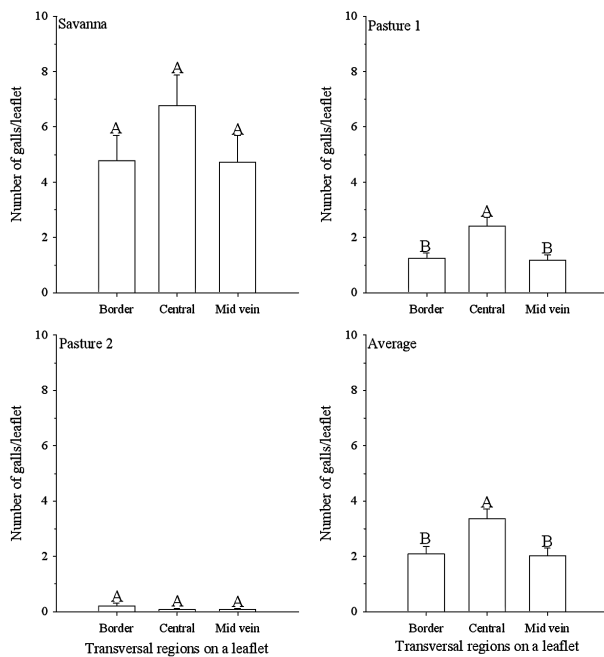


Figure 5. Number of discoid galls induced according to transversal regions on *Caryocar brasiliense* leaflet. Averages followed by the same letters did not differ statistically at $P < 0.05$ (Tukey test). The bars represent the standard error.

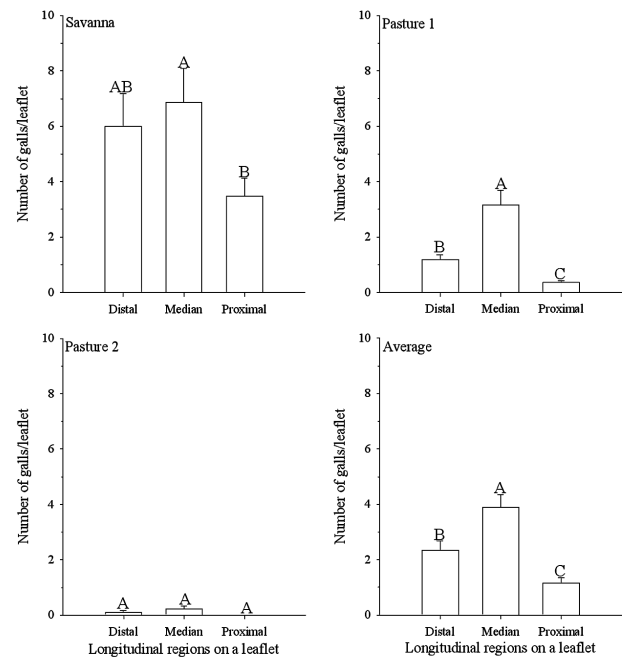


Figure 6. Number of discoid galls induced according to longitudinal regions on *Caryocar brasiliense* leaflet. Averages followed by the same letters did not differ statistically at $P < 0.05$ (Tukey test). The bars represent the standard error.

the eastern slope tree compared to the other slopes tree while fewer galls were found on the foliage in the northern slope of *C. brasiliense* tree maybe due to the dispersion by winds. Leite *et al.* (2009) postulated that the foliage on the eastern slope of the host trees are the most exposed to higher winds and strong sunlight, since prevalent winds in the region are northeaster/eastern (Leite *et al.* 2006), corroborating previous findings in which galling insects are most abundant on sunlight-exposed foliage (Fernandes and Price 1988). Why did the discoid gall show different behaviors in the savanna and pasture one? Perhaps the answer is to avoid competition with the major galling insect on *C. brasiliense* leaves, the *Eurytoma* sp.

The average number of discoid galls did not differ statistically among the three leaflets of *C. brasiliense* in the three areas studied ($P > 0.05$) (Fig. 3). The same result was obtained by Leite *et al.* (2009) with *Eurytoma* sp.. More discoid galls were found ($F=45.508$; $df=408$; $P < 0.001$) on the leaves in the interior of the tree crown than at the border, principally in the leaf position three in savanna. Leaf positions three and four supported 83.6% of all galls sampled (Fig. 4). On the other hand, this insect changed its behavior in the pasture one, attacking more ($F=7.679$; $df=1004$; $P < 0.001$) the second leaf and, in this case, leaf positions three and four supported 32.8% of all galls sampled (Fig. 4), maybe avoiding or reducing the competition with *Eurytoma* sp., since this last gall insect were found on the leaves of *C. brasiliense* in the interior (leaf three and leaf four) of the tree crown than at the border (Leite *et al.* 2009), being in higher population in pasture one than in savanna (unpublished data). Several mechanisms may influence the trend found in the case of *Eurytoma* sp.. First, differential mortality caused by parasitoids, predators, and even differential plant resistance could diminish the galling success on the more proximal region of the stems (Leite *et al.*

2009). Even if females prefer leaves at the border, stronger selective pressures would impair their success at such habitat (Leite *et al.* 2009). An alternative hypothesis is that the most distal leaves (leaves one and two) were too young to be found by the galling insects while leaves three and four were exposed to galling for a longer period (Leite *et al.* 2009). The last hypotheses can explain this trend is the microclimatic differences between the interior of the tree crown and the border.

More discoid galls were found on the median region compared to the distal and proximal longitudinal regions on leaflet in savanna ($F=5.155$; $df=414$; $P < 0.001$) and in pasture one ($F=58.831$; $df=1006$; $P < 0.001$) (Fig. 5). Similar results were observed for galls of *Eurytoma* sp. maybe due to the lower density of trichomes in this portion (Leite *et al.* 2009). Leaf trichomes are known to have a strong influence on the behavior, selection, and fitness of insect herbivores (Agrawal 2004). Many galling larva achieve higher density, size, and even higher fitness at the proximal portion compared to more distal portion of the leaf or stems because in these areas are more rapid and efficient interception of plant photosynthates, being stronger sinks (De Souza *et al.* 2001; Auslander *et al.* 2003).

The discoid gall insect preferred colonized ($F=31.855$; $df=1005$; $P < 0.001$) the central portion than the border portion or near mid vein on transversal regions on a leaflet in the pasture one (Fig. 6). In the savanna, followed the same trend ($F=3.498$; $df=409$; $P=0.03$), but perhaps due to greater population, the discoid galls have spread more evenly by the leaf of the tree (Fig. 6). Leite *et al.* (2009) postulated that extra floral nectaries, mostly frequent on the leaf margins (Rezende 1998), might influence the *Eurytoma* sp. female preference as they may have an indirect positive role in protecting the galling insects against natural enemies by attracting ants. Ants

were reported to be associated with the leaf extra flora nectaries of *C. brasiliense* (Oliveira 1997) and in the studied plants they were commonly seen associated with the leaf extra floral nectaries (Lach and Hoffmann 2011). The preference of the discoid gall insect attacks the central portion of leaflet than the border portion, where has extra floral nectaries and ants (less natural enemies) maybe due to the higher number of *Eurytoma* sp. galls, principally in pasture one (unpublished data), in the border portion of leaflets (Leite *et al.* 2009), avoiding or reducing the competition with *Eurytoma* sp.

Conclusions

Some mechanisms may influence the fitness of discoid gall in *C. brasiliense* trees. Discoid galls are most abundant in the foliages most exposed to higher winds and strong sunlight (stressed micro area). This galling insect prefers to attack the leaves in the interior of the tree crown than at the border maybe due to natural enemies, differential plant resistance, time of colonization, and microclimatic differences between these parts of the tree crown. Trichomes and competition with others galling insects can effect the colonization of discoid gall because it occurs more on the median region of leaflet where less density of trichomes and *Eurytoma* sp. has.

Cited literature

- AGRAWAL, A. A. 2004. Resistance and susceptibility of milkweed: competition, root herbivory, and plant genetic variation. *Ecology* 85 (8): 2118-2133.
- AUSLANDER, M.; NEVO, E.; INBAR, M. 2003. The effects of slope orientation on plant growth, developmental instability and susceptibility to herbivores. *Journal of Arid Environments* 55 (3): 405-416.
- DE SOUZA, A. L. T.; TANAKA, M. O.; FERNANDES, G. W.; FIGUEIRA, J. E. C. 2001. Host plant response and phenotypic plasticity of a galling weevil (*Collabismus clitellae*: Curculionidae). *Austral Ecology* 26 (2): 173-178.
- FERNANDES, G. W.; PRICE, P. W. 1988. Biogeographical gradients in galling species richness: tests of hypotheses. *Oecologia* 76 (2): 161-167.
- FERNANDES, G. W.; PRICE, P. W. 1992. The adaptive significance of insect gall distribution: survivorship of species in xeric and mesic habitats. *Oecologia* 90 (1): 14-20.
- FERNANDES, G. W.; CORNELISSEN, T. G.; ISAIAS, R. M. S.; LARA, A. F. 2000. Plants fight gall formation: hypersensitivity. *Ciência e Cultura* 52 (1): 49-54.
- FERNANDES, G. W.; GONÇALVES-ALVIM, S. J.; CARNEIRO, M. A. A. 2005. Habitat-driven effects on the diversity of gall-inducing insects in the Brazilian Cerrado. In: Raman, A.; Schaefer, C.W.; Withers, T. M. (eds) *Biology, Ecology, and Evolution of Gall-inducing Arthropods*. Science Publishers Inc., USA, vol. 2, p. 693-708.
- GONÇALVES-ALVIM, S. J.; FERNANDES, G. W. 2001. Biodiversity of galling insects: historical, community and habitat effects in four neotropical savannas. *Biodiversity and Conservation* 10 (1): 79-98.
- LACH, L.; HOFFMANN, B. D. 2011. Are invasive ants better plant-defense mutualists? A comparison of foliage patrolling and herbivory in sites with invasive yellow crazy ants and native weaver ants. *Oikos* 120 (1): 9-16.
- LEITE, G. L. D.; VELOSO, R. V. S.; ZANUNCIO, J. C.; FERNANDES, L. A.; ALMEIDA, C. I. M. 2006. Phenology of *Caryocar brasiliense* in the Brazilian Cerrado Region. *Forest Ecology and Management* 236 (2-3): 286-294.
- LEITE, G. L. D.; VELOSO, R. V. S.; SILVA, F. W. S.; GUANABENS, R. E. M.; FERNANDES, G. W. 2009. Within tree distribution of a gall-inducing *Eurytoma* (Hymenoptera, Eurytomidae) on *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Revista Brasileira de Entomologia* 53 (4): 643-648.
- LEITE, G. L. D.; VELOSO, R. V. S.; ZANUNCIO, J. C.; ALVES, S. M.; AMORIM, C. A. D.; SOUZA, O. F. F. 2011. Factors affecting *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera: Termitidae) nesting on *Caryocar brasiliense* trees in the Brazilian savanna. *Sociobiology* 57 (1): 1-16.
- OLIVEIRA, P. S. 1997. The ecological function of extrafloral nectaries: herbivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae). *Functional Ecology* 11 (3): 323-330.
- REZENDE, M. H. 1998. Anatomia dos órgãos vegetativos, da flor e estruturas secretoras de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae). São Paulo, 1998. 91p. DSc Dissertation. São Paulo, Universidade de São Paulo.
- VIANELLO, R. L.; ALVES, A. R. 2000. Meteorologia básica e aplicações. UFV, Viçosa. 467p.

Received: 23-dec-2010 • Accepted: 19-jul-2011

Ensamblajes estacionales de artrópodos epigeos en un bosque de quebracho (*Schinopsis balansae*) en el Chaco Húmedo

Seasonal assemblages of epigeal arthropods in a quebracho forest (*Schinopsis balansae*) in the Humid Chaco

GUILLERMO A. MONTERO¹, NÉLIDA J. CARNEVALE² y GUSTAVO MAGRA³

Resumen: Los bosques Chaqueños poseen alta heterogeneidad estructural y florística debido a sus condiciones edáficas, sus regímenes de incendio y la intensa explotación forestal a que han sido sometidos. Los artrópodos pueden ser buenos indicadores de la heterogeneidad del hábitat, de la diversidad del ecosistema y del estado de estrés al que está sometido el ambiente. Se realizó una descripción taxonómica y funcional de los ensambles de artrópodos epigeos de la superficie del suelo en un bosque de quebracho. Los muestreos se realizaron en áreas elevadas con bromeliáceas (EB) y en áreas planas con gramíneas (PS). Se usaron trampas pitfall, que capturaron artrópodos durante cinco días consecutivos en tres estaciones del año (primavera, verano e invierno). En primavera se evaluaron distintas características físico-químicas del suelo y el mantillo. Se capturaron 1668 individuos de 78 morfoespecies; las hormigas fueron el taxón más abundante y Coleoptera el de mayor riqueza específica. Las arañas Lycosidae fueron las más abundantes y los Carabidae y Scarabaeidae presentaron mayor riqueza y abundancia entre los Coleoptera. La composición específica, la estructura trófica de los artrópodos epigeos y los grupos funcionales de hormigas difirieron entre estaciones y entre micrositios. El mayor contenido de cenizas y conductividad en los micrositios EB se atribuye al aporte de la hojarasca de arbustos, rica en calcio, magnesio y potasio. Las condiciones físico-químicas de la interfase mantillo-suelo podrían modificar la presencia o la abundancia de algunas especies detritívoras en los diferentes micrositios acelerando los procesos de descomposición de la hojarasca.

Palabras clave: Bosques Chaqueños. Comunidades de artrópodos. Grupos tróficos. Hojarasca. Hormigas.

Abstract: Chaco forests have high structural and floristic diversity, due to their soil conditions, their fire regimes and the intense logging that they have undergone. Arthropods can be good indicators of habitat heterogeneity, ecosystem biodiversity, as well as the stress of the environment. We carried out a taxonomic and a functional description of the epigeal arthropod assemblages of the soil surface in a quebracho forest. Samples were taken in convex areas with bromeliads (EB) and in flat areas with grasses (PS). Pitfall traps were used to capture arthropods for five consecutive days in three seasons (spring, summer and winter). In spring, we evaluated different physical and chemical characteristics of soil and litter. We captured 1668 individuals from 78 morphospecies; the ants are the most abundant taxa and the Coleoptera had the largest species richness. Lycosidae spiders were the most abundant spiders and Carabidae and Scarabaeidae presented the highest abundance among the Coleoptera. The species composition, trophic structure of epigeal arthropods and ant functional groups differed among seasons and between microsites. The higher ash content and conductivity in microsites EB is attributed to the contribution of shrubs leaves, which are rich in calcium, magnesium and potassium. The physical and chemical conditions of the litter-soil interface could determine the presence or abundance of detritivorous species at different microsites, accelerating the processes of litter decomposition.

Key words: Chaco forests. Arthropod communities. Trophic groups. Litterfall. Ants.

Introducción

El Gran Chaco ocupa un área de más de 1.000.000 km² desde los paralelos 15° a 35° S; se extiende por el centro-norte de Argentina, oeste de Paraguay, sureste de Bolivia y una pequeña porción del sureste de Brasil (Cabrera y Willink 1980). En Argentina la mayoría de los autores distinguen dos grandes áreas: un sector occidental seco y otro oriental húmedo, en cuyo extremo austral se encuentra la Cuña Boscosa santafesina (Prado 1993; Barberis et al. 2005). Esta formación se extiende entre los paralelos 28° y 30° 25' S y limita al este con el valle del río Paraná y al oeste con los Bajos Submeridionales (Lewis 1991).

Los bosques de la Cuña Boscosa santafesina presentan una notable heterogeneidad estructural y florística (Barberis et al. 2005), atribuible tanto al tipo de suelo y diferencias espaciales en la topografía como a los regímenes de incendios y de explotación forestal (Lewis 1991; Barberis et al. 1998,

2002). Estos bosques han sido sometidos desde hace décadas a la explotación selectiva e intensiva del quebracho (*Schinopsis balansae* Engl. 1885, Anacardiaceae), cuya finalidad hasta 1960 fue la extracción de taninos para curtiembres (Marino y Pensiero 2003; Morello et al. 2005). El nivel de deforestación alcanzó el 59% en los últimos tres décadas; este proceso se acentuó en los últimos años debido al aumento sostenido de las actividades agrícolas pampeanas con la expansión de sus fronteras y el desplazamiento de la ganadería hacia áreas marginales (Carnevale et al. 2007). La intensificación de la ganadería en estos bosques aumentó su nivel de degradación, debido a diversos efectos asociados al manejo, como el sobrepastoreo, el incremento de la tasa de deforestación y los incendios. El paisaje resultante presenta un alto grado de fragmentación y las áreas boscosas remanentes corresponden sin excepción a bosques secundarios (Alzugaray et al. 2006). En estas áreas las diferencias topográficas condicionan fuertemente a variables como la intensidad lumínica, temperatura

¹ M.Sc. Cátedra de Zoología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Casilla de Correo 14, S2125ZAA Zavalla, Argentina. gmontero@unr.edu.ar Autor para correspondencia. ² Dra. Cátedra de Ecología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario nelincita@gmail.com. ³ Ing. Agrónomo. Cátedra de Edafología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. gmagra@unr.edu.ar

y humedad superficiales del suelo (Espino *et al.* 1983), que a su vez determinan la actividad de la biota edáfica (Martin *et al.* 1994).

Debido a su tamaño pequeño, su gran diversidad y su alta sensibilidad a las variaciones del ambiente, los artrópodos pueden ser buenos indicadores de la heterogeneidad del hábitat, de la diversidad del ecosistema y del estado de estrés al que está sujeto el ambiente (Weaver 1995; Molina *et al.* 1998; Montero 2008). No obstante en Argentina son escasos los estudios de artrópodos al nivel comunitario en áreas boscosas chaqueñas. Sólo se han realizado algunos estudios de comunidades de insectos en bosques xerofíticos de la provincia biogeográfica del Monte (Roig-Juñent *et al.* 2001), del Chaco Seco (Bucher 1974; Gardner *et al.* 1995; Molina *et al.* 1998, 1999) y del Chaco Húmedo (Montero *et al.* 2010; Laffont *et al.* 2007; Bar *et al.* 2008).

Las hormigas constituyen uno de los grupos más abundantes de insectos terrestres (Wilson 1994). Son relevantes tanto en ecosistemas naturales como en ecosistemas muy alterados por la actividad antrópica (Majer 1983) y cumplen una amplia variedad de funciones en los ecosistemas, debido a que tienen un vasto espectro de alimentación, interactúan con numerosas especies de animales y vegetales y utilizan diversos sustratos para su nidificación (Hölldobler y Wilson 1990). Estos insectos son buenos bioindicadores terrestres debido a que son muy sensibles a los cambios ambientales (Alonso y Agosti 2000; Vittar 2008).

El objeto de este trabajo fue: a) identificar la artropofauna epigea de la superficie del suelo, en dos micrositios con estrato herbáceo y topografía diferentes, en un bosque secundario del Chaco Húmedo; b) determinar especies indicadoras y diferenciar la composición específica, riqueza, abundancia y diversidad de los diferentes grupos tróficos de artrópodos, entre micrositios y estaciones, durante el transcurso de un año.

Material y Métodos

Área de estudio. El estudio se realizó en un bosque secundario de quebracho de 400 ha localizado en Las Gamas, Santa Fe, en el noreste de la República Argentina (29°28'S 60°28'O, a 58 m.s.n.m). Esta llanura que se incluye en el distrito Chaqueño Oriental (Cabrera y Willink 1980) presenta un clima templado-húmedo (Gorleri 2005), con una temperatura media anual de 20°C y máxima y mínima absolutas de 48°C y -5°C respectivamente. Las precipitaciones siguen un gradiente este-oeste y varían entre 800 a 1000 mm anuales; las principales lluvias son estivales y se presenta una estación seca invernal de duración fluctuante (Burgos 1970); no obstante existe una gran variabilidad interanual con periodos secos tanto en invierno como en verano (Barberis *et al.* 2005). El relieve es suavemente ondulado a plano, con un microrelieve intercalado con numerosas cubetas, que se anegan frecuentemente (Espino *et al.* 1983). Los suelos de las lomadas suaves y las pendientes con monte ralo son natracuafes típicos o álbricos y los de sectores levemente deprimidos son ocracuafes udólicos (Mussetti y Alconchel 1986).

En los quebrachales de la Cuña Boscosa santafesina la estructura del bosque varía en distancias de decenas de metros en relación con diferencias de microrelieve y humedad de suelo (Barberis *et al.* 2005). Las especies arbóreas dominantes son *S. balansae*, *Acacia praecox* (Griseb.) y *Sideroxylon obtusifolium* ((Roem. & Schult.) T.D. Penn.); entre

los arbustos las especies más frecuentes son *Capparis retusa* (Griseb.), *Achatocarpus praecox* (Griseb.), *Grabowskia duplicata* (Arn.) y *Maytenus vitis-idaea* (Griseb.) (Barberis *et al.* 2002). Las áreas más elevadas del quebrachal, con relieve convexo, tienen cobertura leñosa continua, con alta densidad de árboles y arbustos; el estrato herbáceo con frecuencia está dominado por bromeliáceas espinosas que forman matorrales de "caraguatá" (*Aechmea distichantha* Lem. y *Bromelia serrata* Griseb.) (Barberis *et al.* 2005). Por el contrario las áreas planas tienen una cobertura leñosa discontinua, baja proporción de arbustos y el estrato herbáceo del sotobosque está dominado por gramíneas cespitosas, o en algunos casos, el suelo se encuentra desnudo por efecto del sobrepastoreo de ganado bovino (Pire y Prado 2001).

Muestreo de suelo y mantillo. Dada la heterogeneidad microtopográfica del suelo del bosque en estudio, se seleccionaron micrositios marcadamente diferentes como áreas de muestreo. Por un lado zonas elevadas (EB) con mayor presencia de arbustos, donde la superficie del suelo es convexa y el sotobosque está dominado por bromeliáceas terrestres y por otro lado, áreas planas extendidas (PS) con menos arbustos, cuya principal cobertura es proporcionada por gramíneas. En cada micrositio se seleccionaron cinco áreas homogéneas de muestreo de 16m² (4 × 4m), separadas a más de 50m, que se utilizaron tanto para los muestreos de suelo y mantillo, como para la captura de artrópodos.

Durante el mes de octubre de 2003 (primavera) se extrajeron en cada área de muestreo, cuatro muestras simples de suelo de 20×20cm y 7cm de profundidad, retirando previamente la hojarasca. El material se secó al aire en laboratorio, se molió y se tamizó con malla de 2mm. Se determinó el contenido de carbono orgánico a través del método de Walkley-Black (Nelson y Sommers 1982); sobre una suspensión suelo-agua destilada (1:2,5) se evaluó el pH y la conductividad eléctrica, a una temperatura de 25°C (Marbán y Ratto 2005). También se extrajeron tres muestras del mantillo superficial de 50×20cm en cada área; el material se secó en estufa a 60 °C durante 72 hs, se trituró y se tamizó. Se determinó el peso seco, el contenido de humedad, el porcentaje de materia orgánica (Nelson y Sommers 1982) y por calcinación en mufla a 900 °C durante dos horas se estimó el porcentaje de cenizas del mantillo (Rodrigues *et al.* 1995).

Muestreo de macroartrópodos. En los meses de julio (invierno) y octubre (primavera) de 2003 y en febrero (verano) de 2004 se realizaron los muestreos; no fue posible extraer datos durante el otoño de ambos años debido a precipitaciones excesivas que provocaron inundaciones locales. En cada área de muestreo se colocaron cuatro trampas pitfall de 11cm de diámetro, que contenían 200cm³ de solución conservante (ácido acético 5% y formaldehído 2,5%). Las trampas se dispusieron en los vértices de un cuadrado de aproximadamente 4 m de lado. Los muestreos se realizaron durante cinco días consecutivos, contabilizando un esfuerzo total de captura de 600 trampa-día [2 micrositios × 5 áreas/micrositio × 4 trampa/área × 3 estaciones × 5 días/estación = 600 trampa-día]. El material recolectado se conservó en alcohol al 70% para su posterior determinación. Se registró el número de individuos de cada morfoespecie capturada en cada trampa; la riqueza y la abundancia de artrópodos en cada ambiente se expresaron en número de morfoespecies y número de individuos por trampa, respectivamente.

Identificación y agrupamiento del material. Los nombres de los taxones superiores se consignaron según Borror *et al.* (1992); mientras que para la mayor parte de los géneros y especies se siguió la clasificación usada por Morrone y Coscarón (1998) y Claps *et al.* (2008). Los estados inmaduros se clasificaron utilizando diversas claves compiladas por Stehr (1991). El material recolectado se identificó al nivel de orden y familia; cuando fue posible se determinó hasta la categoría de especie. El resto del material se identificó como unidades taxonómicas reconocibles o “morfoespecies” diferentes de las anteriores. La determinación hasta la categoría de especies demanda mucho tiempo y en algunos casos resulta prácticamente imposible por la falta de taxónomos expertos para los grupos involucrados. En muchos casos, el detalle taxonómico no mejora los resultados ecológicos obtenidos a pesar del tiempo requerido para la adquisición de este conocimiento (de la Fuente *et al.* 2003).

La estructura trófica de la comunidad se estudió asignando cada morfoespecie capturada a un grupo trófico según la información disponible en la bibliografía. Se definieron cuatro grandes grupos: herbívoros, predadores, detritívoros y hormigas (Root 1973; Hawkins y Mac Mahon 1989). Las hormigas se consideraron como un grupo independiente debido a que la mayoría de las especies explotan diversas fuentes de alimentos de modo oportunista (Stork 1987; Stuntz *et al.* 2002). Cada especie o morfoespecie de hormiga fue asignada a un grupo funcional, siguiendo el criterio propuesto por Bestelmeyer y Wiens (1996) para las hormigas del Chaco Occidental.

Análisis de resultados. Con el fin de evaluar diferencias en las condiciones edáficas superficiales entre los distintos micrositios se utilizó la prueba de permutaciones de respuestas múltiples (MRPP; Biondini *et al.* 1985). Debido a que los atributos se miden en diferentes unidades, se relativizó la matriz original ajustando los datos por la desviación estándar (Legendre y Legendre 1998); los cálculos se realizaron con el programa PC-ORD, versión 4.0 (<http://mjm-software-design.software.informer.com/>) (McCune y Mefford 1995). Cada variable se analizó en forma independiente utilizando una prueba *t* de diferencia de medias; se utilizó el programa InfoStat, versión 2010 (<http://www.infostat.com.ar/>) (Di Rienzo *et al.*, 2010).

Las diferencias en la composición específica de la artropofauna entre micrositios y entre estaciones se evaluaron con MRPP, utilizando el programa PC-ORD. Con el objeto de detectar las especies de mayor fidelidad a cada ambiente en cada período de muestreo se realizó un análisis de especies indicadoras (Dufrêne y Legendre 1997). El valor indicador combina información de abundancia y frecuencia relativas, de manera que se construye un índice para cada especie en cada micrositio en particular. La significancia estadística del indicador se evalúa a través una prueba de permutaciones de Montecarlo (Legendre y Legendre 1998; McCune y Mefford 1999). El valor indicador (VI) varía entre 0 (no indicador) y 100 (indicador perfecto).

Se calculó la diversidad α a través del índice de Shannon-Weaver (Pielou 1966); la equidad se calculó utilizando el índice de Pielou (Magurran 1988) y la diversidad β se estimó a través de un índice cualitativo de reemplazo de especies (índice de Whittaker; Moreno 2001) y de un índice de similitud cuantitativo (índice de Bray-Curtis; Legendre y Legendre 1998; Moreno 2001).

Las diferencias en la riqueza, abundancia, diversidad y equidad totales y la abundancia y riqueza de cada grupo trófico se evaluaron por medio de modelos lineales generales, utilizando un diseño de tipo factorial, con la estación y el micrositio como factores fijos y verificando si existen interacciones entre los mismos. Los valores de las variables que no presentaron distribución normal se transformaron como $\log_{10}(x+1)$ para cumplir los supuestos de normalidad y heteroscedasticidad. Los valores de probabilidad se ajustaron por Bonferroni; los cálculos se realizaron con el programa Infostat, versión 2010 (Di Rienzo *et al.* 2010).

Resultados

Condiciones edáficas primaverales. Las condiciones físico-químicas de la interfaz mantillo-suelo difirieron entre micrositios durante el período primaveral (MRPP; $T=-6,819$; $P<0,001$). El contenido de materia seca del mantillo no se diferenció entre micrositios; no obstante el porcentaje de humedad y de materia orgánica fue mayor en los micrositios PS, mientras que fue mayor el porcentaje de cenizas en los micrositios EB. El pH y el contenido de materia orgánica del suelo no difirieron entre micrositios pero la conductividad del mismo fue mayor en los micrositios EB (Tabla 1).

Identificación de la artropofauna. Se capturaron 1668 individuos de 78 morfoespecies, agrupadas en cuatro clases, 16 órdenes y 43 familias (Apéndice I). El 81% de la abundancia correspondió a 63 morfoespecies de Insecta, que se agruparon en 10 órdenes y 31 familias. Los Arachnida concentraron el 16% de la abundancia (Fig. 1A) y el 15% de la riqueza (Fig. 1B); Diplopoda y Crustacea fueron escasos y en conjunto sólo alcanzaron el 3 y 4% de la abundancia y la riqueza, respectivamente (Fig. 1A y B). Los Hymenoptera fueron el orden de mayor abundancia y los Coleoptera el de mayor riqueza específica (Fig. 1C y D). Lycosidae fue la familia de mayor abundancia y riqueza entre las arañas y los Coleoptera concentraron mayor riqueza y abundancia en las familias Carabidae y Scarabaeidae (Fig. 1E y F). El 72% de los coleópteros pertenece a las familias Carabidae, Scarabaeidae y Tenebrionidae; las familias Gryllidae y Acrididae concentran el 97% de la abundancia de ortópteros. Ocho especies de hormigas alcanzaron el 41% de la abundancia total de artrópodos (Fig. 1E). El 66% de la abundancia de hormigas capturadas en trampas pitfall correspondió a *Pachycondyla striata* Smith, 1858 (Ponerinae); *Neivamyrmex diversinodis* Borgmeier, 1933 (Ecitoninae) llega al 14% de la abundancia y el resto de las especies son poco abundantes.

Tabla 1. Variables físico-químicas del suelo y el mantillo en dos micrositios (EB y PS) de un quebrachal del Chaco Húmedo, durante el período primaveral. Los valores expresan media $\pm$ error estándar.

Variables	Micrositio		<i>t</i>	<i>P</i>
	EB	PS		
<i>Suelo</i>				
Materia orgánica (%)	7,52 ± 0,67	7,03 ± 0,72	0,493	0,627
pH _{agua}	5,00 ± 0,05	5,12 ± 0,05	1,752	0,094
Conductividad (mS/cm)	0,61 ± 0,03	0,36 ± 0,05	4,218	<0,001
<i>Mantillo</i>				
Materia seca (g/m²)	213,8 ± 17,0	220,5 ±21,6	0,246	0,808
Humedad (%)	47,37 ± 1,79	64,83 ± 1,35	7,800	<0,001
Materia orgánica (%)	57,18 ± 2,88	65,50 ± 2,75	2,091	0,048
Cenizas (%)	42,83 ± 2,88	34,50 ± 2,75	2,091	0,048

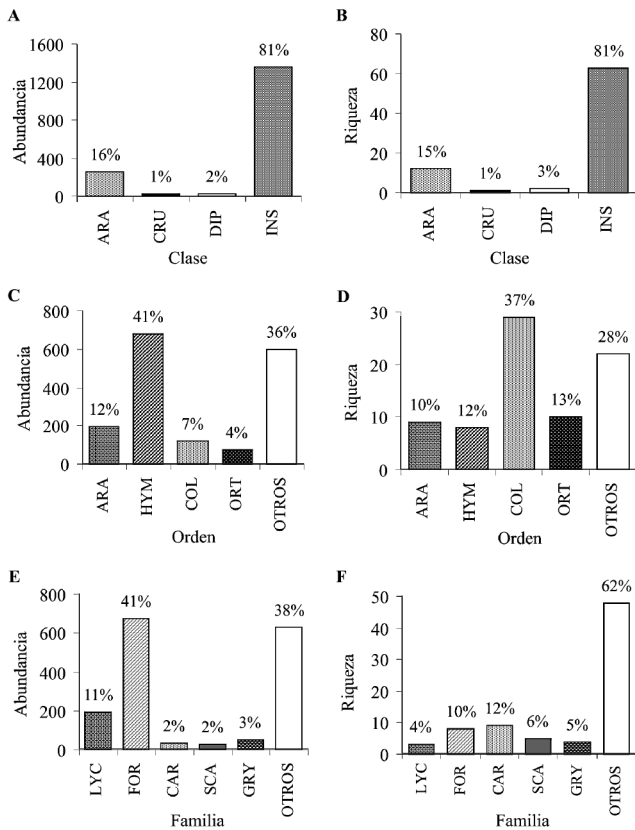


Figura 1. Abundancia y riqueza de las principales clases, órdenes y familias de artrópodos epigeos en un quebrachal del Chaco Húmedo. Clases: ARA= Arachnida, CRU= Crustacea, DIP= Diplopoda e INS= Insecta. Órdenes: ARA= Araneae, HYM= Hymenoptera, COL= Coleoptera y ORT= Orthoptera. Familias: LYC= Lycosidae, FOR= Formicidae, CAR= Carabidae, SCA= Scarabaeidae y GRY= Gryllidae. El valor sobre la barra indica abundancia o riqueza relativa según corresponda.

Estructura trófica. La estructura trófica de las comunidades de artrópodos epigeos difirió durante el año (Fig. 2A). La proporción de detritívoros varió entre 37 y 48% en los periodos invernal y primaveral, mientras que en verano su abundancia fue inferior al 7%; en invierno la proporción de detritívoros fue mayor en los micrositios PS. Los herbívoros nunca superaron el 23% de la abundancia total y en las tres estaciones su proporción fue mayor en los micrositios PS. Los predadores, cuya proporción fue siempre inferior al 23%, fueron más abundantes en los micrositios PS, tanto en invierno como en primavera. Por el contrario las hormigas alcanzaron más del 77% de la abundancia total en verano en ambos micrositios, mientras que en invierno y primavera hubo mayor proporción en los micrositios EB (Fig. 2A).

La estructura trófica de los ensamblajes de hormigas epigeas capturadas con pitfall varió, tanto entre micrositios como entre estaciones (Fig. 2B). Las “ponerinas grandes epigeas” fueron las hormigas dominantes en las tres estaciones; en invierno alcanzaron el 93% en los micrositios EB y no se capturaron en los micrositios PS, su proporción llegó a 55 y 84% en ambos micrositios en primavera y verano, respectivamente. Estas hormigas son preferentemente depredadoras y elevaron notablemente la proporción total de predadores en todos los micrositios y estaciones. En primavera las “especies nómadas” representaron el 28 y 26% en los micrositios EB y PS, respectivamente; el resto de los grupos tróficos siempre

se presentaron en baja proporción (Fig. 2B). Variaciones estacionales de la composición, abundancia, riqueza y diversidad. Se capturaron 251 individuos en invierno, 1001 en primavera y 416 en verano de 25, 48 y 39 morfoespecies respectivamente (Fig. 2A). Las hormigas estuvieron representadas por 54 individuos en invierno, 309 en primavera y 315 en verano de 5, 7 y 5 morfoespecies, respectivamente (Fig. 2B).

La composición específica de los ensamblajes de artrópodos epigeos varió entre estaciones climáticas (MRPP; $T=-22,842$; $P<0,001$). No se detectaron especies indicadoras características del periodo invernal. En primavera dos especies de Arachnida de alta abundancia y frecuencia relativa alcanzaron los mayores valores indicadores (*Lycosa malitiosa* Tullgren, 1905 VI=53; $P<0,001$ y *Caiza argentina* Ringuelet, 1959, VI=43; $P<0,001$). La hormiga *P. striata* fue la especie de mayor valor indicador en el periodo estival (VI=42; $P=0,002$).

En primavera se registró mayor abundancia y riqueza de artrópodos (Fig. 3A y B; Tabla 2); la diversidad α y la equidad no diferenció entre estaciones (Fig. 3C y D; Tabla 2). Durante el periodo estival la diversidad α alcanzó el mínimo valor registrado, en contraposición la diversidad β_{temporal} evaluada a través del índice de Whittaker alcanzó su máximo valor ($I_{\beta\text{inv}}$

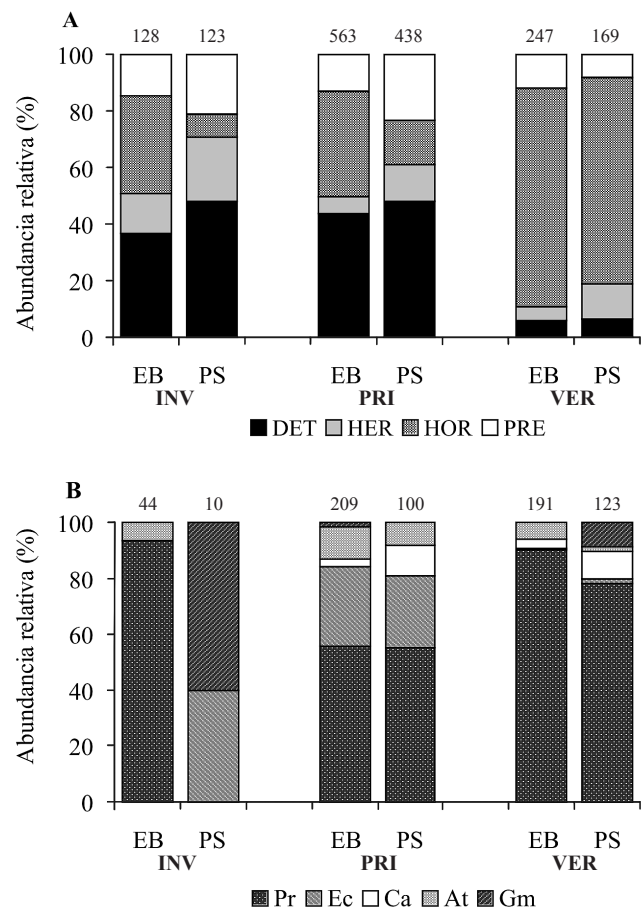


Figura 2. Estructura trófica estacional de artrópodos A. y grupos funcionales de hormigas epigeas B. capturadas con pitfall en dos micrositios (EB y PS) de un quebrachal del Chaco Húmedo. A: DET= detritívoros, HER= herbívoros, HOR= hormigas y PRE= predadores. B: Pr= depredadoras (Ponerinae), Ec= ecitoninas (Ecitoninae), Ca= camponotinas (Formicinae), At= atinas cortadoras (Attini: Myrmicinae) y Gm= myrmecinas generalistas (Myrmicinae). INV= invierno, PRI= primavera y VER= verano. El número sobre la barra indica la abundancia individual en cada micrositio y estación.

= 7,41; $I_{\beta pri} = 7,68$ y $I_{\beta ver} = 16,08$). La similitud de las comunidades entre las distintas estaciones es muy baja ($I_{BCinv-pri} = 0,31$; $I_{BCinv-ver} = 0,29$ y $I_{BCpri-ver} = 0,32$).

La abundancia de detritívoros fue menor en verano (Fig. 3 E; Tabla 2) y su riqueza fue mayor en primavera (Fig. 3F; Tabla 2). La abundancia y la riqueza de herbívoros fueron mayores en invierno y fueron mínimas en verano; durante la primavera se presentó una situación intermedia (Fig. 3G y H; Tabla 2). Fue mayor la abundancia de predadores en primavera que la de verano e invierno, que no se diferenciaron entre sí (Fig. 3I; Tabla 2); la riqueza de predadores no difirió entre estaciones (Fig. 3J; Tabla 2). La abundancia y la riqueza de hormigas fue menor en invierno y fue semejante en primavera y verano (Fig. 3K y L; Tabla 2). Las ecitoninas (Ecitoninae) fueron más abundantes en primavera y no se diferenciaron en verano e invierno ($F = 6,45$; $P = 0,007$). La abundancia de hormigas depredadoras (Ponerinae) fue menor en invierno, mientras que no se diferenció en primavera y verano ($F = 5,56$; $P = 0,012$).

Variaciones ambientales de la composición, abundancia, riqueza y diversidad. En los micrositios EB se capturaron 938 individuos de 60 morfoespecies y 730 individuos de 51 morfoespecies en los micrositios PS (Fig. 2A). Veintiocho morfoespecies sólo se capturaron en los micrositios EB y 19 en los micrositios PS. Se registró un sólo individuo en 20 y en 16 morfoespecies, de los micrositios EB y PS, respectivamente. En cuanto a las hormigas se detectaron 444 individuos de 6 morfoespecies en los micrositios EB y 233 individuos de 7 morfoespecies en los micrositios PS (Fig. 2B).

La composición específica de los ensambles de artrópodos epigeos varió entre micrositios en las tres estaciones relevadas (MRPP; $T_{INV} = -6,326$; $P < 0,001$; $T_{PRI} = -6,924$; $P < 0,001$; $T_{VER} = -5,184$; $P = 0,002$). La hormiga *P. striata* fue la especie de mayor fidelidad a los micrositios EB durante el todo año, alcanzando altos valores de abundancia y frecuencia relativa; su valor indicador fue máximo en invierno ($VI = 92$; $P < 0,001$) y mínimo en verano ($VI = 61$; $P = 0,020$). En primavera *Anadenobolus* sp. 815 (Diplopoda) alcanzó también un alto valor

indicador en los micrositios EB ($VI = 56$; $P < 0,001$). No se detectaron especies indicadoras de los micrositios PS en las tres estaciones relevadas.

La abundancia, riqueza, diversidad α y equidad no se diferenciaron entre micrositios dentro de cada estación (Fig. 3A a D; Tabla 2). En verano la diversidad β evaluada a través del índice de Whittaker fue mayor en los micrositios PS ($I_{\beta PS} = 12,2$; $I_{\beta EB} = 8,62$). La similitud de las comunidades entre los distintos micrositios es relativamente alta ($I_{BCmicrositios} = 0,66$).

No se detectaron diferencias entre micrositios en la abundancia y la riqueza de detritívoros, herbívoros y predadores (Fig. 3E a K; Tabla 2). La abundancia de hormigas fue mayor en los micrositios EB, tanto en invierno como en primavera; durante el verano no se diferenció entre micrositios (Fig. 3K; Tabla 2). La riqueza de hormigas no difirió entre micrositios en las estaciones relevadas (Fig. 3L; Tabla 2). En los micrositios EB fue mayor la abundancia de hormigas depredadoras ($F = 20,26$; $P < 0,001$) y de atinas cortadoras (Atini) ($F = 7,49$; $P = 0,013$). Las mirmicinas generalistas (Myrmicinae) fueron más abundantes en los micrositios PS ($F = 11,48$; $P = 0,003$).

Discusión

Ensamblajes de artrópodos epigeos. Los órdenes más abundantes y de mayor riqueza específica fueron Hymenoptera, Arachnida, Coleoptera y Orthoptera, el resto de los órdenes tuvo escasa representación. La mayoría de las familias estuvieron escasamente representadas, siendo las más abundantes Formicidae y Lycosidae. Si bien los Carabidae se encuentran en baja abundancia, alcanzan la mayor riqueza específica. En términos generales estos resultados coinciden con otros trabajos realizados en bosques chaqueños (Bucher 1974, 1982; Molina *et al.* 1998, 1999; Laffont *et al.* 2007; Bar *et al.* 2008). Sin embargo la abundancia relativa de cada taxa puede variar tanto por las condiciones ambientales del hábitat (Molina *et al.* 1998) como por el tamaño de las trampas (Abensperg-Traun y Steven 1995) o el líquido conservante utilizado (Le-

Tabla 2. Resultados del ANAVA para los efectos estación, micrositio y sus interacciones sobre la abundancia, riqueza, diversidad y equidad totales y sobre la abundancia y riqueza de distintos grupos tróficos de artrópodos epigeos en un quebrachal del Chaco Húmedo. Las fuentes en negrita indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Variables	Estación		Micrositio		Estación-Micrositio	
	<i>F</i> (2;30)	<i>P</i>	<i>F</i> (1;30)	<i>P</i>	<i>F</i> (2;30)	<i>P</i>
Abundancia (ind./4 trampas)	9,64	<0,001	2,57	0,125	0,45	0,624
Riqueza (spp./4 trampas)	11,11	<0,001	1,92	0,181	0,83	0,449
Diversidad (Shannon)	3,03	0,071	0,17	0,687	2,02	0,159
Equidad (Pielou)	0,51	0,611	1,47	0,239	1,83	0,187
Abundancia DET (ind./4 trampas)	38,42	<0,001	0,20	0,660	0,06	0,939
Riqueza DET (spp./4 trampas)	13,24	<0,001	0,10	0,754	0,58	0,569
Abundancia HER (ind./4 trampas)	3,71	0,043	0,13	0,723	0,58	0,571
Riqueza HER (spp./4 trampas)	3,42	0,053	0,16	0,697	1,15	0,337
Abundancia PRE (ind./4 trampas)	12,63	<0,001	2,04	0,168	0,75	0,484
Riqueza PRE (spp./4 trampas)	1,51	0,245	2,81	0,110	1,00	0,386
Abundancia HOR (ind./4 trampas)	7,63	0,004	12,87	0,002	0,45	0,645
Riqueza HOR (spp./4 trampas)	4,46	0,025	0,51	0,485	1,37	0,276

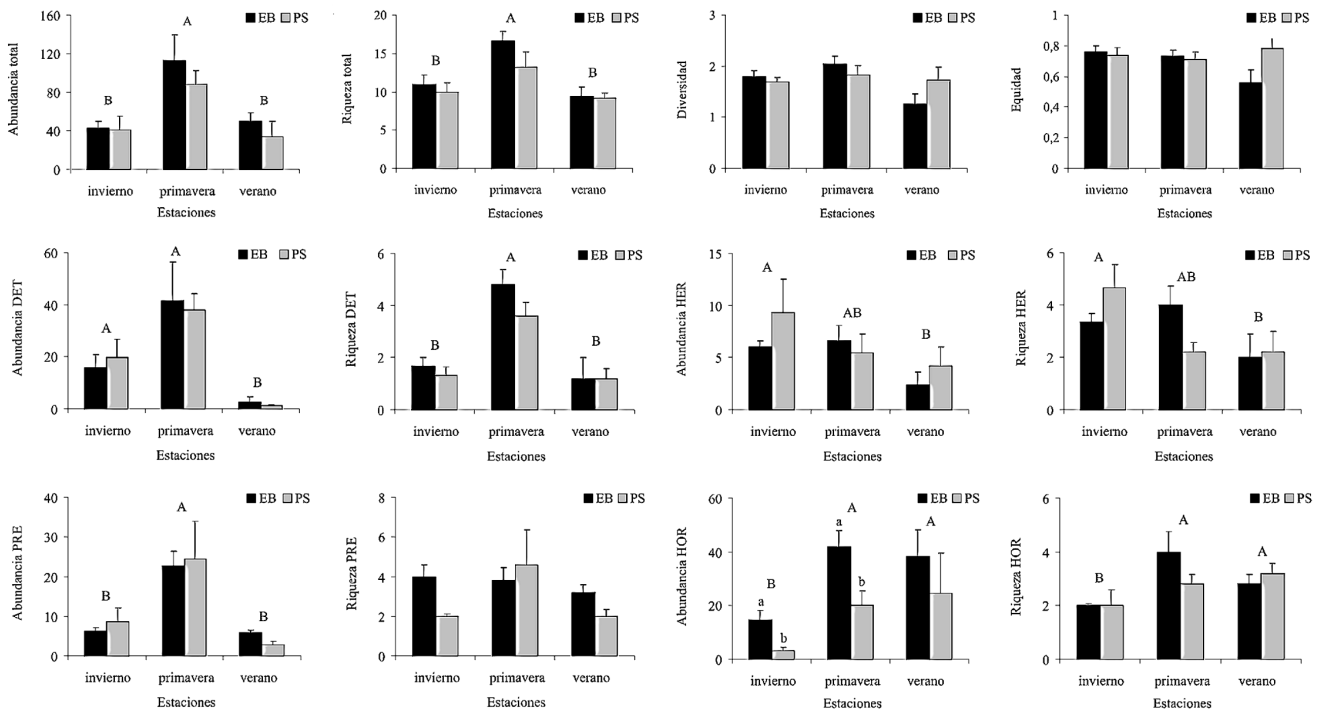


Figura 3. Abundancia, riqueza, diversidad y equidad totales (A a D) y abundancia y riqueza de distintos grupos tróficos de artrópodos epigeos (E a L) en cada estación y en cada micrositio (EB y PS) de un quebrachal del Chaco Húmedo. Las barras representan el error estándar de la media. Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre estaciones y distintas letras minúsculas indican diferencias significativas entre micrositios ($P < 0,05$).

mieux y Lindgrenn 1999). No obstante este método continúa siendo el más utilizado para este tipo de capturas, sobre todo si se desean comparar diferentes sitios (Greenslade 1964; Niemelä *et al.* 1992; Bestelmeyer y Wien 1996; Pekár 2002). En nuestro trabajo sólo se evaluaron las fluctuaciones estacionales de las comunidades de artrópodos epigeos durante un año de muestreo, por lo cual los resultados sólo deben tomarse como una primera aproximación al problema de la estacionalidad en estos bosques.

Gran parte de las diferencias que detectamos con los ensambles de artrópodos de los bosques del Chaco Occidental muy probablemente se deban a la extrema diferencia en las condiciones de humedad relativa entre los dos ambientes. El Chaco Oriental, donde se realizó el presente trabajo, corresponde a un sitio mucho más húmedo que el evaluado por Molina *et al.* (1999), que presenta aproximadamente un 50% menos de precipitaciones anuales (Burgos 1970). Esta diferencia hídrica se pone en evidencia en la abundancia de opiliones y de carábidos capturados en el presente trabajo, que constituyen una fauna típica de ambientes muy húmedos. Al mismo tiempo, en el Chaco Occidental se verifica una predominancia de fauna adaptada a ambientes más xéricos como Tenebrionidae (Flores 1998).

Mantillo, suelo y detritívoros. En los bosques del Chaco Húmedo la caída de hojarasca ocurre a lo largo del año; no obstante es mayor a partir de mayo y comienza a disminuir a partir de agosto (Carnevale y Lewis 2001). La cantidad de hojarasca caída es baja y varía según las características estructurales del bosque. Es superior en las áreas de dosel cerrado con mayor abundancia de arbustos (EB), mientras que en las áreas de dosel semi cerrado o abierto (PS) es muy inferior

(Carnevale y Lewis 2001). Sin embargo en nuestro trabajo no encontramos diferencias en el contenido de materia seca del mantillo durante la primavera, luego de la caída de la mayor parte de la hojarasca; esto puede explicarse por un mayor aporte del estrato herbáceo al mantillo del bosque en las áreas abiertas, que equipara la menor caída de hojarasca. El mayor contenido de cenizas del mantillo y la mayor conductividad de la capa superficial de suelo en los micrositios EB durante el período primaveral, la atribuimos al mayor aporte de hojarasca proveniente de arbustos (Carnevale 2001), cuyo contenido de calcio, magnesio y potasio es significativamente mayor al de la hojarasca proveniente de árboles (Carnevale y Lewis 2001). Por razones operativas sólo pudimos efectuar muestreos de hojarasca y suelo durante la primavera, por este motivo no realizamos comparaciones estacionales de estas variables.

No encontramos diferencias en la riqueza y abundancia de detritívoros epigeos entre micrositios en las estaciones relevadas. En concordancia Carnevale y Lewis (2001) determinaron que pese a que el material proveniente de los arbustos, más abundantes en los micrositios EB, se descompone más rápido que el de los árboles, el proceso de descomposición de la hojarasca es independiente del micrositio donde ésta se deposita. En primavera el porcentaje de humedad y de materia orgánica del mantillo son mayores en los micrositios PS, creando condiciones más propicias para la acción de los detritívoros; sin embargo no detectamos mayor abundancia de este grupo trófico. Por el contrario en esta estación la abundancia de Isopoda y Diplopoda detritívoros fue significativamente mayor en los micrositios EB ($F=3,27$; $P=0,002$). Posiblemente esto se deba a que ambos grupos de artrópodos seleccionan micrositios cuya hojarasca retiene mayor canti-

dad de calcio y magnesio, que es utilizado en la constitución de su exoesqueleto (Nicolai 1988; Kostanjsek *et al.* 2006).

Diversos estudios realizados en bosques del Chaco occidental destacan la importancia de los insectos detritívoros como macro descomponedores en sistemas áridos y semiáridos (Bucher 1974; Gardner *et al.* 1995; Molina *et al.* 1998), donde otros agentes descomponedores tienen acción limitada debido a que les son desfavorables las condiciones ambientales. Molina *et al.* (1998) registraron que los insectos detritívoros alcanzaron el 70% de la abundancia total de artrópodos en bosques del Chaco Occidental; destacándose en riqueza y abundancia especies xerofíticas de las familias Tenebrionidae, Nitidulidae y Scarabaeidae. Por el contrario en el bosque que estudiamos los detritívoros sólo alcanzaron entre 37 y 48% de la abundancia total en invierno y primavera, respectivamente, destacándose por su abundancia especies higrófilas de la clase Diplopoda y de las familias Entomobriidae y Porcellionidae, entre los Insecta. Durante el período estival, particularmente seco durante este estudio, los detritívoros no superaron el 7% de la abundancia total. En bosques húmedos altoandinos, Varela *et al.* (2007) determinaron que la tasa de descomposición de la hojarasca no difirió cuando fue excluida la edafofauna, por lo cual consideraron que su rol es poco relevante sobre la descomposición de la hojarasca en estos bosques. Si bien la tasa de descomposición de la hojarasca tiende a ser más alta en los bosques húmedos respecto a los bosques secos (Swift *et al.* 1981; del Valle 2003), este efecto no se debería a la mayor acción individual de los artrópodos detritívoros sino a la combinación de diversos agentes descomponedores tales como hongos, bacterias y protistas.

No obstante los detritívoros no sólo descomponen hojarasca, sino que también se pueden alimentar de restos animales en descomposición o de sus deyecciones (Borror *et al.* 1992) cumpliendo otras importantes funciones ecosistémicas. Los opiliones, quienes si bien en general son predadores, también son capaces de ingerir presas ya muertas (Acosta y Maury 1998).

Herbívoros y predadores. Si bien la abundancia de herbívoros nunca superó en la zona el 23% se registró una mayor proporción que en estudios similares realizados en el Chaco Occidental (Gardner *et al.* 1995; Molina *et al.* 1998), donde este grupo trófico no superó el 11% de la abundancia total. Laffont *et al.* (2007) obtuvieron resultados similares a los nuestros en bosques húmedos de la provincia de Formosa (Argentina). La mayor proporción de herbívoros en los micrositios PS puede explicarse por la presencia de un estrato herbáceo de alta riqueza dominado por gramíneas (Marino y Pensiero 2003), que permiten una oferta alimenticia más amplia para estos artrópodos. Por el contrario el estrato herbáceo de los micrositios EB, dominado por bromeliáceas terrestres que forman matorrales densos y de baja diversidad vegetal, brinda una oferta alimenticia más restringida. En concordancia con estos resultados, Montero *et al.* (2010) determinaron que los ensambles de macrofauna del follaje de la bromeliácea *A. distichantha* se caracterizan por la baja riqueza y abundancia de herbívoros.

Los predadores se encontraron bien representados en los ensambles de artrópodos epigeos de la superficie del suelo del bosque en estudio, tanto en abundancia como en riqueza específica. Arañas, opiliones y carábidos son los taxa de mayor abundancia si se excluyen las hormigas; no obstante la abundancia total de predadores se incrementa notablemente

si se incluyen en este grupo trófico dos especies de hormigas de la subfamilia Ponerinae, que son depredadoras epigeas generalistas. Las trampas pitfall constituyen el método de muestreo más utilizado para artrópodos que se desplazan por la superficie del suelo; no obstante sus capturas son más bien indicadoras de la actividad superficial que de los niveles poblacionales (Montero 2008). Si bien es posible que se esté sobrestimando la abundancia de predadores epigeos en estos bosques, en estudios realizados con el mismo método de muestreo en bosques del Chaco occidental (Gardner *et al.* 1995; Molina *et al.* 1998, 1999) la abundancia de predadores es muy inferior a la que nosotros detectamos.

Las arañas constituyen el principal grupo de predadores que habitan en el follaje de la bromeliácea *A. distichantha* (Montero *et al.* 2010); sin embargo no encontramos diferencias en la abundancia de arañas entre micrositios con y sin bromeliáceas. Esto puede explicarse por la alta movilidad de algunas especies de arañas como las Lycosidae, que utilizan extensas superficies como sitio de caza de sus presas. En el caso de *Aglaoctenus lagotis* (Lycosidae) sólo fue detectado en los micrositios EB, que es donde construye sus nidos con forma de embudo, utilizando la estructura foliar de las bromeliáceas (Rubio *et al.* 2005).

Si bien la abundancia y riqueza de Carabidae fue baja respecto a la detectada en pastizales y áreas agrícolas del sur de Santa Fe (Montero 2008), es mucho mayor a la detectada en los bosques del Chaco occidental (Molina *et al.* 1998). Entre las especies de Carabidae capturadas, la más abundante, *Bradycellus* sp. 810 y *Aspidoglossa intermedia* son reconocidas como especies hidrófilas (Cicchino *et al.* 2003). Los micrositios PS que son los más alterados por el pastoreo de ganado bovino, mostraron una mayor abundancia y riqueza de carábidos en concordancia con lo detectado por Gardner *et al.* (1995) y Molina *et al.* (1999) en sitios perturbados por el ganado en bosques del Chaco occidental.

Grupos funcionales de hormigas. Si bien las trampas pitfall no son las más indicadas para realizar un análisis cuantitativo de la abundancia de hormigas, debido a que no capturan individuos al azar sino que la probabilidad de captura aumenta con la cercanía a la colonia (Lagos 1999), se incluyeron en este estudio teniendo en cuenta la ausencia de grandes hormigueros de *Atta vollenweideri* Forel, 1893, en las proximidades del área de muestreo y la alta abundancia de Ponerini patrulleras, frecuentemente muestreadas con pitfall (Bestelmeyer y Wiens 1996; Silvestre *et al.* 2003).

El grupo funcional más abundante son las depredadoras (Ponerinae), que son hormigas generalistas que forrajea en forma aislada en el suelo y poseen muy alta movilidad, lo cual explica su alta proporción de captura en trampas pitfall (Silvestre *et al.* 2003; Brandão *et al.* 2009). Una de las causas que podrían explicar su menor abundancia en el invierno de 2003 fueron las inundaciones ocurridas en el otoño de ese año; la mayor abundancia en los micrositios EB se relaciona con una mayor altura topográfica de los mismos. Las camponotinas (Formicidae) son hormigas omnívoras oportunistas, consideradas agentes potenciales de control de plagas en agroecosistemas tropicales (Jaffe y Sánchez 1984). La ecitonina *Neivamyrmex diversinodis* (Ecitoninae) es una especie depredadora o necrófaga que causa grandes impactos sobre los invertebrados de la hojarasca y las capas superficiales del suelo (Berghoff *et al.* 2003; O'Donnell *et al.* 2005). Tres especies de Myrmicinae de los géneros *Solenopsis*, *Pheidole* y

Crematogaster son principalmente depredadoras generalistas o necrófagas (Wilson 2003), aunque pueden utilizar semillas o frutos como recurso alimenticio secundario (Johnson 2000). Las "atías cortadoras" (Myrmicinae) son especies herbívoras que cultivan hongos a partir de hojas frescas. Si bien estas hormigas suelen ser más abundantes en áreas abiertas con predominio de gramíneas (Bestelmeyer y Wiens 1996; Forti *et al.* 2006), como los micrositios PS, en el bosque en estudio detectamos mayor abundancia en los micrositios EB. Esto se relaciona con la mayor presencia de hormigueros en los micrositios más elevados.

Agradecimientos

Agradecemos a Rodolfo Comuzzi y Sergio Acosta por su invaluable ayuda en el trabajo de campo realizado en Las Gamas (Ministerio de la Producción, Provincia de Santa Fe). A Ignacio Barberis por la lectura crítica del manuscrito y a Patricia Torres por su asesoramiento estadístico.

Literatura citada

- ABENSPERG-TRAUN, M.; STEVEN, D. 1995. The effects of pitfall trap diameter on ant species richness (Hymenoptera: Formicidae) and species composition of the catch in a semi-arid eucalypt woodland. *Australian Journal of Ecology* 20: 282-287.
- ACOSTA, L. E.; MAURY, E. A. 1998. Opiliones. p. 569-580. En: Morrone, J. J.; Coscarón, S. (Dir.). Biodiversidad de artrópodos Argentinos. Una perspectiva biotaxonómica. Ediciones Sur. La Plata, Buenos Aires. 599 pp.
- ALONSO, I. E.; AGOSTI, D. 2000. Biodiversity studies, monitoring and ants: an overview. p.1-8. En: Agosti, D.; Majer, J. D.; Alonso, I. E.; Schultz, T. S. (eds.). *Ants. Standard methods methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Institution Press. Washington and London. 280 p.
- ALZUGARAY, C.; BARBERIS, I.; CARNEVALE, N. J.; DI LEO, N.; LEWIS, J. P.; LOPEZ, D. 2006. Estado actual de las comunidades vegetales de la Cuña Boscosa de Santa Fe. p. 113-116. En: Brown, A.; Martínez Ortiz, U.; Acerbi, M.; Corcuera, J. (eds.). *La situación ambiental Argentina*. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, Argentina. 577 p.
- BAR, M. E.; OSCHEROV, E. B.; DAMBORSKY, M. P.; ÁVALOS, G.; NÚÑEZ BUSTOS, E. 2008. Primer inventario de la fauna de Arthropoda de la región chaqueña húmeda. *INSUGEO, Miscelánea (Argentina)* 17 (2): 331-354.
- BARBERIS, I. M.; PIRE, E. F.; LEWIS, J. P. 1998. Spatial heterogeneity and woody species distribution in a *Schinopsis balansae* (Anacardiaceae) forest of the Southern Chaco, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 46: 515-524.
- BARBERIS, I. M.; BATISTA, W. B.; PIRE, E. F.; LEWIS, J. P.; LEÓN, R. J. 2002. Spatial distribution of woody populations in relation to environmental heterogeneity in a Chaco forest, Argentina. *Journal of Vegetation Science* 13: 607-614.
- BARBERIS, I. M.; LEWIS, J. P.; BATISTA, W. B. 2005. Heterogeneidad estructural de los bosques de la Cuña Boscosa de Santa Fe en distintas escalas espaciales. p. 43-58. En: Oesterheld, M.; Aguiar, M.; Ghera, C.; Paruelo, J. M. (eds.). *La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas*. Editorial Facultad de Agronomía - UBA, Buenos Aires, Argentina. 430 p.
- BERGHOFF, S. M.; WEISSFLOG, A.; LINSSENMAIR, K. E.; HASHIM, R.; MASCHWITZ, U. 2003. Foraging of a hypogaic army ant: a long neglected majority. *Insectes Sociaux* 49: 133-141.
- BESTELMEYER, B.; WIENS, J. 1996. The effects of land use on the structure of ground-foraging ant communities in the Argentine Chaco. *Ecological Applications* 6: 1225-1240.
- BIONDINI, M. E.; BONHAM, C. D.; REDENTE, E. F. 1985. Secondary successional patterns in a sagebrush (*Artemisia tridentata*) community as they relate to soil disturbance and soil biological activity. *Vegetatio* 60: 25-36.
- BORROR, D. J.; TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. 1992. *An introduction to the study of insects*. Sixth edition. Saunders College Publishing, Harcourt Brace Publishers. Orlando, USA. 875 p.
- BRANDÃO, C. R.; SILVA, R. R.; DELABIE, J. H. 2009. Formigas (Hymenoptera). p. 323-369. En: Panizzi, A. R.; Parra, J. R. (eds.). *Bioecología e nutrição de insetos. Base para o manejo integrado de pragas*. EMBRAPA Informação tecnológica, Brasília, Brasil. 1164 p.
- BUCHER, E. 1974. Observaciones ecológicas sobre los artrópodos del Bosque Chaqueño de Tucumán. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Serie biología I (Argentina)* 35-122.
- BUCHER, E. 1982. Chaco and Caatinga. South American arid savannas, woodland and thickets. p. 47-59. En: Huntley, B. J.; Walter, B.H. (eds.). *Ecology of tropical savannas*. Springer-Verlag, Berlin. 669 p.
- BURGOS, J. J. 1970. El clima en la región noreste de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica II (Suplemento)* 37-102.
- CABRERA, A. L.; WILLINK, A. 1980. Biogeografía de América Latina. Monografías científicas, serie biología 13, Secretaría General de la OEA. Washington, USA. 122 p.
- CARNEVALE, N. J. 2001. La caída de hojarasca y su descomposición en un quebrachal de *Schinopsis balansae* del Chaco Oriental. Tesis Doctoral, UNC, Argentina. 124 p.
- CARNEVALE, N. J.; LEWIS, J. P. 2001. Litterfall and organic matter decomposition in a seasonal forest of eastern Chaco (Argentina). *Revista de Biología Tropical* 49 (1): 203-212.
- CARNEVALE, N. J.; ALZUGARAY, C.; DI LEO, N. 2007. Estudio de la deforestación en la Cuña Boscosa santafesina mediante teledetección espacial. *Quebracho (Argentina)* 14: 47-56.
- CICCHINO, A. C.; MARASAS, M. E.; PALEOLOGOS, M. F. 2003. Características e importancia de la carabido fauna edáfica de un cultivo experimental de trigo y sus bordes con vegetación espontánea en el partido de La Plata, Buenos Aires. *Revista de Ciencia y Tecnología, FA-UNSD E (Argentina)* 8: 41-55.
- CLAPS, L. E.; DEBANDI, G.; ROIG-JUNENT, S. 2008. Biodiversidad de artrópodos argentinos. Volumen 2. Sociedad Entomológica Argentina. San Miguel de Tucumán, Argentina. 615 p.
- DE LA FUENTE, E. B.; SUÁREZ, S. A.; GHERSA, C. M. 2003. Weed and insect communities in wheat crops with different management practices. *Agronomy Journal* 95: 1542-1549.
- DEL VALLE, J. I. 2003. Descomposición de la hojarasca fina en bosques pantanosos del Pacífico Colombiano. *Interciencia* 28: 148-153.
- DI RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. W. 2010. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- DUFRENE, M.; LEGENDRE, P. 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs* 67: 345-366.
- ESPINO, L. M.; SEVESO, M. A.; SABATIER, M. A. 1983. Mapa de suelos de la provincia de Santa Fe. Tomo II, MAGSY y EERA Rafaela INTA. Buenos Aires, Argentina. 220 p.
- FLORES, G. E. 1998. Tenebrionidae. p. 232-240. En: Morrone, J. J.; Coscarón, S. (Dir.). Biodiversidad de artrópodos Argentinos. Una perspectiva biotaxonómica. Ediciones Sur. La Plata, Buenos Aires. 599 pp.
- FORTI, L. C.; de ANDRADE, M. L.; ANDRADE, A. P.; LOPES, J. F.; RAMOS, V. M. 2006. Bionomics and identification of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) through an illustrated key. *Sociobiology* 48: 135-153.
- GARDNER, S. M.; CABIDO, M.; VALLADARES, G.; DÍAZ, N. 1995. The influence of habitat structure on arthropod diversi-

- ty in Argentine semi-arid Chaco forest. *Journal of Vegetation Science* 6: 349-356.
- GORLERI, M. C. 2005. Caracterización climática del Chaco Húmedo. p. 13-25. En: Di Giacomo, A. G.; Krapovickas, S. F. (eds.). *Historia natural y paisaje de la Reserva El Bagual, Provincia de Formosa, Argentina. Temas de Naturaleza y Conservación. Aves Argentinas. Asociación Ornitológica del Plata, Buenos Aires, Argentina.* 592 p.
- GREENSLADE, P. J. M. 1964. Pitfall trapping as a method for studying populations of Carabidae (Coleoptera). *Journal of Animal Ecology* 33, 301-310.
- HAWKINS, C. P.; Mac MAHON, J. A. 1989. Guilds: the multiple meanings of a concept. *Annual Review of Entomology* 34: 423-451.
- HÖLDOBLER, B.; WILSON, E. O. 1990. *The ants.* Belknap Press Harvard University Press. Cambridge, USA. 732 p.
- JAFFE, K.; SÁNCHEZ, C. 1984. Comportamiento alimentario y sistema de reclutamiento en la hormiga *Camponotus rufipes* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Científica Venezolana* 35: 270-277.
- JOHNSON, R. A. 2000. Seed-harvester ants (Hymenoptera: Formicidae) of North America: an overview of ecology and biogeography. *Sociobiology* 36: 89-122.
- KOSTANJŠEK, R.; ŠTRUS, J.; LAPANJE, A.; AVGUŠTIN, G.; RUPNIK, M.; DROBNE, D. 2006. Intestinal microbiota of terrestrial isopods. p. 115-131. En: König, H.; Varma, A. (eds.). *Intestinal Microorganisms of Soil Invertebrates.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 483 p.
- LAFFONT, E. R.; CORONEL, J. M.; GODOY, M. C.; TORALES, G. J. 2007. Entomofauna de bosques nativos del Chaco Húmedo (Provincias de Chaco y Formosa, Argentina): Aportes al conocimiento de su diversidad. *Quebracho (Argentina)* 14: 57-64.
- LAGOS, S. 1999. Comunidades de artrópodos epígeos de áreas pastoreadas y no pastoreadas del desierto mendocino. *Boletín de la Sociedad Entomológica Argentina* 15 (2): 9-10.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. 1998. *Numerical Ecology.* Second edition. Elsevier Science. Amsterdam, Netherlands. 853 p.
- LEMIEUX, J. P.; LINDGREN, B. S. 1999. A pitfall traps for large-scale trapping of Carabidae: comparison against conventional design, using two different preservatives. *Pedobiología* 43: 245-253.
- LEWIS, J. P. 1991. Three levels of floristical variation in the forest of Chaco. *Journal of Vegetation Science* 3: 125-130.
- MAGURRAN, A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement.* Princeton University Press. New Jersey, USA. 179 p.
- MAJER, J. D. 1983. Ants: bioindicators of mine site rehabilitation, land use and conservation. *Environmental Management* 7: 375-383.
- MARBÁN, L.; RATTO, S. 2005. *Tecnologías en análisis de suelos.* Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo. Buenos Aires, Argentina. 216 p.
- MARINO, G.; PENSIERO, J. F. 2003. Heterogeneidad florística y estructural de los bosques de *Schinopsis balansae* (Anacardiaceae) en el sur del Chaco Húmedo. *Darwiniana (Argentina)* 41: 17-28.
- MARTIN, A.; RAPP, M.; SANTA REGINA, I.; GALLARDO, J.F. 1994. Leaf litter decomposition dynamics in some mediterranean deciduous oaks. *European Journal of Soil Biology* 30: 119-124.
- MCCUNE, B.; MEFFORD, M. J. 1999. *PC-ORD. Multivariate analysis of ecological data. Version 4.0.* MjM Software Design. Gleneden Beach, Oregon, USA. 237 p.
- MOLINA, S.; VALLADARES, G.; GARDNER, S.; CABIDO, M. 1998. Comunidad de insectos capturados en trampas de intercepción (pitfall traps) en una reserva del Chaco semiárido en el centro de Argentina. *Acta Entomológica de Chile* 22: 57-62.
- MOLINA, S.; VALLADARES, G.; GARDNER, S.; CABIDO, M. 1999. The effects of logging and grazing on the insect community associated with a semi-arid Chaco forest in central Argentina. *Journal of Arid Environments* 42: 29-42.
- MONTERO, G. A. 2008. *Comunidades de artrópodos en vegetación de áreas no cultivadas del sudeste de Santa Fe.* MSc Tesis. Maestría en Manejo y Conservación de Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Zavalla, Argentina. 208 p.
- MONTERO, G. A.; FERUGLIO, C.; BARBERIS, I. M. 2010. The phytotelm and foliage macrofauna assemblages of a bromeliad species in different habitats and seasons. *Insect Conservation and Diversity* 3: 92-102.
- MORELLO, J.; PENGUE, W.; RODRÍGUEZ, A. 2005. Etapas de uso de los recursos y desmantelamiento de la biota del Chaco. *Fronteras (Argentina)* 4: 1-17.
- MORENO, C. E. 2001. *Métodos para medir biodiversidad. Manuales y Tesis, SEA. Volumen 1.* Zaragoza, España. 84 p.
- MORRONE, J. J.; COSCARÓN, S. 1998. *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos. Volumen 1.* Ediciones Sur. La Plata, Argentina. 599 p.
- MUSSETTI, M.; ALCONCHEL, D. 1986. Mapa de suelos del centro operativo Dr. Tito Livio Coppa, Las Gamas, Departamento Vera, Santa Fe. Dirección General de Extensión e Investigaciones Agropecuarias. Santa Fe, Argentina. 22 p.
- NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. p. 539-579. En: Page, A. L.; Miller, R. H.; Keeney, D. R. (eds.). *Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties. Second edition, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, USA.* 1159 p.
- NICOLAI, V. 1988. Phenolic and mineral content of leaves influences decomposition in European forest ecosystems. *Oecologia* 75: 575-579.
- NIEMELÄ, J.; SPENCE, R. y SPENCE, D. H. 1992. Habitat associations and seasonal activity of ground-beetles (Coleoptera: Carabidae) in Central Alberta. *Canadian Entomology* 124: 521-540.
- O'DONELL, S.; KASPARI, M.; LATTKE, J. 2005. Extraordinary predation by the neotropical army ant *Cheliomyrmex andicola*: implications for the evolution of the army ant syndrome. *Biotropica* 37: 706-709.
- PEKÁR, S. 2002. Differential effects of formaldehyde concentration and detergent on the catching efficiency of surface active arthropods by pitfall traps. *Pedobiologia* 46: 539-547.
- PIELOU, E. C. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* 12: 131-144.
- PIRE, E. F.; PRADO, D. E. 2001. Pautas empíricas para un manejo sustentable de los bosques de la Cuña Boscosa santafesina. p. 257-260. En: Bertoniatti, C.; Corcuera, J. (eds.). *Situación ambiental argentina 2000.* Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires, Argentina. 392 p.
- PRADO, D. E. 1993. What is the Gran Chaco vegetation in South America? I. A review. Contribution to the study of flora and vegetation of the Chaco V. *Candollea* 48: 145-172.
- RODRIGUES, A. M.; FERREIRA, L. J.; FERNANDO, A. L.; URBANO, P.; SANTOS OLIVEIRA, J. 1995. Co-composting of sweet sorghum biomass with different nitrogen sources. *Biore-source Technology* 54: 21-27.
- ROIG-JUÑENT, S.; FLORES, G.; CLAVER, S.; DEBANDI, G.; MARVALDI, A. 2001. Monte Desert (Argentina): insect biodiversity and natural areas. *Journal of Arid Environments* 47: 77-94.
- ROOT, R. B. 1973. Organization of plant-arthropod association in simple and diverse habitats: the fauna of collards (*Brassica oleracea*). *Ecological Monographs* 43: 95-123.
- RUBIO, G. D.; MEZA TORRES, E. I.; AVALOS, G. 2005. Aspectos ecológicos de *Aglaotenus lagotis* (Araneae: Lycosidae) con én-

- fasis en la preferencia de hábitat. Corrientes, Argentina. Revista Colombiana de Entomología 31: 229-232.
- SILVESTRE, R.; BRANDÃO, C. R.; ROSA da SILVA, R. 2003. Grupos funcionales de hormigas: el caso de los gremios del Cerrado. p. 113-124. En: Fernández, F. (ed.). Introducción a las hormigas de la región Neotropical: 113-124. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia.
- STEHR FW. 1991. Immature insects. Kendall-Hunt Publishing Company. Dubuque, USA. Volumen I: 754 p. Vol. II: 975 p.
- STORK, N. E. 1987. Guild structure of arthropods from Bornean rain forest trees. Ecological Entomology 12: 69-80.
- STUNTZ, S.; ZIEGLER, C.; SIMON, U.; ZOTZ, G. 2002. Diversity and structure of the arthropod fauna within three canopy epiphyte species in central Panama. Journal of Tropical Ecology 18: 161-176.
- SWIFT, M. J.; RUSSEL-SMITH, A.; PERFECT, T. J. 1981. Decomposition and mineral nutrient dynamics of plant litter in a regenerating bush-fallow in the sub-humid tropical Nigeria. Journal of Ecology 69: 981-995.
- VARELA, A.; CORTÉS, C.; COTES, C. 2007. Cambios en edaofauna asociados a la descomposición de hojarasca en un bosque nublado. Revista Colombiana de Entomología 33 (1): 45-53.
- VITTAR, F. 2008. Hormigas (Hymenoptera: Formicidae) de la Mesopotamia Argentina. Temas de biodiversidad del Litoral. INSUGEO, Miscelánea (Argentina) 17 (2): 447-466.
- WEAVER, J. C. 1995. Indicator species and scale of observation. Conservation Biology 94: 939-942.
- WILSON, E. O. 1994. The diversity of life. Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, USA. 422 p.
- WILSON, E. O. 2003. *Pheidole* of the New World: a dominant, hyperdiverse ant genus. Harvard University Press. Cambridge, USA. 794 p.

Recibido: 18-jun-2010 • Aceptado: 18-may-2011

Apéndice I. Grupos tróficos y abundancia total de artrópodos epigeos en dos microsítios (EB y PS) de un quebrachal del Chaco Húmedo. Grupos tróficos: DET= detritívoros, HER= herbívoros, HOR= hormigas y PRE= predadores. Grupos funcionales de hormigas: Pr= depredadoras (Ponerinae), Ec= ecitoninas (Ecitoninae), Ca= camponotinas (Formicinae), At= atinas cortadoras (Attini: Myrmicinae) y Gm= mirmicinas generalistas (Myrmicinae). (A)= adultos, (L)= larvas.

Clase	Orden	Familia	Especie/Morfoespecie	Grupo Trófico	EB	Micrositio PS			
Arachnida	Araneae	Araneidae	<i>Argiopes</i> sp. 855	PRE	0	1			
			Araneidae sp. 844	PRE	1	0			
			Clubionidae sp. 870	PRE	0	2			
			Filistatidae	Filistatidae sp. 887	PRE	1	0		
			Lycosidae	Lycosidae sp. 807	PRE	10	9		
				<i>Aglaoctenus lagotis</i> Holmberg, 1876	PRE	4	0		
				<i>Lycosa malitiosa</i> Tullgren, 1905	PRE	83	85		
			Oxiopidae	Oxiopidae sp. 814	PRE	1	0		
			Salticidae	<i>Psecas splendidus</i> Badcock, 1932	PRE	0	1		
			Opilionida	Gagrelidae	<i>Caiza argentina</i> Ringuelet, 1959	PRE	39	19	
			Gonileptidae	Gonileptidae sp. 823	PRE	0	1		
			Buthidae	<i>Tityus confluens</i> Borelli, 1899	PRE	2	0		
			Scorpionida	Porcellionidae	Porcellionidae sp. 712	DET	24	1	
				Iulida	Rhinocricidae	<i>Anadenobolus</i> sp. 815	DET	15	2
					Polydesmida	Oniscodesmidae	<i>Crypturodesmus</i> sp. 801	DET	5
Insecta	Blattaria	Blattellidae	<i>Ischionoptera</i> sp. 705	DET	1	0			
		Indeterminada	Blattaria sp. 816	DET	3	9			
	Collembola	Entomobryidae	Entomobryidae sp. 401	DET	198	219			
	Coleoptera	Bostrichidae	Bostrichidae sp. 851	DET	1	0			
Brentidae		Brentidae sp. 860	DET	0	1				
		Carabidae	<i>Trirammatus moerens</i> Brullé, 1843	PRE	0	1			
			<i>Aspidoglossa intermedia</i> Dejean, 1831	PRE	0	2			
		<i>Ega montevidiensis</i> Tremoleras, 1917	PRE	1	0				
		<i>Inna megala</i> Reichardt, 1966	PRE	0	1				
		<i>Scarites trivialis</i> Chaudoir, 1890	PRE	0	1				
		Pterostichini sp. 874	PRE	0	2				
		<i>Bradycellus</i> sp. 810	PRE	0	19				
		Lebiini sp. 875	PRE	0	2				
		<i>Lebia</i> sp. 888	PRE	2	1				
		Coccinellidae	<i>Cycloneda sanguinea</i> Linnaeus, 1763	PRE	1	1			
		Curculionidae	Curculionidae sp. 826	HER	2	3			
		Elateridae	Elateridae sp. 878	DET	1	0			
		<i>Ptesimopsia parallela</i> Germain, 1841	PRE	1	0				
	Lampyridae	Lampyridae sp. 850	PRE	8	0				
	Scarabaeidae	Scarabaeidae sp. 854	DET	1	0				
			<i>Archophileurus chaconus</i> Kolbe, 1910	HER	10	13			
		<i>Aphodius</i> sp. 842	HER	1	1				
		<i>Dyscinetus gagates</i> Burmeister, 1847	HER	1	0				
		<i>Archophileurus</i> sp. 886	HER	1	0				
	Insecta	Coleoptera	Staphylinidae	Staphylinidae sp. 615	PRE	1	13		
Tenebrionidae			Tenebrionidae sp. 617	DET	8	3			
Indeterminada			Coleoptera sp. 319	DET	7	12			
Dermaptera		Anisolabiduridae	<i>Euborellia annulipes</i> Lucas, 1847	PRE	4	2			
Diptera		Syrphidae	Syrphidae sp. 880	PRE	2	0			
		Tephritidae	Tephritidae sp. 847	HER	1	0			
		Indeterminada	Diptera sp. 885	DET	2	5			
Hemiptera		Belostomatidae	Belostomatidae sp. 883	PRE	4	0			
		Lygaeidae	Lygaeidae sp. 861	HER	1	1			
		Pyrrochoridae	Pyrrochoridae sp. 827	HER	0	3			
		Reduviidae	Reduviidae sp. 817	PRE	0	1			
Homoptera		Cicadidae	Cicadidae sp. 618	HER	8	7			
Hymenoptera		Formicidae	<i>Odontomachus chelifer</i> Latreille, 1802	HOR-Pr	1	31			
			<i>Pachycondyla striata</i> Smith, 1858	HOR-Pr	329	120			
			<i>Pheidole</i> sp. 818	HOR-Gm	0	2			
	<i>Solenopsis</i> sp. 839		HOR-Gm	1	15				
	<i>Crematogaster</i> sp. 837		HOR-Gm	2	0				
	<i>Acromyrmex striatus</i> Roger, 1863		HOR-At	39	10				
	<i>Camponotus rufipes</i> Fabricius, 1775		HOR-Ca	12	23				
	<i>Neivamyrmex diversinodis</i> Borgmeier, 1933		HOR-Ec	60	32				
	Lepidoptera		Pyalidae	<i>Aglossa caprealis</i> Hübner, 1809	HER	2	6		
	Indeterminada		Lepidoptera sp. 621	HER	4	1			
			Orthoptera	Acrididae	Acrididae sp. 623	HER	6	14	
			Gryllidae	Gryllidae sp. 642	HER	25	26		
			Proscopidae	Proscopidae sp. 853	HER	1	0		
			Tettigonidae	Tettigonidae sp. 838	HER	0	1		

Seasonal size distribution of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) in an andean tropical river

Distribución estacional del tamaño de *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) en un río tropical andino

HUGO BOHÓRQUEZ¹, GLADYS REINOSO², and GIOVANY GUEVARA^{3*}

Abstract: Total body length and head capsule width (mm) were used as biometric characteristics in discriminating between size-frequency estimates of three *Anacroneuria* morphospecies, from 28 sampling sites along a tropical river subject to bimodal variations in water level in Central Colombia. A total of 344 specimens grouped into four size classes were collected. The highest abundance of *Anacroneuria* larvae was observed during the dry season and there was a higher abundance of small-sized individuals (body length <12mm). Overall, the highest abundance of stonefly larvae was recorded between 1000 to 1600m.a.s.l. Conductivity and pH showed a significant correlation with the total abundance of preimaginal stoneflies. Plecoptera size distribution patterns could be useful in assessing which stonefly size-spectra are susceptible to disturbance in tropical rivers and in evaluating their population dynamics.

Key words: Neotropics. Andes. Biometry. Body Size. Tropics.

Resumen: Se utilizaron el largo total y el ancho de la capsula cefálica como rasgos biométricos para estimar la frecuencia de tamaño de tres morfo-especies de *Anacroneuria* (Insecta: Plecoptera) registrados en 28 estaciones de muestreo ubicadas longitudinalmente en un río tropical del centro de Colombia sometido a un régimen de precipitación bimodal. Se coleccionaron 344 especímenes que fueron agrupados en cuatro clases de tamaño. La mayor abundancia de larvas se registró durante la estación seca con una mayor presencia de individuos “pequeños” (tamaño corporal <12mm). Considerando ambas épocas hidrológicas, la mayor abundancia de plecópteros ocurrió entre 1000 y 1600m.s.n.m. La conductividad y el pH del agua mostraron una correlación significativa con la abundancia de plecópteros pre-emergentes. Los patrones de distribución de tamaño de larvas de Plecoptera constituyen una herramienta valiosa para establecer la vulnerabilidad de los estadios larvales frente al efecto de la perturbación en ríos tropicales y para evaluar su dinámica poblacional.

Palabras clave: Neotrópico. Andes. Biometría. Tamaño Corporal. Trópico.

Introduction

The order Plecoptera, is a group of hemimetabolous insects with more than 3497 species described worldwide, of which 474 species are Neotropical (Fochetti and Tierno de Figueroa 2008), but recently 32 out of 508 valid names were considered questionable by Froehlich (2010). This order is an important component in lotic systems, both in terms of abundance and in terms of ecological significance (Zwick 2004; McLellan and Zwick 2007; Stark *et al.* 2009). In comparison to their temperate counterparts, tropical stoneflies are poorly understood (Sheldon and Theischinger 2009), and regional and local species lists are extremely incomplete. One reason for the paucity of systematics and ecological studies of tropical river Plecoptera is that identification of tropical species is difficult for non-specialists (Suhaila and Che Salmah 2011).

In Colombia, the order Plecoptera is represented by two families: Perlidae with three genera (*Anacroneuria*, *Macrogynoplax* and *Klapalekia*; Tamaris-Turizo *et al.* 2007; Zúñiga *et al.* 2007) and, Gripopterygidae with one genus (*Claudioplerla*, Barreto *et al.* 2005; Zúñiga *et al.* 2009). *Anacroneuria* Klapálek, 1909 (Plecoptera: Perlidae) is the largest Neotropical genus with more than 300 species (Froehlich 2003; Bispo *et al.* 2005; Tomanova and Tedesco 2007). Its distribution extends from the southern United States to northern Argentina

(Stark 2001; Froehlich 2004). Sixty-one species are reported from Colombia alone (Zúñiga *et al.* 2007). Nevertheless, there is no published information on stoneflies from the Tolima province, Central Colombia, except for the first record of the Gripopterygidae family in the Páramo ecosystem (Barreto *et al.* 2005), a special biogeographic zone at the highest altitudes of the Andean region in northern South America (Hofstede 1995). Despite their importance as water quality indicators, stoneflies have received little attention in Colombia and the peer-reviewed literature is scarce (Stark *et al.* 2009). The life histories and trophic interactions of stonefly larvae are not well-known even though they play an important ecological role in the freshwater ecosystems (Bohórquez *et al.* 2006; Tamaris-Turizo *et al.* 2007; Gamboa *et al.* 2009).

Biometric studies are important because several biological, physiological and ecological properties can be extracted from specific body dimensions (body length or head width; Beer-Stiller and Zwick 1995; Krasnov *et al.* 1996; Klingenberg and Spence 1997; Zwick 2003). The morphological characteristics of aquatic insect larvae can be influenced by biotic and abiotic factors (Crosa and Buffagni 2002; Tomanova and Tedesco 2007). Altitude, temperature, seasonality, competition and predation are key factors regulating insect abundances in aquatic environments (Brittain 1983; Saltveit *et al.* 1994; Cérégino and Lavandier 1998; Cérégino *et al.*

¹ Biólogo. Grupo de Investigación en Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué-Tolima-Colombia. boris3100@yahoo.es. ² M.Sc. Grupo de Investigación en Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué-Tolima-Colombia. greinosa@ut.edu.co. ^{3*} Ph.D. Grupo de Investigación en Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué-Colombia. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Campus Isla-Teja, Valdivia-Chile. Present address: Departamento de Desarrollo Rural y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales-Colombia. ggcolombia@gmail.com. Corresponding author.

2002). Worldwide, biometric research on plecopterans has mainly involved obtaining linear measurements to determine growth in immature stages (larvae) for life-cycle and secondary production analyses (e.g., Sheldon 1969, 1980; Schmidt and Tarter 1985; Lillehamur *et al.* 1989; Townsend and Pritchard 1998; Fenoglio *et al.* 2007; Principe 2008). Similarly, studies of morphometric differences (except taxonomic descriptions) in larvae and adults of the *Anacroneuria* genus and their relationships to environmental factors have been highlighted for some tropical rivers (Tomanova and Tedesco 2007; Fenoglio *et al.* 2007; Cressa *et al.* 2008; Gamboa and Arrivillaga 2010).

In tropical rivers, precipitation and discharge play an important role in structuring the benthic community (Silveira *et al.* 2006; Wantzen *et al.* 2006). These rivers and their aquatic communities are conditioned by rainfall during the rainy season (Turcotte and Harper 1982; Flecker and Feifarek 1994; Jacobsen and Encalada 1998; Buss *et al.* 2004; Jacobsen 2004; Bispo *et al.* 2006). Rivers in the Andean region of Colombia are also highly influenced by seasonal rainfall, normally occurring during two wet seasons, with sporadic spates even during the “dry” season (Restrepo and Kjerfve 2000; Arias *et al.* 2007).

The present study was carried out in the Prado River Basin, which is a valuable tributary of the Magdalena River, the most important river system in Colombia (Galvis and Mojica 2007). The objectives of this study were to measure the variation in body size of *Anacroneuria* larvae across sampling sites of varying in altitude during two contrasting seasons (dry and wet); to identify morphological differences caused by these temporal and spatial parameters; and to determine whether this life-history characteristic varies with elevation and season.

Materials and Methods

Study Area. The Prado River Basin is located in central Colombia, in the Department of Tolima (3°45'N - 74°56'W; Fig. 1), in the upper Magdalena Valley, between the Central Range and the Eastern Range of the Colombian Andes. The basin covers 170,000ha, with an annual mean temperature of 23.4°C and annual mean precipitation of 1896mm associated with two rainy seasons, one from March to May and the second between October and December (see Canosa and Pinilla 2001; Bohórquez *et al.* 2006; Guevara *et al.* 2009). Selected sampling sites ranged from 280 to 2260m.a.s.l.

Sampling of stonefly larvae. Sampling of *Anacroneuria* larvae was carried out over ten consecutive days at 28 sampling sites, during two contrasting seasons, August-September (dry season) and November 2005 (wet season). Stonefly larvae were collected using a hand-net (250µm mesh) and a Surber net (30 x 30cm, 250µm mesh) and then stored in 75% ethanol. All samples were pooled for each sampling site.

In the laboratory, body length (BL; from the front of the head to the tip of the abdomen), head capsule width (HCW; across the compound eyes), and mesothoracic wing pad length (WL; from the tip of the wing pad to the paramedial contact point with the mesonotum) of each specimen (*sensu* Nesterovitch and Zwick 2003) were measured to the nearest 0.01mm using a stereomicroscope (Olympus, 10X). We sorted the collected larvae into three different *Anacroneuria* morphospecies (M1, M2, M3; see Bohórquez *et al.* 2006)

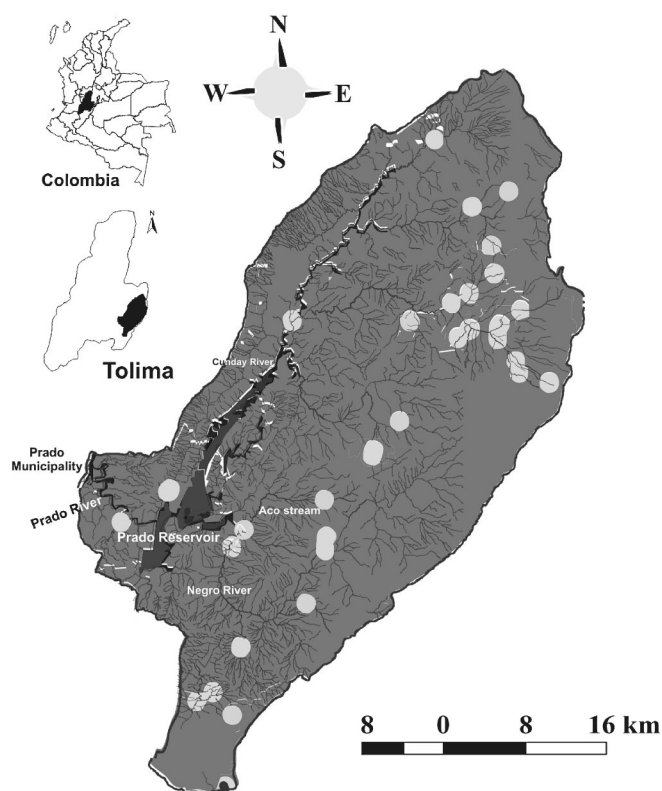


Figure 1. Location of the Prado River Basin in Tolima Province (Colombia). The distribution of *Anacroneuria* larvae in watershed networks is shown by yellow circles.

related to variations in body size and pigmentation, among other morphological traits. Intrastadial sizes characterized by differences in the shape of the margins, the orientation and the pigmented pattern of hind wingpads, i.e., rounded, pronounced and darkish, were traced by assigning larvae to one of four arbitrary size classes (obtained from frequency histograms), given that estimation of larval instars is difficult for stoneflies because of their molting times (Otsuki and Iwakuma 2008). Therefore, body length measurements for each morphospecies were used to construct size-frequency distributions pooled into four size classes (mm). Selected physical, chemical and microbiological parameters were recorded at each sampling site and later analyzed following methodologies proposed by APHA-AWWA-WEF (Clesceri *et al.* 1999).

The relationships between total larval abundance and elevation or physicochemical variables were analyzed by means of Spearman Rank Correlation test, due to lack of normality. We used linear regressions to test the relationships between the body length and head capsule width measurements. Since morphospecies 3 (M3) abundance was low during each sampling period (4 during the dry season, 2 during the wet season), we combined the data from both seasons when fitting linear regressions. All analyses were performed using STATISTICA version 7 (StatSoft 2004) considering a significance of 5% ($\alpha=0.05$).

Results

Abundance and physicochemical variables. During the dry season, there were three-fold more plecopteran larvae than

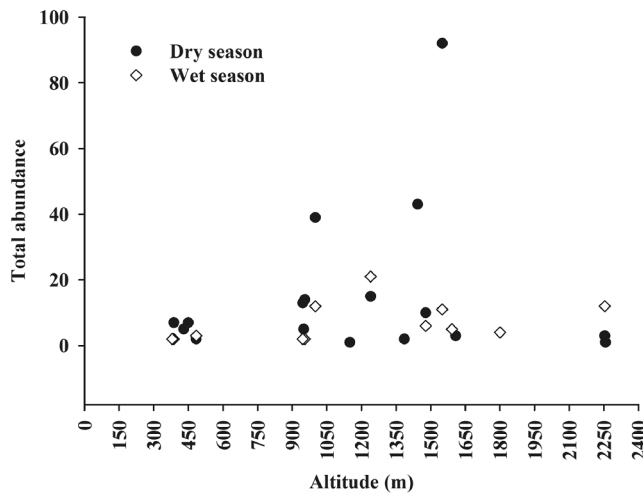


Figure 2. Scatter plot of the total abundance of *Anacroneria* larvae against elevation in the Prado River Basin (Tolima, Colombia) during 2005. Note the contrasting total numbers of individuals between dry and wet seasons.

during the rainy season. The total abundance was significantly correlated with elevation during the wet season ($n=12$; $r=0.66$, $P=0.018$), but not during the dry season ($n=17$; $r=0.08$, $P>0.05$). The highest larval abundance was registered between 1000 to 1600m.a.s.l. (Fig. 2).

The physicochemical variables, water temperature, air temperature, pH, conductivity, total hardness, and total and fecal coliforms, were highest during the dry season. On the contrary, conductivity, dissolved oxygen and O_2 saturation percentage displayed higher values during high water level conditions (Table 1). The pH and conductivity variables showed a significant correlation with total abundance during the dry season ($n=17$; $r=-0.58$, $P=0.014$; $r=-0.57$, $P=0.015$, respectively), while only conductivity was marginally significant during the wet season ($n=12$; $r=-0.57$, $P=0.047$).

Measurements of body size. We measured 344 *Anacroneria* larvae, of which 262 were collected during the dry season and 82 during the wet season. Larvae varied in size, representing a wide range of growth phases (Fig. 3). Body size ranged from 4 to 20mm. In all cases, larval stages were more abundant during the dry season, with a great abundance of the smallest larvae, i.e., <12mm in body length (Fig. 3). However, we did not find a significant relationship between total body length and altitude, or any physical and chemical parameter.

The smallest head capsule width was 1.08mm, and the maximum was 3.95mm. We found a relationship between total body length and head capsule width in every morphospecies and according to season. This relationship was strongly isometric (Fig. 4) and linear, with the following equations being highly significant for all morphospecies: **M1** (dry and wet season; $r^2=0.98$, $P<0.001$ and $r^2=0.91$, $P<0.001$); **M2** ($r^2=0.81$, $P<0.001$ and $r^2=0.69$, $P<0.001$); **M3** ($r^2=0.80$, $P<0.016$). Larvae of all morphospecies exhibited continuous variation of both HCW and WL and could not be grouped precisely into instars based on either one of these variables.

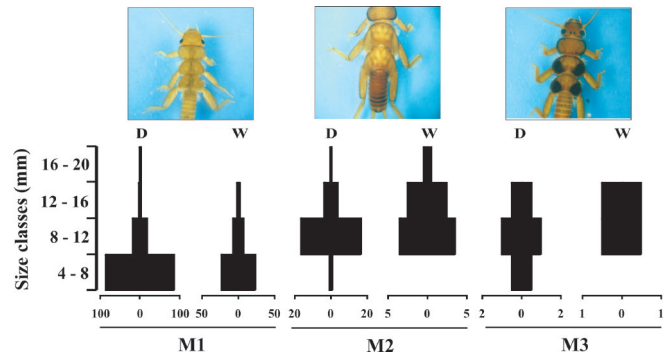


Figure 3. Size-frequency distribution (mm) of the body length of Plecoptera larvae in the Prado River Basin in central Colombia. Values of the X-axis are proportional to the total abundance during each season. D=Dry season, W=Wet season. M=morphospecies: specimens that have been sorted and classified as distinct according to their shape and morphological characteristics, although unidentified and unsexed; M1: morphospecies 1, M2: morphospecies 2, M3: morphospecies 3. Main intrastadial changes are shown in the upper part.

Discussion

Larvae occurrence. Our results suggest that the greatest abundances of larger larvae from M2 and M3 of *Anacroneria* spp. during the dry season corresponded to individuals near emergence (pre-emergent), although it has been suggested that some Colombian *Anacroneria* emerge throughout year, thereby displaying possible non-seasonality (Tamaris-Turizo *et al.* 2007). In other regions of the country emergence peaks are related to the transition between dry and rainy seasons (Zúñiga *et al.* 2003). Also, some mature *Anacroneria* larvae (last instar) reaching the adult stage have been found to be of smaller size (M. del C. Zúñiga, pers. com.). Various insects, hemi- as well as holometabolous, emerge at successively smaller sizes throughout the emergence period (Nesterovitch and Zwick 2003). Although a frequency distribution of measurements was constructed to visualize the number of larval instars, the limits of each instar were defined by lower frequencies fitted to one of four size classes. We associated the instars of each morphospecies with the development, shape and coloration of wing pads (e.g., Roessler and Zamora 1997). Our results indicate the existence of at least four larval instars for these morphospecies. However, we strongly recommend carrying out thorough periodical sampling over a year and fitting the WL : HCW ratio against the HCW, as suggested by Beer-Stiller and Zwick (1995) to determine voltinism and identify “real” instars.

Zwick (2003) argued that in Plecoptera, the first small rudiments of wingpads appear in the antepenultimate instar, and the definite shape is reached during subsequent molts. We sorted morphs according to biometric characters (mainly wingpads) and color similarities, and identified and grouped them according to stonefly congeneric specie, which unquestionably under-represents the actual species richness for the river and the region. For instance, we report the presence of at least three species which are probably correlated to the three morphs, but a minimum of 58 species have been described in Colombia based on adult collections (Zúñiga *et al.* 2007). Since most ecological and biological studies ideally involve aquatic insects in the adult stage (mainly males), it is neces-

Table 1. Physical, chemical and microbiological parameters at 28 sampling sites along the Prado River Basin recorded during two contrasting seasons in 2005.

Altitude (m)	Dry season										Wet season										
	WT	AT	pH	T	C	TH	DO	% DO	TC	FC	WT	AT	pH	T	C	TH	DO	% DO	TC	FC	
1	2257	17.5	22.9	7.22	1.10	39.5	17.00	5.0	69.40	7	0	16.4	13	6.44	2.27	51	23.84	7.9	81.9	8	0
2	2254	14.2	25.2	7.62	3.60	47.2	18.00	4.9	68.00	3	1	15.3	12.8	6.01	4.5	49.6	38	7	97.2	10	0
3	1800	17.7	28.3	4.30	1.67	27.7	13.00	6.0	83.30	20	2	17.5	16.1	5.02	7.04	18.5	69.3	7.6	77	30	7
4	1703	20.7	21.2	3.85	5.82	171.0	4.00	7.7	84.70	3	0	17.7	18.3	5.14	2.62	14.3	10.58	5.7	79.1	15	1
5	1608	15.8	19.5	6.01	77.00	59.1	30.00	8.3	87.50	7	1	17.5	16.3	6.37	11.9	40.3	16.35	6.6	91.6	15	4
6	1592	17.8	18.9	5.34	1.17	11.0	5.20	6.9	95.80	9	0	20	17.7	6.03	1.55	13	8.27	4.8	66.6	7	1
7	1550	17.4	23.2	6.70	0.82	2.0	8.00	4.9	68.06	10	0	18	15.9	4.96	0.7	25.1	48.3	6.3	87.5	39	3
8	1478	18.2	18.9	6.62	6.50	20.0	12.00	4.4	61.00	40	0	23.9	20	6.39	4.6	11.6	4.81	5.6	77	5	1
9	1443	22.0	18.5	5.68	3.33	20.3	33.85	4.8	66.60	18	5	22	18.5	5.68	3.33	20.3	33.85	4.8	66.6	18	5
10	1441	19.2	23.3	5.15	1.07	105.0	10.40	6.5	90.20	9	0	22.7	20.2	6.06	1.5	15.7	14.62	6.1	84.7	10	0
11	1386	17.8	21.6	7.43	1.76	88.5	44.00	6.0	83.33	110	0	19.5	17.7	6.36	3.03	66.3	0	5	69.4	65	6
12	1240*	19.0	22.3	6.53	2.58	14.4	27.00	5.0	68.00	10	0	23.2	18	5.27	3.11	17	25.9	6.5	90.2	23	4
13	1240	16.7	20.0	7.07	0.97	21.4	12.00	6.2	86.11	50	0	19.4	17	5.23	1.39	28.7	51.34	6	83.3	21	6
14	1150	20.7	27.1	7.28	2.00	172.1	81.00	4.5	62.50	10	0	23.2	21.2	6.36	5.7	56.2	29.8	7.3	87.5	24	2
15	1000*	21.6	27.3	7.04	2.01	50.5	21.00	6.7	93.06	30	0	26.1	21.6	6.27	12.7	37.6	20.7	4.8	66.6	16	1
16	1000	21.1	23.9	7.05	2.10	46.1	19.00	6.3	87.50	31	1	26.1	21.8	6.68	3.43	42	19.61	5.1	70.8	25	2
17	969	20.5	23.2	6.53	3.20	19.0	14.00	5.4	75.00	14	0	25.3	21.3	6.56	2.05	14.6	16.15	6	83.3	3	2
18	955	22.0	35.3	6.74	4.15	21.7	15.00	5.4	75.00	17	0	22.7	20.2	6.49	0.22	14	15.7	4.9	68	13	0
19	950	19.0	19.2	7.68	1.50	290.0	73.00	4.4	61.11	80	0	19.3	18.5	8.53	20.5	95.6	48.27	7.2	86.1	13	27
20	946	21.8	31.0	6.57	0.12	15.6	12.00	5.7	79.17	12	0	21.4	22.4	6.54	1.66	11.6	13.65	6.9	95.8	6	0
21	484	25.0	31.6	7.70	2.92	49.5	29.00	5.9	81.94	11	0	27.6	24.1	6.62	10.2	19.8	12.5	6.1	84.7	31	0
22	450	29.0	24.7	7.23	2.57	93.3	43.00	4.9	69.00	160	200	27.7	23	6.96	82.6	54.9	30.2	5.8	80	12	20
23	430	25.1	31.6	6.92	11.50	27.2	20.00	5.7	79.00	120	0	26.1	24.9	7.6	12.8	35.4	17.5	7.2	72	9	1
24	429	23.6	24.7	6.85	1.10	27.1	20.00	5.4	72.00	115	5	23.3	23	7	0.32	23.7	15.4	7.1	98.6	7	3
25	387	24.7	31.2	7.64	5.80	262.0	74.00	6.6	91.00	20	10	30.9	23.7	6.9	0.96	91.3	34.03	7.2	72	5	7
26	380	23.4	25.0	7.00	3.40	51.7	24.00	5.7	79.00	60	0	26.4	24.3	7.05	14.4	61.4	29	6.3	87.5	2	3
27	308	24.5	24.4	6.35	7.32	62.7	32.88	6.1	85.00	530	270	24.5	24.4	6.35	7.32	62.7	32.88	6.1	85	530	270
28	289	28.1	26.1	7.47	4.30	57.4	36.00	5.5	72.00	50	0	28.2	26.7	7	5.45	64.5	28.85	6.1	84	190	400

WT = water temperature (°C); AT = air temperature (°C); T = turbidity (NTU); C = conductivity (μS/cm); TH = Total Hardness (mg/l CaCO₃); DO = dissolved oxygen (mg/l); %DO = percentage dissolved oxygen; TC = total coliforms (CFU 100ml⁻¹); FC = fecal coliforms (CFU 100ml⁻¹). *Different sampling points.

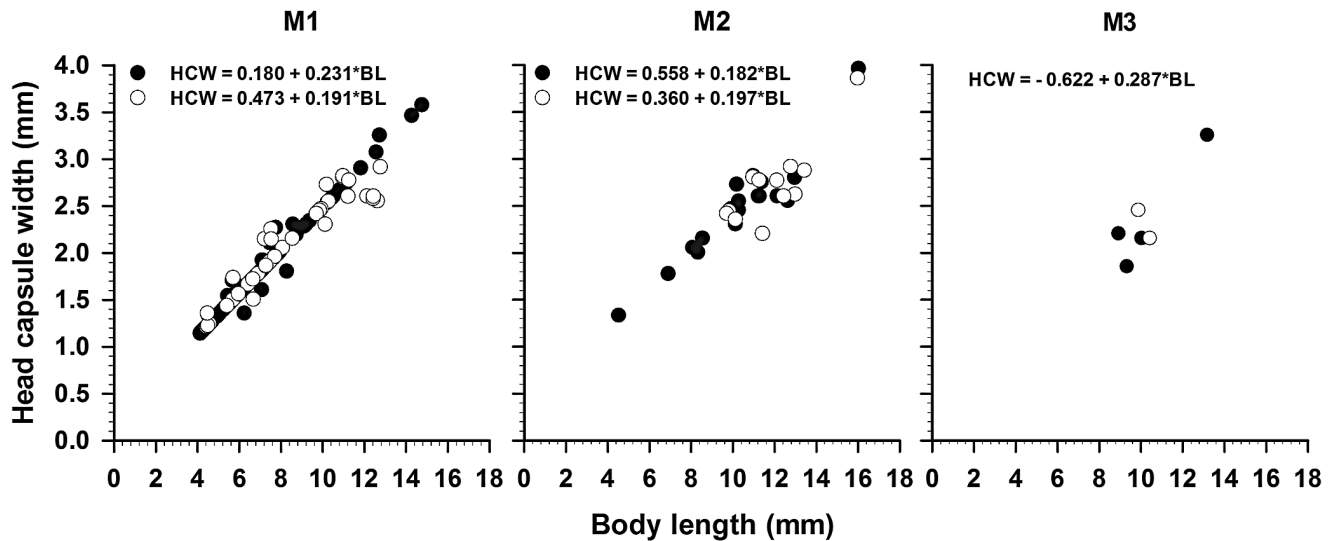


Figure 4. Relationship between body length (BL) and head capsule width (HCW) of three *Anacroneuria* morphospecies registered during contrasting seasons in the Prado River Basin (Tolima, Colombia). Regression equations are also shown. ●=dry season, ○=wet season.

sary to rear larvae in order to associate them with the adults (Hamada and Couceiro 2003). Therefore, more detailed studies are required in the region, beginning with adult collections, species identification and adult-larvae associations (rearing). These aspects are important for future life-cycle studies, nutrient fluxes, biodiversity and secondary production analyses in tropical rivers where the limnology remain understudied (Allan *et al.* 2006).

Alternation between dry and wet seasons. The entire Prado River Basin and network of streams experience two pronounced dry seasons (from January through March, and July through September) alternating with two rainy seasons from April to June and October to December, exhibiting notable seasonal precipitation, flow and discharge (Salazar *et al.* 2002; Guevara *et al.* 2009). During this bimodal water level variation, changes occur in the richness and abundance of benthos (Caupaz *et al.* 2006; Guevara *et al.* 2007a) and fish communities (Castro-Roa *et al.* 2007). This discharge in Andean rivers has been observed to be strongly seasonal (Allan *et al.* 2006). For instance, in rivers of the Colombian Andes subjected to high water-level conditions, a reduction in the abundance of invertebrates has been reported (Arias *et al.* 2007; Guevara *et al.* 2007b), but in northern Colombia, in the Sierra Nevada de Santa Marta Natural National Park, *Anacroneuria* larvae show similar distribution patterns (Tamaris-Turizo *et al.* 2007). Additionally, in tropical rivers the effects of predation by insectivorous fish on the population dynamics of *Anacroneuria* larvae are important (Tomanova and Tedesco 2007).

In general, tropical freshwater bodies are characterized by drastic variations in benthic community abundance during high water level conditions (Winemiller and Jepsen 1998; Jacobsen and Encalada 1998; Rincon and Cressa 2000; Wantzen 2003). Turcotte and Harper (1982) suggested that rainfall spates are the major factor regulating benthic densities in non-seasonal environments (Amazon drainage basin, Ecuador). The stonefly larvae abundance found during the wet season (November) was markedly different from that found during the dry season (August-September). The high pre-

cipitation registered during the second sampling period, November (wet season), increased discharge and consequently stream and river instability, altering the community structure by dislodging substrate and forcing drifting (Céréghino and Lavandier 1998; Céréghino *et al.* 2002). In a tropical river of Venezuela, *Anacroneuria* larvae were most abundant during the period of least precipitation (Pérez and Segnini 2005). These results are concomitant with a study of caddisfly larvae in the Coello River watershed, Central Colombia, where lowest abundances were recorded during the rainy season (Guevara *et al.* 2005, 2007b).

Physicochemical variables and altitude. Several physicochemical parameters varied in relation to seasonal hydrological variation in tropical rivers (Winemiller and Jepsen 1998). During extended wet periods, water temperature and conductivity tend to be lower, and dissolved oxygen concentrations tend to be higher. This tendency was observed in the majority of the variables measured in our study, which were related to seasonal changes in water level. However, only pH and conductivity were significantly correlated with abundance under low water level conditions suggesting a possible cause-and-effect relationship between these variables. During rising water events, conductivity appears to affect the total abundance of *Anacroneuria* larvae (Bücker *et al.* 2010). Throughout the drainage networks of the Prado River Basin, physicochemical attributes also are affected by human activities (e.g., agriculture, livestock, and cobble and sand extraction) mainly in lower altitude areas, generating different population responses in stoneflies to variations in altitude. Water temperature and dissolved oxygen decreased with altitude, while other measured variables were uncorrelated with elevation, as was reported for Ecuadorian streams (Jacobsen 2008). It is therefore necessary to explore with more detail the relationships among physicochemical variables, *Anacroneuria* species richness, abundance, emergence patterns, and altitude from headwater streams to the river's mouth.

In general terms, a decline in species richness with increasing altitude was observed (Von Ellenrieder 2007), as well as a decline in frequency of occurrence in certain spe-

cies towards higher altitudes, without disappearing altogether (Jacobsen *et al.* 2003; Jacobsen and Brodersen 2008). Other species can disappear completely at different points along the altitude gradient, which affects their local and regional abundance (Romero-Alcaraz and Avila 2000).

Although the size of stoneflies in temperate regions seems to be correlated with environmental factors such as photoperiod, water temperature and season (Nesterovitch and Zwick 2003), our results suggest that environmental factors in the study area do not influence size or that these physicochemical parameters are not sufficiently different to affect larval size. Also, we did not find a significant relationship between body length and elevation, but it is possible that a further evaluation of pre-emergent *Anacroneuria* larvae may reveal significant correlations with altitude and/or any other physicochemical variable (e.g., Tomanova and Tedesco 2007; Cressa *et al.* 2008).

Acknowledgements

The authors would like to thank to the anonymous reviewers for the very helpful suggestions and criticisms that improved the manuscript draft. All remaining errors and omissions are our responsibility. Thanks also to CORTOLIMA (regional environmental authority) and the University of Tolima for supporting this research. G. Guevara thanks the Austral University of Chile for the doctoral fellowships (MECESUP UCO0214 - AUS0703) and the Subcommittee of the Permanent Committee for Mayflies and Stoneflies Conferences for travel scholarships to attend the International Joint Meeting on Ephemeroptera and Plecoptera held in Stuttgart in June 2008.

Cited Literature

- ALLAN, J. D.; FLECKER, A. S.; SEGNINI, S.; TAPHORN, D. C.; SOKOL, E.; KLING, G. W. 2006. Limnology of Andean piedmont rivers of Venezuela. *Journal of the North American Benthological Society* 25 (1): 66-81.
- ARIAS, D. M.; REINOSO, G.; GUEVARA, G.; VILLA, F. A. 2007. Distribucion espacial y temporal de los coleopteros acuaticos en la cuenca del rio Coello (Tolima, Colombia). *Caldasia* 29 (1): 177-194.
- BARRETO, G.; REINOSO, G.; GUEVARA, G.; VILLA, F. A. 2005. Primer registro de Gripopterygidae (Insecta: Plecoptera) para Colombia. *Caldasia* 27 (2): 243-246.
- BEER-STILLER, A.; ZWICK, P. 1995. Biometric studies of some stoneflies and a mayfly (Plecoptera and Ephemeroptera). *Hydrobiologia* 299 (2): 169-178.
- BISPO, P. C.; OLIVEIRA, L. G.; BINI, L. M.; SOUSA, K. G. 2006. Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera assemblages from riffles in mountain streams of Central Brazil: environmental factors influencing the distribution and abundance of immatures. *Brazilian Journal of Biology* 66 (2b): 611-622.
- BISPO, P. C.; NEVES, C. O.; FROEHLICH, C. G. 2005. Two new species of Perlidae (Plecoptera) from Mato Grosso State, western Brazil. *Zootaxa* 795: 1-6.
- BOHÓRQUEZ, H. F.; REINOSO, G.; GUEVARA, G.; VILLA, F. A. 2006. Estudio de la abundancia, distribucion y estadios de las ninfas de plecopteros en la cuenca del rio Prado, Departamento del Tolima. *Asociacion Colombiana de Limnologia "Neolimnos"* 1: 117-122.
- BRITAIN, J. E. 1983. The influence of temperature on nymphal growth rates in mountain stoneflies (Plecoptera). *Ecology* 64: 440-446.
- BÜCKER, A.; SONDERMANN, M.; FREDE, H.-G.; BREUER, L. 2010. The influence of land-use on macroinvertebrate communities in montane tropical streams a case study from Ecuador. *Fundamental and Applied Limnology* 177 (4): 267-282.
- BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L.; EGLER, M. 2004. Substrate specificity, environmental degradation and disturbance structuring macroinvertebrate assemblages in neotropical streams. *Hydrobiologia* 518 (1): 179-188.
- CANOSA, A.; PINILLA, G. 2001. Total bacterial populations in three lentic water bodies of the Colombian Andes using the epifluorescence technique. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 6 (2): 169-174.
- CASTRO-ROA, D.; VILLA-NAVARRO, F. A.; GARCÍA-MELO, J. E.; GARCIA-MELO, L. J.; HERRADA-YARA, M. E.; REINOSO-FLOREZ, G. 2007. Distribucion y aspectos ecologicos de *Bryconamericus tolinae* en la cuenca del rio Prado, Colombia. *Dahlia* 9: 77-86.
- CAUPAZ, F. J.; REINOSO, G.; GUEVARA, G.; VILLA, F. A. 2006. Diversidad y distribucion de la familia Elmidae (Insecta: Coleoptera) en la cuenca del rio Prado (Tolima, Colombia). *Asociacion Colombiana de Limnologia "Neolimnos"* 1 (1): 106-116.
- CÉRÉGHINO, R.; CUGNY, P.; LAVANDIER, P. 2002. Influence of Intermittent Hydropeaking on the Longitudinal Zonation Patterns of Benthic Invertebrates in a Mountain Stream. *International Review of Hydrobiology* 87 (1): 47-60.
- CÉRÉGHINO, R.; LAVANDIER, P. 1998. Influence of hydropeaking on the distribution and larval development of the Plecoptera from a mountain stream. *Regulated Rivers: Research & Management* 14 (3): 297-309.
- CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, D. C.
- CRESSA, C.; MALDONADO, V.; SEGNINI, S.; CHACON, M. M. 2008. Size variation with elevation in adults and larvae of some Venezuelan stoneflies (Insecta: Plecoptera: Perlidae). *Aquatic Insects* 30 (2): 127-134.
- CROSA, G.; BUFFAGNI, A. 2002. Spatial and temporal niche overlap of two mayfly species (Ephemeroptera): the role of substratum roughness and body size. *Hydrobiologia* 474 (1): 107-115.
- FENOGLIO, S.; MALACARNE, G.; BO, T. 2007. Allometric growth in *Anacroneuria* Klapálek 1909 nymphs (Plecoptera Perlidae). *Tropical Zoology* 20 (1): 109-114.
- FLECKER, A. S.; FEIFAREK, B. 1994. Disturbance and the temporal variability of invertebrate assemblages in two Andean streams. *Freshwater Biology* 31 (2): 131-142.
- FOCHETTI, R.; TIERNO DE FIGUEROA, J. 2008. Global diversity of stoneflies (Plecoptera; Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia* 595 (1): 365-377.
- FROEHLICH, C. G. 2010. Catalogue of Neotropical Plecoptera. *Iliesia* 6 (12): 118-125.
- FROEHLICH, C. G. 2004. *Anacroneuria* mainly from southern Brazil and northeastern Argentina (Plecoptera: Perlidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115: 75-107.
- FROEHLICH, C. G. 2003. Stoneflies (Plecoptera: Perlidae) from the Brazilian Amazonia with the description of three new species and a key to *Macrogynoplax*. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 38: 129-134.
- GALVIS, G.; MOJICA, J. I. 2007. The Magdalena River fresh water fishes and fisheries. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 10: 127-139.
- GAMBOA, M.; ARRIVILLAGA, J. 2010. Análisis morfométrico de cuatro especies simpátricas del género *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae). *Limnetica* 29 (2): 247-256.
- GAMBOA, M.; CHACÓN, M. M.; SEGNINI, S. 2009. Diet composition of the mature larvae of four *Anacroneuria* species (Plecoptera: Perlidae) from the Venezuelan Andes. *Aquatic Insects* 31 (supl): 409-417.

- GUEVARA, G.; LOZANO, P.; REINOSO, G.; VILLA, F. 2009. Horizontal and seasonal patterns of tropical zooplankton from the eutrophic Prado Reservoir (Colombia). *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters* 39 (2): 128-139.
- GUEVARA, G.; LOPEZ, E. O.; REINOSO, G.; VILLA, F. A. 2007a. Structure and distribution of the Trichoptera fauna in a Colombian Andean river basin (Prado, Tolima) and their relationship to water quality. In: BUENO-SORIA, J.; BARBA-ALVAREZ, R.; ARMITAGE, B. (eds.) *Proceedings of the XIIth International Symposium on Trichoptera*. The Caddis Press, Ohio.
- GUEVARA, G.; REINOSO, G.; VILLA, F. A. 2007b. Caddisfly larvae (Insecta: Trichoptera) of the Coello River Basin in Tolima (Colombia): spatial and temporal patterns and bioecological aspects. In: BUENO-SORIA, J.; BARBA-ALVAREZ, R.; ARMITAGE, B. (eds.) *Proceedings of the XIIth International Symposium on Trichoptera*. The Caddis Press, Ohio.
- GUEVARA, G.; REINOSO, G.; VILLA, F. A. 2005. Estudio del Orden Trichoptera en su estado larval en la cuenca del río Coello Departamento del Tolima. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas* 17: 59-70.
- HAMADA, N.; COUCEIRO, S. R. M. 2003. An illustrated key to nymphs of Perlidae (Insecta, Plecoptera) genera in Central Amazonia, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 47 (3): 477-480.
- HOFSTEDE, R. G. M. 1995. Effects of livestock farming and recommendations for management and conservation of páramo grasslands (Colombia). *Land Degradation and Development* 6 (3): 133-147.
- JACOBSEN, D. 2004. Contrasting patterns in local and zonal family richness of stream invertebrates along an Andean altitudinal gradient. *Freshwater Biology* 49 (10): 1293-1305.
- JACOBSEN, D. 2008. Low oxygen pressure as a driving factor for the altitudinal decline in taxon richness of stream macroinvertebrates. *Oecologia* 154 (4): 795-807.
- JACOBSEN, D.; BRODERSEN, K. P. 2008. Are altitudinal limits of equatorial stream insects reflected in their respiratory performance? *Freshwater Biology* 53: 2295-2308.
- JACOBSEN, D.; ROSTGAARD, S.; VASCONEZ, J. J. 2003. Are macroinvertebrates in high altitude streams affected by oxygen deficiency? *Freshwater Biology* 48 (11): 2025-2032.
- JACOBSEN, D.; ENCALADA, A. 1998. The macroinvertebrate fauna of Ecuadorian high-land streams in the wet and dry season. *Archiv für Hydrobiologie* 142: 53-70.
- KLINGENBERG, C. P.; SPENCE, J. 1997. On the role of body size for life-history evolution. *Ecological Entomology* 22 (1): 55-68.
- KRASNOV, B.; WARD, D.; SHENBROT, G. 1996. Body size and leg length variation in several species of darkling beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) along a rainfall and altitudinal gradient in the Negev Desert (Israel). *Journal of Arid Environments* 34 (4): 477-489.
- LILLEHAMNUR, A.; BRITAIN, J. E.; SALTVEIT, S. J.; NIELSEN, P. S. 1989. Egg development, nymphal growth and life cycle strategies in Plecoptera. *Ecography* 12 (2): 173-186.
- MCLELLAN, I. D.; ZWICK, P. 2007. New species of and keys to South American Gripopterygidae (Plecoptera). *Illiesia* 3 (4): 20-42.
- NESTEROVITCH, A.; ZWICK, P. 2003. The development of *Nemurella pictetii* Klapálek (Plecoptera: Nemouridae) in two springstreams in central Europe. *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters* 33 (4): 231-243.
- OTSUKI, A.; IWAKUMA, T. 2008. Life history, growth patterns and feeding habits of two predatory stoneflies, *Skwala pusilla* (Perlidae) and *Kamimuria tibialis* (Perlidae) in northern Japan. *Aquatic Insects* 30 (1): 29-41.
- PÉREZ, B.; SEGNINI, S. 2005. Variación espacial de la composición y diversidad de géneros de Ephemeroptera (Insecta) en un río tropical altandino. *Entomotropica* 20 (1): 49-57.
- PRINCIPE, R. E. 2008. Taxonomic and Size Structures of Aquatic Macroinvertebrate Assemblages in Different Habitats of Tropical Streams, Costa Rica. *Zoological Studies* 47 (5): 525-534.
- RESTREPO, J. D.; KJERFVE, B. 2000. Magdalena river: interannual variability (1975-1995) and revised water discharge and sediment load estimates. *Journal of Hydrology* 235 (1-2): 137-149.
- RINCON, J.; CRESSA, C. 2000. Temporal variability of macroinvertebrate assemblages in a Neotropical intermittent stream in Northwestern Venezuela. *Archiv für Hydrobiologie* 148: 421-432.
- ROESSLER, E. W.; ZAMORA, H. 1997. Número de estadios naya-dales, ciclo biológico y patrón de crecimiento de *Anacroneuria caucana* (Insecta-Plecoptera). *Unicauca Ciencia* 2: 15-24.
- ROMERO-ALCARAZ, E.; AVILA, J. M. 2000. Effect of elevation of type of habitat on the abundance and diversity of Scarabaeoid dung beetle (Scarabaeoidea) assemblages in a Mediterranean area from Southern Iberian Peninsula. *Zoological Studies* 39 (4): 351-359.
- SALAZAR, C.; VILLA, F. A.; REINOSO, G. 2002. Distribución espacial y temporal de las clorofíceas en el Embalse de Prado (Tolima). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas* 14 (1): 57-64.
- SALTVEIT, S. J.; BREMNES, T.; BRITAIN, J. E. 1994. Effect of a changed temperature regime on the benthos of a Norwegian regulated river. *Regulated Rivers: Research & Management* 9 (2): 93-102.
- SCHMIDT, D. A.; TARTER, D. C. 1985. Life history and ecology of *Acroneuria carolinensis* (Banks) in Panther Creek, Nicholas County, West Virginia (Plecoptera: Perlidae). *Psyche* 92: 393-406.
- SHELDON, A. L.; THEISCHINGER, G. 2009. Stoneflies (Plecoptera) in a tropical Australian stream: diversity, distribution and seasonality. *Illiesia* 5 (6): 40-50.
- SHELDON, A. L. 1980. Coexistence of perlid stoneflies (Plecoptera): Predictions from multivariate morphometrics. *Hydrobiologia* 71 (1): 99-105.
- SHELDON, A. L. 1969. Size relationships of *Acroneuria californica* (Perlidae, Plecoptera) and its prey. *Hydrobiologia* 34 (1): 85-94.
- SILVEIRA, M. P.; BUSS, D. F.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. 2006. Spatial and temporal distribution of benthic macroinvertebrates in a Southeastern Brazilian river. *Brazilian Journal of Biology* 66: 623-632.
- STARK, B. P.; FROELICH, C. G.; ZÚÑIGA, M. C. 2009. South American Stoneflies (Plecoptera). Pensoft, Sofia-Moscow.
- STARK, B. P. 2001. A synopsis of Neotropical Perlidae (Plecoptera). In: DOMINGUEZ, E. (ed.) *Trends in Research in Ephemeroptera and Plecoptera*. Kluwer Academic/Plenum, New York.
- STATSOFT 2004. STATISTICA (data analysis software system).
- SUHAILA, A. H.; CHE SALMAH, M. R. 2011. Stoneflies (Insecta: Plecoptera) in Malaysian tropical rivers: diversity and seasonality. *Journal of Entomology and Nematology* 3 (2): 30-36.
- TAMARIS-TURIZO, C. E.; ZÚÑIGA, M. D. C.; TURIZO-CORREA, R. R. 2007. Distribución espacio-temporal y hábitos alimentarios de ninfas de *Anacroneuria* (Insecta: Plecoptera: Perlidae) en el Río Gaira (Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia). *Caldasia* 29 (2): 375-385.
- TOMANOVA, S.; TEDESCO, P. A. 2007. Tamaño corporal, tolerancia ecológica y potencial de bioindicación de la calidad del agua de *Anacroneuria* spp. (Plecoptera: Perlidae) en América del Sur. *Revista de Biología Tropical* 55 (1): 67-81.
- TOWNSEND, G. D.; PRITCHARD, G. 1998. Larval growth and development of the stonefly *Pteronarcys californica* (Insecta: Plecoptera) in the Crowsnest River, Alberta. *Canadian Journal of Zoology* 76: 2274-2280.
- TURCOTTE, P.; HARPER, P. P. 1982. The macro-invertebrate fauna of a small Andean stream. *Freshwater Biology* 12 (5): 411-419.

- VON ELLENRIEDER, N. 2007. Composition and structure of aquatic insect assemblages of Yungas mountain cloud forest streams in NW Argentina. *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina* 66 (3-4): 57-76.
- WANTZEN, K. M.; RAMIREZ, A.; WINEMILLER, K. O. 2006. New vistas in Neotropical stream ecology-Preface. *Journal of the North American Benthological Society* 25 (1): 61-65.
- WANTZEN, K. M. 2003. Cerrado streams - characteristics of a threatened freshwater ecosystem type on the Tertiary Shields of Central South America. *Amazoniana* 14 (3-4): 481-502.
- WINEMILLER, K. O.; JEPSEN, D. B. 1998. Effects of seasonality and fish movement on tropical river food webs. *Journal of Fish Biology* 53 (sA): 267-296.
- ZÚÑIGA, M. C.; DIAS, L.; MARTÍNEZ, D.; ZABALA, G.; BACCA, T. 2009. The first record of *Claudioperla* Illies (Plecoptera: Gripopterygidae) from Colombia. *Aquatic Insects: International Journal of Freshwater Entomology* 31 (1, Supp. 1): 743-744.
- ZÚÑIGA, M. C.; STARK, B. P.; CARDONA, W.; TAMARIS-TURIZO, C.; ORTEGA, O. E. 2007. Additions to the Colombian *Anacroneuria* fauna (Plecoptera: Perlidae) with descriptions of seven new species. *Illiesia* 3 (13): 127-149.
- ZÚÑIGA, M. C.; BALLESTEROS, Y. V.; GRISALES, M. 2003. Nocturnal emergence patterns of four species of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) in a tropical Inter-Andean stream (Colombia, South America). Abstracts of the ZWICK, P. 2004. Key to the west Palaearctic genera of stoneflies (Plecoptera) in the larval stage. *Limnologica* 34 (4): 315-348.
- ZWICK, P. 2003. Shapes and patterns of wingpad development in the Plecoptera. In: GAINO, E. (ed.) *Research update on Ephemeroptera and Plecoptera*. University of Perugia. Perugia.

Recibido: 28-feb-2011 • Aceptado: 25-oct-2011

Recursos ecológicos utilizados por las especies de *Xylocopa* (Apidae: Xylocopini) en el área urbana

Ecological resources used by *Xylocopa* species (Apidae: Xylocopini) in the urban area

TALLES MARQUES CHAVES-ALVES¹, CAMILA NONATO JUNQUEIRA², LAÍCE SOUZA RABELO³, PAULO EUGÊNIO ALVES MACEDO DE OLIVEIRA⁴ y SOLANGE CRISTINA AUGUSTO⁵

Resumen: Las áreas verdes de las ciudades, como parques ecológicos, plazas, la forestación de carreteras y incluso jardines domésticos, además de componer el paisaje urbano, también ofrecen recursos para la alimentación y nidificación de muchas especies de abejas, como las del género *Xylocopa*. En este sentido, el presente estudio tuvo como objetivos identificar los sustratos naturales de nidificación y la disponibilidad de los recursos alimenticios utilizados por *Xylocopa* spp. en una área urbana, con el fin de verificar el potencial de manejo de estas abejas. Además, se observó el porcentaje de ocupación de estas abejas en sustratos utilizados como nidos-trampas. Tres especies de plantas se utilizaron como sustratos, por las abejas *Xylocopa*, para construir sus nidos: *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae), *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) y *Ficus* sp. (Moraceae). Los nidos se distribuyeron en agregado. *Spathodea campanulata*, *Ficus* sp. y tallos de bambú (nidos-trampas) fueron los sustratos de nidificación más eficientes para *Xylocopa* spp. y por consiguiente, son adecuados para la conservación y manejo de estas abejas. Las flores de las pocas especies de árboles visitadas por *Xylocopa* en el área urbana pertenecen a grupos asociados a menudo con las abejas y las fuentes de recursos alimenticios se mostraron diferentes de las especies utilizadas para la nidificación. Las áreas urbanas en condiciones adecuadas, como cuando hay sustratos adecuados para nidificación y recursos alimenticios, pueden servir como sitio de estudio, conservación y manejo de las abejas carpinteras.

Palabras clave: Preferencias de Anidación. *Spathodea campanulata*. Abejas carpinteras.

Abstract: Green areas of cities such as ecological parks, squares, road forestation and even domestic gardens, besides being part of the urban landscape, also serve as ecological resources for many bee species, as those belonging to *Xylocopa* genus. In this sense, the present study aimed to identify the natural nesting substrates and food resources available for *Xylocopa* spp. in order to verify the management potential of these bees in an urban area. Additionally, we observed the percentage of occupancy for these bees on previously available substrates (trap-nests). Three plants were used as nesting substrates: *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae), *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) and *Ficus* sp. (Moraceae). The nests presented an aggregated distribution. *Spathodea campanulata*, *Ficus* sp. and bamboo canes (trap-nests) were considered efficient substrates for *Xylocopa* spp. nesting and, for this reason, they can be used in management and conservation of these bees. The flowers of the few trees species visited by *Xylocopa* in urban areas belong to groups often associated with bees and the food sources were different from those species used for nesting. The urban environment under appropriate conditions, when appropriate nest substrates and food sources are presented, can serve as a place for study, conservation and management of carpenter bees.

Key words: Nesting Preferences. *Spathodea campanulata*. Carpenter bees.

Introducción

Las áreas verdes de las ciudades, como parques ecológicos, plazas, la forestación de carreteras y incluso jardines domésticos, además de componer el paisaje urbano, también ofrecen recursos para la alimentación y nidificación de muchas especies de abejas (Antonini y Martins 2003; Zanette *et al.* 2005; Gastón *et al.* 2005). La vegetación de estas zonas se compone generalmente de especies exóticas, no obstante, estas pueden presentar estrechas asociaciones ecológicas con las abejas nativas. Dos ejemplos son las especies exóticas *Schefflera arboricola* (Hayata) Merr. y *Tecoma stans* (L.) Kunth, ampliamente utilizadas en el paisajismo urbano brasileño, que proporcionan recursos alimenticios

para especies de abejas nativas (Menezes *et al.* 2007; Silva *et al.* 2007).

En las abejas del género *Xylocopa* se congregan más de 730 especies, con mayor diversidad en los trópicos y subtrópicos (Gerling *et al.* 1989). En Brasil se describen 50 especies (Hurd 1978) y la mayoría de estas construye sus nidos excavando por el tejido seco de la planta, sin grietas ni fisuras, como los árboles o troncos muertos, tallos de inflorescencias, tallos huecos y tallos de bambú (Hurd 1978; Camillo y Garófalo 1982; Freitas y Oliveira-Filho 2001).

Las especies de *Xylocopa* son abejas robustas y de comportamiento generalista a respecto de la colecta de los recursos alimenticios (Gerling *et al.* 1989; Camillo 2003). Estas abejas son directamente responsables por la reproducción de

¹ Máster. Universidade Federal de Uberlândia - Rua Ceará, S/N - Umuarama CEP: 38402-018 - Uberlândia, MG - Brasil. biochaves_ufrj@hotmail.com.

² Estudiante de Master en Ecología y Conservación de Recursos Naturales de la Universidad Federal de Uberlândia. Bióloga. Laboratório de Ecologia e Comportamento de Abelhas (LECA) - Universidade Federal de Uberlândia - Rua Ceará, S/N - Umuarama CEP: 38402-018 - Uberlândia, MG - Brasil. Correo electrónico: camilanj@hotmail.com. Autora para correspondencia. ³ Estudiante de Master en Ecología y Conservación de Recursos Naturales de la Universidad Federal de Uberlândia. Bióloga. Laboratório de Ecologia e Comportamento de Abelhas (LECA) - Universidade Federal de Uberlândia - Rua Ceará, S/N - Umuarama CEP: 38402-018 - Uberlândia, MG - Brasil. laicesr@gmail.com. ⁴ Ph. D. Profesor Asociado III Instituto de Biología - UFU. Laboratório de Morfologia Vegetal e Imagens (LAMOVI) - Universidade Federal de Uberlândia - Rua Ceará, S/N - Umuarama CEP: 38402-018 - Uberlândia, MG - Brasil. poliveira@ufu.br. ⁵ Ph. D. Profesora Asociada I Instituto de Biología - UFU. Laboratório de Ecologia e Comportamento de Abelhas (LECA) - Universidade Federal de Uberlândia - Rua Ceará, S/N - Umuarama CEP: 38402-018 - Uberlândia, MG - Brasil. scaugusto@umuarama.ufu.br.

muchas especies de la flora nativa y de cultivos tropicales de alto valor económico añadido como el maracuyá amarillo (Oliveira y Sazima 1990; Oliveira y Gibbs 2000; Camillo 2003). Observaciones sobre las especies de plantas nativas y exóticas en el entorno urbano sugieren que las especies de *Xylocopa* también utilizan estas plantas como fuentes de recursos de nidificación y alimentación (Díaz y Sánchez 1998), siendo que las especies adecuadas para nidificación son las que tienen ramas o troncos secos y presentan textura porosa, lo que favorece la excavación (Camillo y Garófalo 1982).

La identificación de las especies vegetales utilizadas por *Xylocopa* spp., para nidificar y para la obtención de recursos alimenticios, proporciona subvenciones para el manejo y la preservación de estas abejas, que es importante para el aumento de los servicios de polinización en áreas naturales y cultivadas. Por eso, hay una gran necesidad de estudios que proporcionen la creación artificial de las abejas solitarias con el objetivo de manejar la densidad de la población en cultivos de maracuyá amarillo, que dependen de estas abejas para la polinización cruzada y para la formación de frutos (Akamine y Girolami 1959; Bruckner *et al.* 1995). La disponibilidad de sustratos de nidificación puede aumentar la tasa de nidificación y favorecer el aumento en el número de individuos en una población de *Xylocopa* spp.. Algunos estudios con abejas carpinteras que nidifican en nidos-trampa se llevaron a cabo con éxito (Camillo 2003; Chaves-Alves y Augusto 2005) y hay ejemplos de nidos-trampa construidos con vigas de madera seca con la perforación de arranque, tallos secos de bambú simulando una galería pre-existente (Camillo 2003) y cajas racionales de madera que facilitan observaciones del comportamiento de *Xylocopa* (Freitas y Oliveira-Filho 2001; Oliveira-Filho y Freitas 2003).

En este sentido, el presente estudio tuvo como objetivos identificar los sustratos naturales de nidificación y la disponibilidad de los recursos alimenticios utilizados por *Xylocopa* spp. en una área urbana, con el fin de verificar el potencial de manejo de estas abejas. Además, se observó el porcentaje de ocupación de estas abejas en sustratos utilizados como nidos-trampas.

Materiales y Métodos

Área de estudio. El estudio se realizó en el campus Umarama de la Universidad Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG (18°53'01"S 48°15'48"W). El campus está situado en la región de mayor altitud de la ciudad y presenta clima característico del Cerrado con verano caliente y lluvioso e invierno frío y seco. El área aproximada del campus es de 27 hectáreas y se dividió en 25 parcelas de 90 m x 120 m que corresponden a las 25 manzanas de construcción y sus aceras de tamaño equivalente.

En el área de estudio predominan árboles en las aceras y en las áreas verdes del campus. Estos árboles son representados por especies nativas y exóticas, siendo las especies nativas más numerosas. Se identificaron todos los individuos de todas las especies de árboles en el campus (aproximadamente 1000 individuos y 21 especies) en una inspección para el reconocimiento de lo que podría constituir un sustrato potencial (especies con ramas muertas y textura adecuada para la nidificación) para nidos de *Xylocopa* spp..

Sustratos de nidificación. Después de la identificación de las especies potencialmente utilizables para la nidificación,

se hicieron inspecciones más detalladas para detectar nidos de *Xylocopa*. Se marcaron todos los árboles que presentaban nidos y se realizaron observaciones directas en cada uno de ellos para verificar la actividad de los mismos (si las hembras estaban excavando el sustrato, colectando recursos alimenticios o si había celdas de cría), se examinaron los nidos internamente con la ayuda de un auriscope médico. Esas inspecciones se hicieron en cuatro levantamientos, realizados a cada tres meses durante un año, en el período de enero a noviembre de 2005. Se consideraron como inactivos los nidos que no tenían hembras adultas o celdas de cría.

Recursos alimenticios. En relación con las fuentes de recursos alimenticios utilizadas se realizaron inspecciones mensuales por el campus a fin de verificar la disponibilidad de estos recursos para *Xylocopa*. La disponibilidad de los recursos se evaluó, de enero a noviembre de 2005, período en que se registraron las especies vegetales visitadas por las abejas para la colecta de polen y néctar y la disponibilidad mensuales de estos recursos. Se realizaron observaciones por 30 min en tres individuos en floración de cada especie, elegidos al riesgo. Las observaciones se hicieron en los intervalos de 9 h a 12 h y de 14 h a 16 h y tenían como objetivo verificar si las especies en floración actuaron como una fuente de polen o néctar, por medio del comportamiento exhibido por las abejas.

Nidificaciones en los nidos trampas. Las ramas secas, troncos de la especie de planta leñosa que contenía un mayor número de nidos naturales de *Xylocopa* spp. y tallos de bambú se pusieron a disposición como nidos-trampa en un rancho construido en un área verde del campus de la Universidad para la actividad de las abejas. Los sustratos de madera presentaban circunferencias que varían desde 30 a 50 cm y se ataron con alambre plano a los puestos de apoyo en el rancho. Se incluyeron 56 tallos de bambú cuya longitud varió entre 22 cm y 25 cm y el diámetro entre 1,01 cm y 2,40 cm, en siete ladrillos con ocho orificios. Mediante inspección quincenal de los sustratos con la ayuda de un auriscopio médico se obtuvieron el porcentaje y la tasa de ocupación (números de nidos fundados por mes) por las especies de *Xylocopa*.

Análisis estadísticos. Para identificar el patrón de distribución espacial de los nidos y de las especies vegetales estudiadas se utilizó la relación Variación/Media (R); valores menores que 1,0 indican la ausencia del agrupamiento, igual a 1,0 indican una distribución regular y valores mayores que 1,0 indican agrupamiento. Se estimó la densidad de los nidos encontrados por el método de cuadrados. El análisis de variación de los datos se realizó para determinar el patrón de distribución interna de los nidos de *Xylocopa* spp. en el campus (Brower y Zar 1984). Los valores promedios presentados son seguidos por los valores de las desviaciones estándar. La ocupación del sustrato por las abejas se calculó por medio de la cantidad de nidos por individuo de cada especie de planta. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre el número de nidos en los tallos de bambú y en los troncos considerando las tres especies juntas y cada una en separado.

Resultados

Nidificación en los árboles y distribución espacial de nidos. La presencia de nidos de *Xylocopa* spp. ocurrió en sólo

tres especies de árboles (14% de todas las especies vegetales presentes en el área), *Spathodea campanulata* P. Beau (Bignoniaceae), *Ligustrum lucidum* W.T.Aiton., (Oleaceae) y *Ficus* sp. (Moraceae). Se registraron 118 individuos de *S. campanulata* (4,37 individuos/ha) y 51 individuos de *L. lucidum* (1,88 individuos/ha). Los individuos de ambas especies poseían ramas o troncos secos que permiten la nidificación de las abejas del género *Xylocopa*. De los 41 individuos de *Ficus* sp. observados, 27 (1 individuo/ha) contenían sustrato disponible para la nidificación.

Se encontró mayor cantidad de nidos activos o inactivos y mayor porcentaje de nidos por sustrato en *S. campanulata* comparado con las otras especies (Tabla 1). La mayoría de los nidos se encontraron en las ramas por debajo de los cuatro metros de altura (88,34%) y que tenían una circunferencia entre 15 cm y 90 cm ($n=18$; $x=38\pm24,38$ cm). De los 42 nidos activos, 11 eran de *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *grisescens* Lepelletier, 1841 (26,19%) y 31 de *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *suspecta* Moure e Camargo, 1988 (73,81%).

Los nidos se distribuyeron de manera agregada ($x = 3,8\pm5,69$ nidos por parcela; $R=8,51$), de la misma forma que las plantas utilizadas para la nidificación, *S. campanulata* ($x=4,72\pm9,39$; $R=18,69$), *L. lucidum* ($x = 2,04 \pm 5,13$; $R=12,89$) y *Ficus* sp. ($x = 1,08\pm5,0$; $R=23,14$).

Recursos alimenticios. Se identificaron seis especies de plantas leñosas (29% de todas las especies vegetales presentes en el área) que actuaron como fuentes de polen y néctar para las tres especies de *Xylocopa* (Fig. 1). *Caesalpinia pelthophoroides* Benth. (Leguminosae), *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn. (Leguminosae) se consideraron fuentes de polen y *Tecoma stans* (L.) Kunth (Bignoniaceae), *Thunbergia grandiflora* Roxb. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger (Passifloraceae) y *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) se consideraron fuentes de néctar. Se observó una superposición en el periodo de floración de las especies que sirven como recursos alimenticios, con un máximo de dos fuentes de polen y tres fuentes de néctar por temporada (Fig. 1).

Nidificación en los nidos-trampa. En un periodo de 18 meses se fundaron 36 nidos con predominio de nidos fundados en madera ($n=21$; 58,33%) con respecto de nidos-trampa de tallos de bambú ($n=15$; 41,67%) aunque no hubo diferencias significativas en el número de nidos entre los dos sustratos ($U_{0,05(2)18,18}=155$; $p>0,05$).

Xylocopa suspecta fue la especie que más utilizó los sustratos contenidos en el rancho con 61,11%, seguido por *X. grisescens* con 25% y finalmente *Xylocopa* (*Neoxylocopa*)

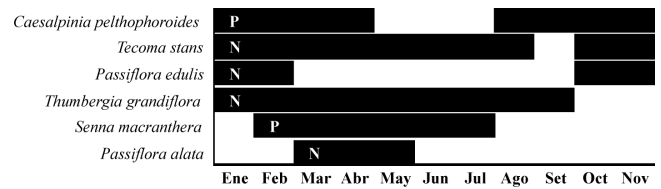


Figura 1. Periodo de floración de las especies de plantas fuente de recursos alimenticios utilizados por las tres especies de *Xylocopa*, en el medio urbano, Uberlândia-MG, Brasil (P = polen y N = néctar).

frontalis (Olivier, 1789) (Hymenoptera: Apidae) con 13,89% (Tabla 2). Se observó diferencia significativa entre el número de nidos en los tallos de bambú y en los troncos para *X. grisescens* ($U_{0,05(2)18,18}=255$; $p<0,05$), pero no para *X. suspecta* ($U_{0,05(2)18,18}=139$; $p>0,05$) y para *X. frontalis* ($U_{0,05(2)18,18}=135$; $p>0,05$).

De enero a agosto de 2005, sólo se registraron fundaciones y en agosto comenzaron a ocurrir el encerramiento o reutilización de algunos nidos. Así mismo, durante este tiempo el número de nidos activos se estabilizó (Fig. 2). Los picos de la fundación se ocurrieron en los meses enero a abril 2005 y diciembre de 2005 a marzo de 2006.

Discusión

A pesar de la existencia de varias especies de árboles en la área de estudio, las cuales se encuentran comúnmente en el paisaje urbano, sólo *S. campanulata*, *L. lucidum* y *Ficus* sp. fueron utilizadas por especies de *Xylocopa* para la nidificación. *Spathodea campanulata*, conocida popularmente como Tulipán Africano es originaria de la costa occidental del África (Francis 1990) y es ampliamente utilizada en el paisajismo urbano. Son grandes árboles, 15m a 20m de altura y corteza fina. *Ligustrum lucidum* es también una especie introducida del Asia Oriental y es muy utilizada en el paisajismo de la ciudad de Uberlândia (Miller 1998). El género *Ficus* incluye

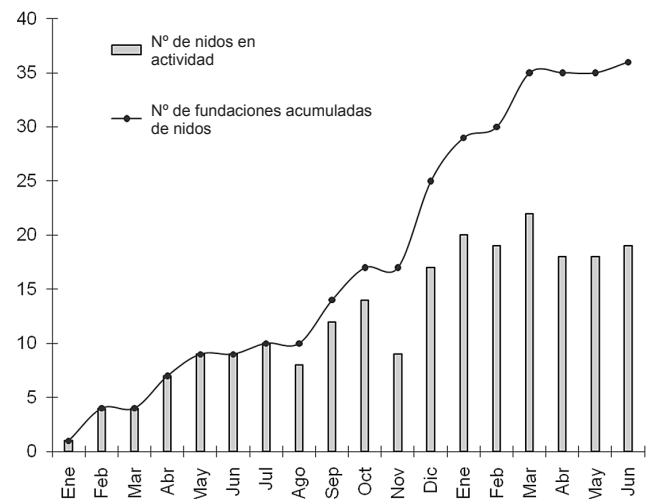


Figura 2. Número de nidos de *Xylocopa* en actividad y fundaciones de nidos acumuladas de enero de 2005 hasta junio de 2006, en el rancho para la cría de las abejas construido en un área urbana de Uberlândia-MG, Brasil.

Tabla 1. Número total de árboles por especímenes de planta, número de árboles con nidos de *Xylocopa* spp. y el número total de nidos y el número de nidos por especie de árbol, en el medio urbano, Uberlândia-MG, Brasil.

Especies de árboles	Total de árboles	Nº total nidos (CA/SA)*	Nº de nidos por árbol
<i>Spathodea campanulata</i>	118	61 (27/34)	0,52
<i>Ligustrum lucidum</i>	51	18 (8/10)	0,35
<i>Ficus</i> sp.	41	19 (7/12)	0,46
Total	210	98 (42/56)	0,47

*CA= con actividad, SA= sin actividad.

Tabla 2. Número total y porcentaje de nidos *Xylocopa* spp. fundados en los tallos de bambú y troncos de madera, en el medio urbano, Uberlândia-MG, Brasil. Letras diferentes significan una diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de sustratos utilizados para la nidificación.

Especies de abejas	Tallos de bambú	Troncos de madera	Total
<i>Xylocopa suspecta</i>	6 (27%) ^a	16 (73%) ^a	22 (61,11%)
<i>Xylocopa grisescens</i>	9 (100%) ^a	0 ^b	9 (25%)
<i>Xylocopa frontalis</i>	0 ^a	5 (100%) ^a	5 (13,89%)
Total	15 (41,67%) ^a	21 (58,33%) ^a	36 (100%)

un gran número de plantas ornamentales y árboles de jardín, como *Ficus elastica* Roxb., *Ficus religiosa* Linn. y *Ficus microcarpa* L. (Mubo *et al.* 2004).

La evaluación del número de nidos por sustrato mostró que había una ocupación más alta en *S. campanulata* y *Ficus* sp.. Este éxito corrobora los resultados obtenidos en Cuba, por Díaz y Sánchez (1998), en que entre muchas especies listadas como sustratos para la nidificación, también en área urbana, aquellas de las familias Moraceae y Bignoniaceae fueron las más importantes. Aunque el análisis de la textura no se ha hecho, el sustrato de *S. campanulata* y *Ficus* sp., al parecer, tienen textura menos tierna que el de *L. lucidum*, y por lo tanto son más fáciles de excavar. Además de la textura adecuada, una mayor disponibilidad de ejemplares de *S. campanulata* puede tener como resultado una mayor incidencia de los nidos en esta especie cuando se compara con *Ficus* sp. La gran diversidad de los sustratos utilizados por *Xylocopa* spp., listada en algunos estudios (Camillo y Garófalo 1982; Camillo *et al.* 1986; Díaz y Sánchez 1998; Viana *et al.* 2002; Camillo 2003), indica que la mayoría de esas abejas son generalistas con respecto a la elección de especies vegetales, desde que el sustrato posea textura y diámetro adecuados y estén disponibles en el medio; solo algunas especies son la excepción como *Xylocopa* (*Monoxylocopa*) *abbreviata* Hurd & Moure, 1963 que presenta una estrecha asociación con las ramas de *Encholirium spectabile* Martius ex Schultess (Bromeliaceae) (Ramalho *et al.* 2004). Otra evidencia que apoya la idea del comportamiento generalista en relación con la elección de los sitios de nidificación es que el género *Xylocopa*, desde su origen, estaba distribuido en prácticamente todo el mundo (Hurd 1978).

La distribución espacial agregada de los nidos con actividad ocurrió tanto debido a distribución de las especies vegetales utilizadas para la nidificación como también porque un solo árbol puede abrigar más de un nido, debido el comportamiento de filopatría informado para especies de *Xylocopa* (Camillo y Garófalo 1989) en el que las hembras tienden a nidificar en las áreas más cercanas al nido materno.

Las fuentes de recurso alimenticios para las abejas en el área urbana son diferentes de las especies utilizadas para la nidificación. No se puede atribuir a la casualidad la asociación de *Xylocopa* spp. con estas fuentes florales de los recursos alimenticios, una vez que son plantas que pertenecen a familias de plantas a menudo asociadas con *Xylocopa* spp. y otras abejas grandes (Frankie *et al.* 1983; Endress 1996). Los dos tipos de nidos-trampa fueron favorables para atracción y nidificación de *Xylocopa* spp. Considerando que, en general, no hubo diferencia significativa cuanto al uso de los

dos tipos de nidos-trampa, los tallos bambú, por su practicidad y facilidad de manipulación y transporte, pueden ser más eficientemente utilizados en medidas de manejo destinadas a incrementar las poblaciones en áreas naturales y agrícolas.

Los picos de fundación en los nidos-trampa disponibles en el rancho entomológico se dieron en los meses lluviosos como ya había sido observado por Camillo y Garófalo (1982). Se observó una tendencia a la estabilización en el número de nuevos nidos en el segundo año de estudio. La estabilización se relaciona con la reutilización de algunos de los nidos-trampa y, probablemente, con el comportamiento filopátrico exhibido por las hembras (Camillo y Garófalo 1989).

Aunque no se puede evaluar la estabilidad de las poblaciones de abejas que viven en áreas alteradas, tales como el ambiente urbano, este estudio ha demostrado que algunas especies de *Xylocopa* nidifican con éxito en sustratos utilizados en el paisajismo urbano, generalmente, especies de plantas exóticas. Además, el medio urbano es favorable para realizar y mejorar experimentos para la atracción de los nidos. Así sitios urbanos como el estudiado pueden servir como áreas de estudio e incremento de poblaciones de abejas *Xylocopa*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (PROBIO), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) y Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por el apoyo financiero y a los jurados por la revisión completa del artículo.

Literatura citada

- AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, G. 1959. Problems in fruit set in yellow passion fruit. *Farm Science* 14(2): 3-4.
- ANTONINI, Y.; MARTINS, R. P. 2003. The flowering-visiting bees at the Ecological Station of the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. *Neotropical Entomology* 32 (4): 565-575.
- BROWER, J. E.; ZAR, J. H. 1984. *Field & laboratory methods for general ecology*. 2ªed. EUA: Wm. C. Brown Publishers. 226 p.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZZI, A.J.; SILVA, E. A. M. 1995. Self-compatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Horticulturae* 370: 45-57.
- CAMILLO, E. 2003. *Polinização do Maracujá*. Ribeirão Preto-SP: Holos Editora. 44 p.
- CAMILLO, E.; GARÓFALO, C. A. 1989. Social organization in reactivated nests of three species of *Xylocopa* (Hymenoptera, Anthophoridae) in southeastern Brazil. *Insectes Sociaux* 36: 92-105.
- CAMILLO, E.; GARÓFALO, C. A.; MUCCILLO, G. 1986. On the bionomics of *Xylocopa suspecta* (Moure) in southern Brazil: nest construction and biological cycle (Hymenoptera: Anthophoridae). *Revista Brasileira de Biologia* 46: 383-393.
- CAMILLO, E.; GARÓFALO, C. A. 1982. On the bionomics of *Xylocopa frontalis* (Olivier) and *Xylocopa grisescens* (Lepeletier) in southern Brazil: nest construction and biological cycle. *Revista Brasileira de Biologia* 42 (3): 571-582.
- CHAVES-ALVES, T. M.; AUGUSTO, S. C. Recursos ecológicos utilizados por *Xylocopa* spp. em área Urbana, Uberlândia, MG, Brasil. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, VII Anais do VII., 2005, Caxambu-MG. Anais do Congresso de Ecologia do Brasil, VII, Caxambu-MG: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2005.

- DÍAZ, A. L.; SÁNCHEZ, U. S. 1998. Feeding and nesting plants of *Xylocopa cubaecola* (Hymenoptera: Apidae). Caribbean Journal of Science 34 (1-2): 152-155.
- ENDRESS, P. K. 1996. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, Cambridge University. 511 p.
- FRANCIS, J. K. 1990. African tulip tree (*Spathodea campanulata* Beauv.). Res. Note SO-ITF-SM-32. New Orleans: USDA Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 5 p.
- FRANKIE, G. W.; HABER, W. W.; OPLER, P. A.; BAWA, K. S. 1983. Characteristics and organization of the large bee pollination system in the Costa Rica dry forest. In Handbook of experimental pollination biology (C. E. Jones; R. J. Little, eds.). Scientific and Academic Editions, New York.
- FREITAS, B. M.; OLIVEIRA-FILHO J. H. 2001. Criação racional de mamangavas para polinização em áreas agrícolas. Fortaleza: Banco do Nordeste. 96 p.
- GASTÓN, K. J.; WARREN, P. H.; THOMPSSON, K.; SMITH, R. M. 2005. Urban domestic gardens (IV): the extent of resource and its associated features. Biodiversity and Conservation. 14: 3327-3349.
- GERLING, D.; VELTHUIS, H. H. W.; HEFETZ, A. 1989. Bionomics of the large carpenter bees of the genus *Xylocopa*. Annual Review of Entomology 34: 163-190.
- HURD, P. D. 1978. An annotated catalog of the carpenter bees (genus *Xylocopa* Latreille) of the western hemisphere (Hymenoptera, Anthophoridae). Washington D.C.: Smithsonian Institution. 106 p.
- MENEZES, C.; SILVA, C. I.; SINGER, R. B.; KERR, W. E. 2007. Competição entre abelhas durante forrageamento em *Schefflera arboricola* (Hayata) Merr. Bioscience Journal 23 (1): 63-69.
- MILLER, J. H. 1998. Exotic invasive plants in southeastern forests. Nashville: Tennessee Exotic Pest Plant Council 2: 97-106.
- MUBO, A. S.; ADENIVI, A.; ADEYEMI, E. 2004. A morphometric analysis of the genus *Ficus* Linn. (Moraceae). African Journal of Biotechnology 3 (4): 229-235.
- OLIVEIRA-FILHO, J. H.; FREITAS, B. M. 2003. Colonização e biologia reprodutiva de mamangavas (*Xylocopa frontalis*) em um modelo de ninho racional. Ciência Rural 33 (4): 693-697.
- OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E. 2000. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community Central Brazil. Flora 95: 311-329.
- OLIVEIRA, P. E.; SAZIMA, M. 1990. Pollination biology of two species of *Kielmeyera* (Gutiferae) from Brazilian cerrado vegetation. Plant Systematics and Evolution 172: 35-49.
- RAMALHO, M.; BATISTA, M. A.; SILVA, M. 2004. *Xylocopa* (*Monoxylocopa*) *abbreviata* Hurd & Moure (Hymenoptera: Apidae) e *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): uma associação estreita no semi-árido do Brasil tropical. Neotropical Entomology 33 (4): 417-425.
- SILVA, C. I.; AUGUSTO, S. C.; SOFIA, S. H.; MOSCHETA, I. S. 2007. Diversidade de abelhas em *Tecoma stans* (L.) Kunth (Bignoniaceae): Importância na Polinização e Produção de Frutos. Neotropical Entomology 36: 331-340.
- VIANA, B. F.; KLEINERT, A. M. P.; SILVA, F. O. 2002. Ecologia de *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *cearensis* (Hymenoptera, Anthophoridae) nas dunas litorâneas de Abaeté, Salvador, Bahia. Iheringia, Série Zoológica 92 (4): 47-57.
- ZANETTE, L. R. S.; MARTINS, R. P.; RIBEIRO, S. P. 2005. Effects of urbanization on neotropical wasp and bee assemblages in a Brazilian metropolis. Landscape and Urban Planning 71: 105-121.

Recibido: 23-dic-2010 • Aceptado: 25-jun-2011

Variación genética de poblaciones de *Drosophila mercatorum* (Diptera: Drosophilidae) en ecosistemas semiáridos

Genetic variation in isolated populations of *Drosophila mercatorum* (Diptera: Drosophilidae) in semi-arid ecosystems

ANA PATRICIA ESTRADA F.¹ y RODRIGO PRIETO S.²

Resumen: Las variaciones en los genitales externos e internos pueden constituirse en barreras precigóticas que impiden el apareamiento y por ende contribuyen a la divergencia entre poblaciones de una especie, posibilitando el surgimiento de nuevas especies. Para el estudio de los procesos evolutivos involucrados en la diferenciación de la morfología de los genitales, se tuvieron en cuenta caracteres sexuales como el apareamiento realizando cruces interpopulacionales y análisis morfométricos de los genitales externos e internos de dos poblaciones de *Drosophila mercatorum* y sus híbridos colectadas en el Desierto de la Tatacoa (Huila) y el Valle del Patía (Nariño) teniendo en cuenta que estos caracteres son taxonómicamente importantes incluso a nivel de subespecies y razas. A fin de comparar la variabilidad interpopulacional en características no sexuales y obtener sus correlaciones, se realizó el análisis morfométrico del ala y la mancha abdominal, usando al igual que en el caso del aedeagus, 28 individuos por población para la morfometría geométrica y 20 para la tradicional. Se obtuvo menor variabilidad en estas estructuras y correlaciones positivas para el tamaño del ala y el aedeagus. El número de cerdas en el clasper, la forma del ala y la mancha abdominal no presentaron diferencias significativas entre las poblaciones, sin embargo, la disminución en la descendencia en cruces interpopulacionales y retrocruzas y la variación morfológica en el aedeagus, permiten diferenciarlas como razas geográficas.

Palabras clave: Morfometría. Genitales. Aislamiento reproductivo. Especiación.

Abstract: Variations in external and internal genitalia could constitute into pre-zygote barriers that prevent mating, contributing to the divergence between populations of species and allowing the emergence of new species. Sexual characteristics like mating, were taken into account to study the evolutionary processes involved in the morphology differentiation of the genitalia, for this purpose, there were conducted interpopulation crossings and morphometric analysis of external and internal genitalia of two populations of *Drosophila mercatorum* and its respective hybrids, collected in the Tatacoa Desert (Huila) and the Patía valley (Nariño), considering that these are important taxonomic characters, even to the level of subspecies and races. Morphometric analysis of non-sexual related characteristic such as wings and abdominal stains were performed to compare the variability between populations, as well as to obtain their correlations, by using 28 individuals per population for geometric morphometrics and 20 for the traditional one, as in the case of the aedeagus. Less variability in these structures and a positive correlation for the wing size and the aedeagus were found. The number of sows in the clasp, the shape of the wing and abdominal stains did not show significant differences between populations; however, the decrease in the offspring produced through the inter-population crossings and back-crossings, and the morphological variation in the aedeagus, allow differentiating them as geographic races.

Key words: Morphometry. Genitalia. Reproductive isolation. Speciation.

Introducción

La divergencia entre las poblaciones hasta la formación de especies es gradual, sin marcarse un momento exacto en que se pueda decir que ambas poblaciones son ya dos especies, dándose situaciones intermedias de divergencia sin embargo, esto puede resolverse porque en organismos con fertilización interna, la divergencia en la morfología genital masculina es un carácter taxonómico aceptado para distinguir entre especies e incluso razas dada su rápida divergencia y especificidad para impedir cópulas improductivas (Arnqvist 1998; King 2003). La evolución genital ha fascinado a los biólogos por más de 150 años y se ha usado para establecer diferencias en el ámbito de estudios intraespecíficos (Arnqvist 1997). Una alternativa utilizada para su estudio es el análisis del aedeagus masculino de las especies, empleando la morfometría geométrica de contorno para monitorear procesos de especiación en marcha, pues es una herramienta que permite entender si las variaciones morfométricas en una investigación son evidencia de divergencia intraespecífica o parte de

la plasticidad fenotípica propia de la población y el ambiente en que se encuentra.

Existen tres hipótesis principales para explicar la diversificación morfológica de los órganos genitales animales, en primer lugar *El aislamiento reproductivo*, afirma que la divergencia genital causa aislamiento mecánico que evita la hibridación como estrategia de aislamiento pre-copulativo, como en el caso de un cerrojo y una llave (Eberhard 1985, Arnqvist 1998). La segunda es la hipótesis de *Pleiotropía*, según la cual, los órganos genitales son selectivamente neutrales y evolucionan por efectos pleiotrópicos a través de la selección en un conjunto de rasgos (Mayr 1963), por tanto da cuenta de cambios correlativos que tienen lugar a lo largo de la evolución. Finalmente la *Selección sexual*, propone que son favorecidas las estructuras genitales óptimas que confieren una ventaja reproductiva a los organismos (Eberhard 1985).

Aunque Eberhard (1985) ha desvalorizado la importancia del aislamiento mecánico como factor responsable de la complejidad genital en muchas especies animales, para las especies sinmorficas o gemelas, se ha encontrado que cier-

¹ Bióloga, Universidad de Nariño. Ciudad Universitaria Torobajo Bloque 3 cuarto piso. Tel 7311449. anapatriciaestrada@gmail.com. Autora para correspondencia. ² M Sc. Ciencias Biológicas. Universidad del Tolima (Ibagué), Grupo de Citogenética, Filogenia y Evolución de Poblaciones. Barrio Santa Elena Ibagué Tolima. PBX (098) 2644219. rprietos@ut.edu.co

ta incompatibilidad genital refuerza el aislamiento ecológico, temporal o etológico si este falla. Fernández *et al* (2001) encontraron que *Lycosa tarentula fasciventris* (L., 1758) y *Lycosa* sp. pese a sus diferencias en el cortejo, realizan copulas heteroespecíficas que no generan descendencia fértil, lo que sugiere la existencia de aislamiento postcigótico, pero además se estima una incompatibilidad entre los genitales de machos y hembras debido a que existió diferencia significativa en la duración del inicio de la inserción del pedipalpo después de la monta. Estudios morfológicos en *Lycosa thorelli* (Keyserling, 1877) y *L. carbonelli* Costa & Capocasale, 1984 realizados por Simó *et al* (2002), atribuyen la incompleta inserción del pedipalpo a pequeñas diferencias morfológicas principalmente en el tamaño de los genitales.

Dada la importancia de los rasgos reproductivos como mecanismo de aislamiento asociado a la evolución de las especies, en esta investigación se evaluó la divergencia genital, la correlación entre ésta y otras estructuras y su efecto sobre el aislamiento reproductivo en dos poblaciones de *Drosophila mercatorum* (Patterson y Wheeler, 1942).

Materiales y Métodos

Los especímenes de *Drosophila mercatorum* se recolectaron en dos ecosistemas semiáridos aislados (Fig. 1), el Desierto de la Tatacoa (Huila) y el Valle del Patía (Nariño). Se destaca que además de la distancia mayor a 300km entre los dos sitios, no hay puntos intermedios con posibilidad de albergar especies del grupo *repleta* debido a que están separados por la cordillera de los Andes cuyo ecosistema alto-andino no presenta zonas secas con cactáceas.

La recolección se realizó de 5:00 a 7:00 y de 17:00 a 18:30 en dos puntos alejados para cada zona de muestreo denomi-



Figura 1. Mapa de Colombia y ubicación de las zonas de muestreo.

Tabla 1. Cruces comparados con diferencia estadísticamente significativa en la descendencia según sexo de acuerdo al contraste de múltiple de rangos (HSD de Tukey - α 0,05).

Descendencia Femenina	
Contraste	Diferencias
[A2 x A2] vs. [Estándar P]	*-26,5333
[Estándar Patía] vs. [♂ A1 x ♀ P]	*27,2
[♀ Patía x ♂ Tatacoa] vs. [♂ A1 x ♀ P]	*25,6
Descendencia Masculina	
Contraste	Diferencias
[♀ A1 x ♂ A1] vs. [Estándar P]	*-20,5333
[♀ A1 x ♂ A1] vs. [♀ A1 x ♂ T]	*-19,3333
[♀ A1 x ♂ A1] vs. [♂ A2 x ♀ T]	*-18,6667
[Estándar P] vs. [♂ A1 x ♀ P]	*20,5333
[Estándar P] vs. [♂ A2 x ♀ P]	*19,5333
[♀ A1 x ♂ T] vs. [♂ A1 x ♀ P]	*19,3333
[♀ A1 x ♂ T] vs. [♂ A2 x ♀ P]	*18,3333
[♂ A1 x ♀ P] vs. [♂ A2 x ♀ T]	*-18,6667

* Indica una diferencia significativa.

♂: Macho, ♀: Hembra, P: Patía, T: Tatacoa, A1: Híbridos entre machos de Tatacoa y hembras de Patía, A2: Híbridos del cruce de machos de Patía y hembras de Tatacoa.

nados Remolino 1 (1°39'19,3"N 77°20'53,1"W 735 m.s.n.m) y Remolino 2 (1°39'17,1"N 77°20'47,3"W 732m.s.n.m) en el Valle del Patía y Rosalía (3°14'13,8" N 75°9'52,9"W 560m.s.n.m) y Hoyos (3°13'57"N 75°7'44"W 523m.s.n.m) en el Desierto de la Tatacoa. Las trampas con cebo de fruta madura en descomposición (piña, naranja y banano) se ubicaron en lugares con alta densidad de cactus y abarcando los géneros *Opuntia*, *Pilosocereus* y *Lemairucereus* presentes en las dos zonas de muestreo.

Las moscas se transportaron en frascos de vidrio con tapón de gasa y medio de cultivo modificado del desarrollado por Sans de la Rosa *et al* (1987) al Laboratorio de Entomología de la Universidad de Nariño, donde se identificaron y sexaron según las características morfológicas descritas por Gil en De Polanco (1997) y Wasserman (1982).

Teniendo en cuenta que las hembras de *Drosophila mercatorum* son cripticas respecto a las de *D. paranaensis* se obtuvieron hembras vírgenes de los frascos de colecta y se aislaron durante 5 días para asegurar la ausencia de descendientes, posteriormente se cruzaron con machos de *D. mercatorum* debidamente identificados de acuerdo a sus características externas y posterior al cruce se analizó los genitales internos para confirmar la identificación de parentales y descendientes.

Cruces intra e interpoblacionales: Para asegurar que los individuos son de la especie correspondiente, se trabajó con los descendientes de la tercera generación y se utilizaron hembras vírgenes para todos los cruces estableciendo diez parejas por frasco y cinco replicas de cada tipo de cruce. El cepario se mantuvo a temperatura constante de 25°C y en medio de cultivo modificado del descrito por Sans de la Rosa *et al.*, 1987 manteniendo diez parejas por frasco, las moscas descendientes se transfirieron a un medio de cultivo fresco al emerger de la pupa.

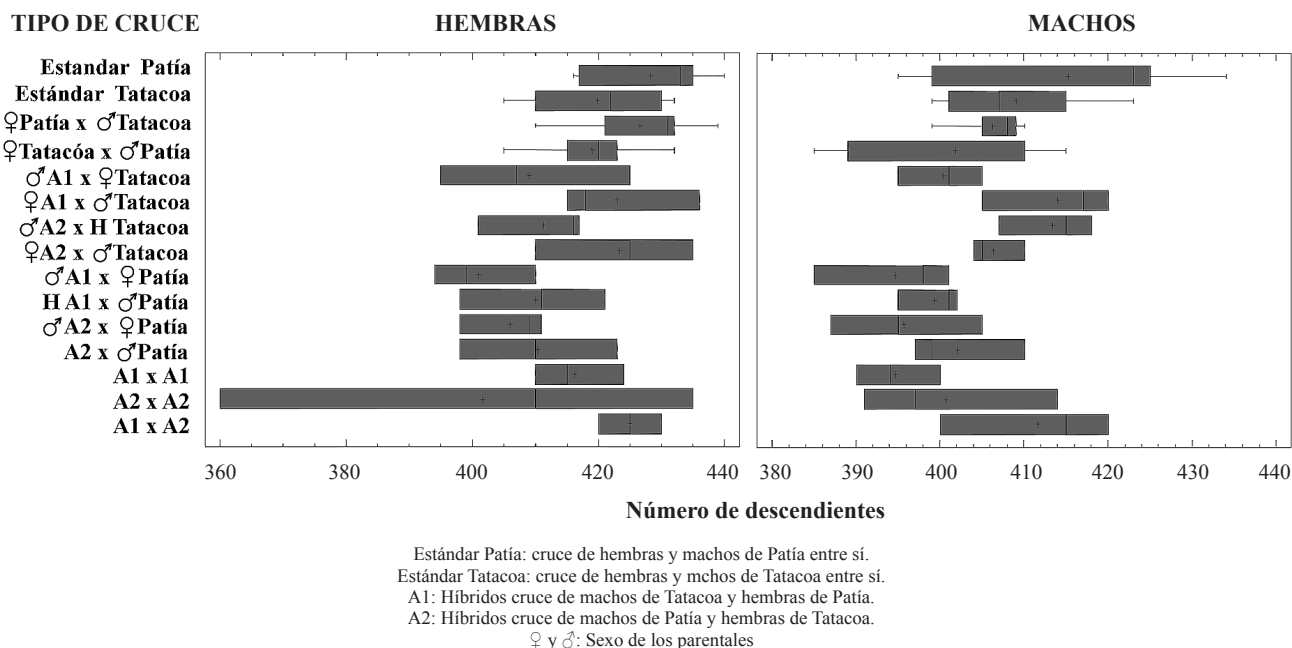


Figura 2. Comparación del número de descendientes obtenidos en los diferentes tipos de cruce realizados con *Drosophila mercatorum* del Desierto de la Tatacoa (Huila) y el Valle del Patía (Nariño).

Se realizaron cruces intrapoblacionales (control) con el fin de establecer un estándar reproductivo de cada población, cruces interpoblacionales para determinar la existencia de aislamiento reproductivo, cruces entre los híbridos y de estos con individuos de cada población (retrocruzas). Se contabilizó la descendencia de todos los cruces y con los datos obtenidos, se realizó contraste de Kruskal Wallis y contraste Múltiple de Rangos (método de Tukey para 95% de confianza) con el software StatGraphics Plus (versión 5.1 copyright 2002).

Variación morfológica: Se utilizaron 60 moscas por sexo y población tomadas al azar de los cruces intrapoblacionales (control) y se sumergieron por tres días en KOH 1N de acuerdo a las modificaciones realizadas por Prieto (2006) al método de Brower (1996a y 1996b), posteriormente se realizó el registro de imágenes de la mancha abdominal en estereoscopio con aumento de 5X y del ala y los claspers en microscopio con aumento de 10X, para la obtención de los genitales internos, se realizó la disección del abdomen y se limpió el *aedeagus* con agujas de disección e inmediatamente, se fotografiaron en microscopio de luz Carl Zeiss con el objetivo de 40X. Todas las fotografías digitales se tomaron con cámara Kodak 603 de 6,1 MP.

Morfometría tradicional: A partir de las fotografías de los claspers (genitales externos) de 20 machos de cada población se realizó el conteo del número de cerdas y se aplicó la prueba U de Mann Whitney usando el software Past (versión 1,38 copyright Hammer y Harper 2005).

Se midió de extremo a extremo el *aedeagus* de 20 machos y el ala derecha de 20 individuos por sexo, desde la base hasta el ápice de la vena M, en el programa MacBiophotonics ImageJ (versión 1,39o, 2008) y los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba U de Mann Withney en el programa Past (versión 1,38).

Morfometría geométrica: Se utilizó la figura del contorno de los genitales internos de 28 machos adultos que se procesó en el paquete TPSserie (versión 1,37) y EFAwin (copyright Rohlf y Ferson) aplicando 5 armónicas. Para el contorno de la mancha y el ala derecha de 20 individuos por sexo y población, se aplicaron 4 armónicas. En el análisis estadístico para el método "Outline" las matrices obtenidas a través de los coeficientes de Fourier, se analizaron utilizando MANOVA-CVA en el programa Past (versión 1,38 copyright Hammer y Harper 2005) y su significancia estadística se estableció mediante el índice de Shapiro Wilk.

Resultados y Discusión

Determinación del aislamiento reproductivo post-cigótico

El contraste de Kruskal Wallis realizado a los datos de descendencia de los cruces intra e interpoblacionales de *Drosophila mercatorum* del Desierto de la Tatacoa y el Valle del Patía, reveló que no se presentan diferencias significativas en el número de descendientes machos ($P=0,141$) ni hembras ($P=0,131$) de acuerdo al tipo de cruce realizado lo que indica que ninguna de las vías de fertilidad, masculina o femenina, ha sido afectada aun a pesar de la acumulación de variabilidad propia de cada población asociada con el aislamiento geográfico y las diferencias que pueden observarse en otras características como la forma del aedeago y la mancha abdominal.

Aunque los resultados del análisis global muestran que ninguno de los cruces interpoblacionales en *D. mercatorum* manifiesta incapacidad reproductiva independientemente de la procedencia del macho o de la hembra, se encontró disminución en el número de descendientes respecto al control principalmente en los cruces entre los híbridos interpoblacionales y estos con parejas de sus poblaciones de origen (retrocruzas), cuyos resultados son estadísticamente significativos (Tabla 1) lo cual probablemente se relaciona con la presión exogámica en las poblaciones y puede ser evidencia

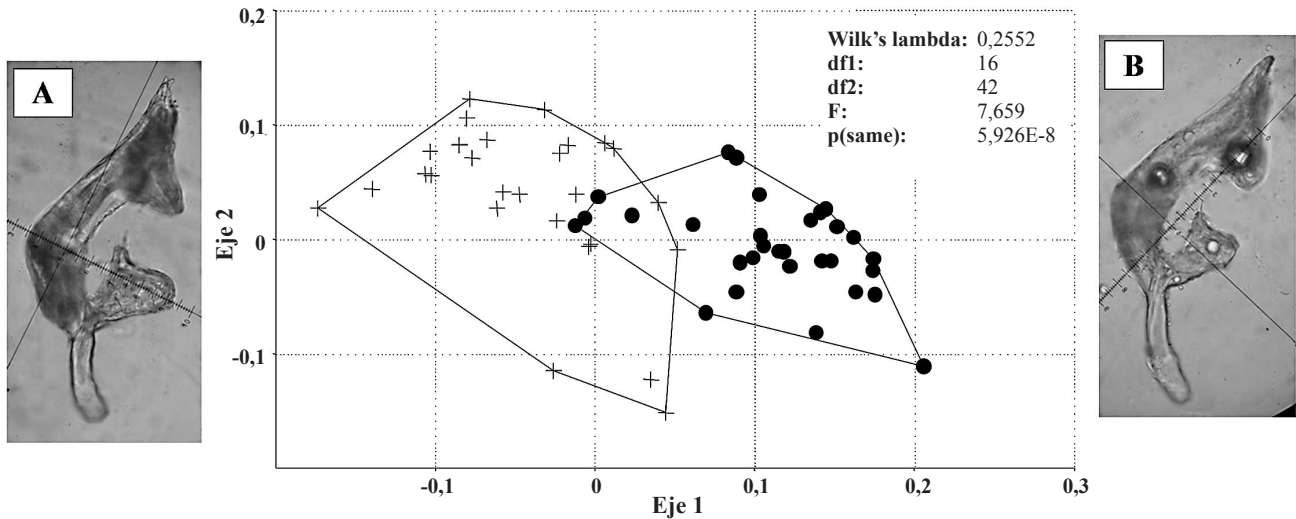


Figura 3. Análisis Morfométrico del Contorno de los Genitales Internos de *Drosophila mercatorum* Desierto de la Tatacoa y Valle del Patía. + A. *D. mercatorum* Tatacoa • B. *D. mercatorum* Patía.

del inicio del aislamiento reproductivo, que de mantenerse y acentuarse, llevaría a un proceso de formación de subespecies o especies (Mayr 1942, Hey *et al.* 2005). Esto concuerda con lo reportado para *D. starmeri* que presenta una reducción en el número de híbridos interpoblacionales provenientes de los cruces entre individuos de Santa Marta (Magdalena) y Tatacoa (Rojas 2001), así como diferencias a nivel precigótico que ocasionan disminución en los híbridos o probabilidades nulas de apareamientos entre individuos de Santa Marta (Magdalena), Camarones (Guajira), Tatacoa (Huila), Los Vados (Norte de Santander) y La Vega (Cundinamarca) (Betancourt 2007).

Dada la disminución en los híbridos interpoblacionales, podría pensarse que la distancia obligada mayor a 300km entre las dos regiones (Valle del Patía y Tatacoa), ha permitido que las poblaciones presenten diferenciación genética que aun no es tan acentuada al no impedir la generación de híbridos fértiles, pero que sí refleja un proceso activo de formación de razas.

Genitales. La prueba U de Mann-Whitney para el análisis interpoblacional no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P=0,8$) en el número de cerdas de los claspers (genitales externos), lo cual indica ausencia de variación y una compatibilidad completa para la sujeción y/o estimulación de la hembra de cualquiera de las poblaciones analizadas. En *D. mercatorum* de Tatacoa se encontró un rango más amplio, de entre 10 y 13 cerdas, lo cual indica la existencia de mayor variación intrapoblacional que en la población del Patía donde se encontró entre 10 y 11 cerdas.

El índice de Shapiro Wilk muestra diferencias significativas ($P<0,001$) para el análisis de la forma de los genitales internos de los machos de las dos poblaciones de *D. mercatorum* (Fig. 3), la variación morfológica de los individuos puede darse como consecuencia de la existencia de un acervo genético particular de cada población por la imposibilidad de flujo causada por el aislamiento geográfico, siendo el inicio de una divergencia evolutiva, pero que al ser gradual, no es aun tan marcada como para impedir la cópula y fertilización, es decir, aun no existe aislamiento precigótico de tipo mecá-

nico que impida la fecundación del óvulo (Futuyma 1998, Rojas 2001).

El hecho de que haya existido descendencia fértil indica que no hay variaciones drásticas en la conducta de las moscas o en la afinidad de los gametos. Ecológicamente, también presentan comportamientos similares en cuanto al hábitat que explotan en ecosistemas semiáridos y el uso de cactus como nicho trófico (Wasserman y Wilson 1957). Aunque no se tomaron datos de cortejo o conductas que evidencien la existencia de preferencia en cuanto a la atracción por machos o hembras de la propia población en *D. mercatorum*, la existencia de descendencia demuestra que independientemente de la población de origen los individuos tienen posibilidad de cruzarse. Buena parte de la evolución de las especies se expresa en cambios morfológicos, por tanto, es posible que la divergencia morfológica de las poblaciones de *D. mercatorum* del Desierto de la Tatacoa y del Valle del Patía se vean reflejados a través de las variaciones en la forma de los genitales internos (aedeagus).

La divergencia evolutiva rápida de la morfología genital masculina representa una de las tendencias más notables en animales con fertilización interna (Arnquist 1998), por esto, los órganos genitales proveen caracteres taxonómicos útiles para distinguir entre organismos en el nivel de especies donde ningún otro rasgo morfológico es válido (Eberhard 1985), sin embargo, la diferencia entre las dos poblaciones indica la posibilidad de un proceso de divergencia morfológica aun no acentuado entre las mismas, por lo que se concluye que se trata de la misma especie, con un grado de variación que no logra el *aislamiento reproductivo*.

En el análisis morfométrico tradicional del tamaño de los genitales internos de *D. mercatorum*, se encontró que los machos del Valle del Patía presentan un aedeagus de mayor tamaño ($0,32\text{mm} \pm 0,005$) que los de Tatacoa ($0,304\text{mm} \pm 0,012$) y pese a que esta diferencia es estadísticamente significativa según la prueba U de Mann-Whitney ($P=0,0014$) se produjo descendencia en todos cruces por lo tanto se asume que existe compatibilidad para la cópula y fertilización.

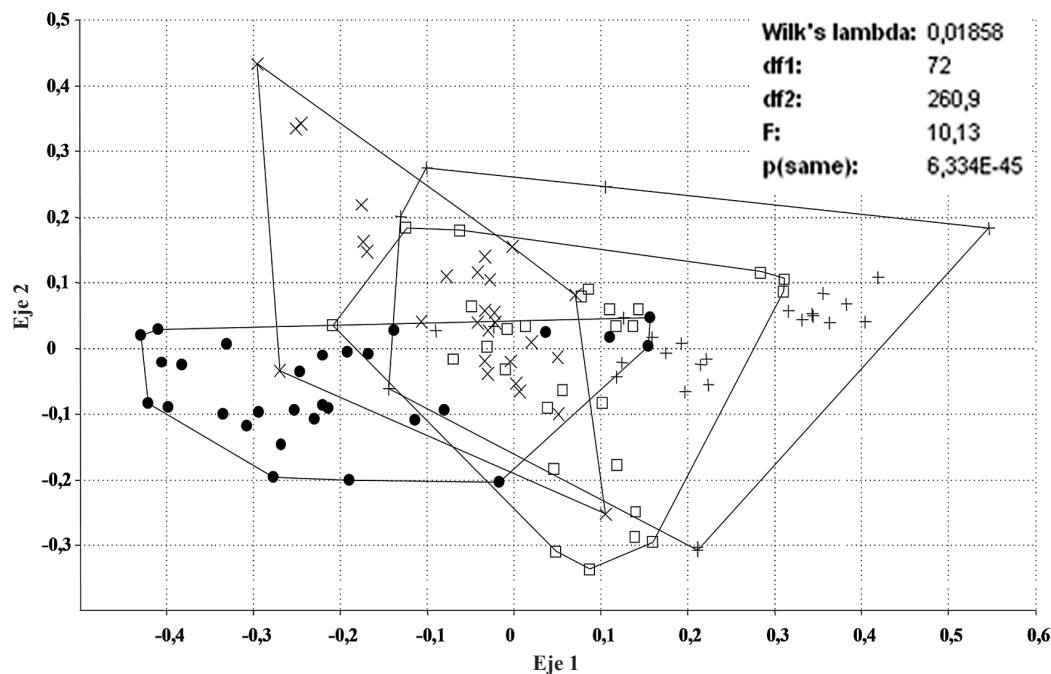


Figura 4. Comparación de la forma del aedeago de las dos poblaciones de *D. mercatorum* y sus híbridos. ● *D. mercatorum* Patía + *D. mercatorum* Tatacoa. □ Híbridos A1 (♀Patía x ♂Tatacoa) x Híbridos A2 (♀Tatacoa x ♂Patía).

Además del análisis morfométrico de los genitales de los individuos de cada población de *D. mercatorum*, se realizó la comparación de la forma de los aedeagos de los híbridos resultantes de las cruza interpoblacionales: A1= hembras (Patía) x machos (Tatacoa) y A2= hembras (Tatacoa) x machos (Patía).

Aunque existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$) en la forma del aedeago de los híbridos y las poblaciones parentales (Fig. 4), se observa que los híbridos A1 presentan una mayor cercanía morfológica con la población de Tatacoa, lo cual es más evidente en la figura 5A donde los individuos híbridos A1 se solapan con los de Tatacoa ($P < 0,001$), mientras que al compararlos con los machos de Patía, no se observa una zona de intersección (Fig. 5B, $P < 0,001$).

En la figura 6A se evidencia la agrupación entre los híbridos A2 con la población de Patía donde a pesar de la diferencia significativa en la comparación ($P < 0,001$), existe una zona de unión, a diferencia de lo observado en la figura 6B donde hay una mayor separación entre los híbridos A2 y la población de Tatacoa ($P < 0,001$).

Se destaca la presencia de algunos puntos extremos en las representaciones gráficas, dado que el método utilizado (elipses de Fourier) permite eliminar el sesgo de tamaño y posición de los contornos, estos datos pueden indicar que la población no es homogénea y presenta polimorfismo, dichos individuos con “fenotipos extremos” pueden desencadenar procesos microevolutivos (Gienapp, *et al* 2008), este comportamiento de los datos es más evidente en los híbridos A1 donde se observa una división equilibrada (11 y 16 individuos).

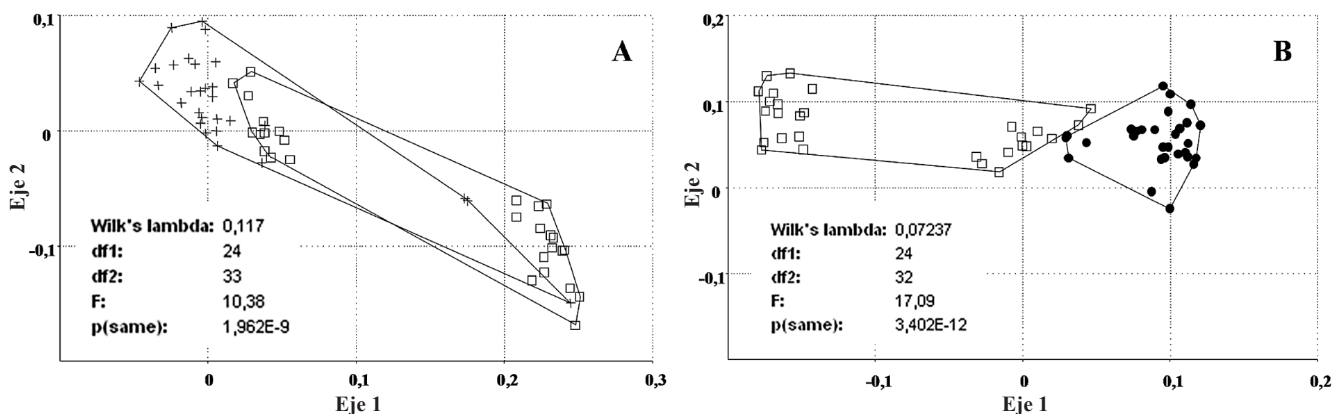


Figura 5. Comparación de la forma del aedeago de los híbridos A1 respecto A. *D. mercatorum* de a) Tatacoa y B. Patía. ● *D. mercatorum* Patía + *D. mercatorum* Tatacoa. □ Híbridos A1 (♀Patía x ♂Tatacoa).

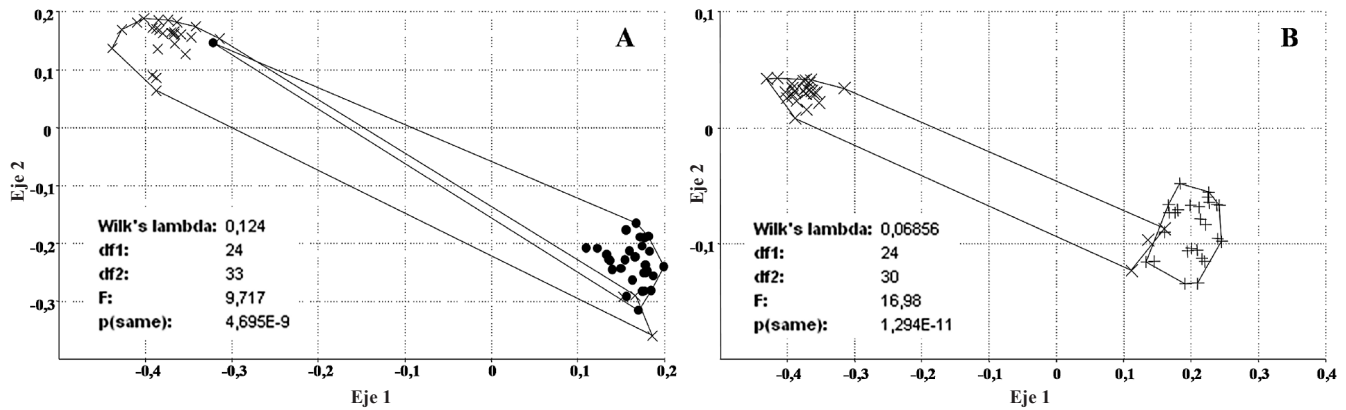


Figura 6. Comparación de la forma del aedeago de los híbridos A2 respecto a *D. mercatorum* de A. Patía y B. Tatacoa. ● *D. mercatorum* Patía + *D. mercatorum* Tatacoa x Híbridos A2 (♀Tatacoa x ♂Patía).

El hecho de no presentarse una morfología completamente intermedia entre los híbridos interpoblacionales puede asociarse al componente genético distinto de los híbridos respecto al que puede presentarse en cada uno de los parentales, teniendo en cuenta que el resultado fenotípico para este carácter depende de las múltiples interacciones de los genes responsables de la forma en esta estructura y la combinación específica que resulta de la herencia de los dos genomas distintos (Soto 2008).

Mancha abdominal. Teniendo en cuenta el componente genético asociado con la pigmentación en las especies de *Drosophila* (Brisson *et al* 2004) y con el fin de tener evidencias de la variación genética de las dos poblaciones de *D. mercatorum* en este carácter, se realizó el análisis morfométrico de la mancha abdominal, encontrando que esta no presenta diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las poblaciones entre sexos (Shapiro Wilk's $P=0,085$ para la población de Tatacoa y $0,084$ para la población de Patía).

En la figura 7A se observa que los machos de ambas poblaciones no presentan diferencias estadísticamente significativas en la forma de la mancha abdominal ($P=0,07$), por lo tanto, este es un carácter que además de no variar entre sexos intrapoblacionalmente, tiene la misma forma en los machos en comparaciones interpoblacionales, sin embargo, en la figura 7b la comparación interpoblacional de las hembras muestra diferencias significativas ($P=0,003$) lo que posiblemente es evidencia de la diferenciación genética entre las dos poblaciones que para esta estructura es muy baja y por tanto, no permite distinguir a que población pertenece cada individuo.

Rocha, *et al* (2009), asocian la pigmentación de *D. medio-punctata* con la variación en la temperatura y muestran que el patrón de expresión fenotípica depende del valor fenotípico

promedio, además de los genes de plasticidad y su importancia en la selección natural y no encuentran una asociación con la presencia de diferentes inversiones cromosómicas. David, *et al* (2005) asocian una menor pigmentación con temperaturas altas en tanto que el aumento de la pigmentación se da como respuesta adaptativa a ambientes más fríos.

Estos resultados son similares a los encontrados por Prieto (2006), donde la variación de la pigmentación abdominal y las manchas torácicas entre las poblaciones de *D. martensis* colectadas en Camarones y Santa Marta (Colombia), presentaron poca variabilidad indicando que es un carácter poco discriminante. También puede atribuirse la baja variabilidad al control de variables ambientales en el laboratorio, teniendo en cuenta que la pigmentación del abdomen en las especies de *Drosophila* presenta variación asociada a las condiciones ecológicas en las poblaciones naturales, pues tiene un componente genético que contribuye adaptabilidad en ambientes cambiantes (Brisson 2004).

Morfometría del ala. La comparación de la forma del ala de los machos de *Drosophila mercatorum* (Fig. 8) no muestra variación entre las dos poblaciones de Tatacoa y Patía, siendo, al igual que la mancha, un carácter que presenta una forma estable. Respecto al tamaño la prueba de Kruskal Wallis indica que existen diferencias significativas en los tamaños de las alas en al menos uno de los grupos de individuos comparados ($P<0,001$) lo cual se corrobora con la prueba U de Mann Whitney (Tabla 2) donde los machos de Tatacoa son similares en tamaño a los del Patía (2,05–2,3 mm) pero presentan diferencias en todas las comparaciones con las hembras, igualmente las hembras de Tatacoa son similares a las del Patía (2,25–2,45mm), pero se diferencian de los machos en todas las comparaciones.

Tabla 2. Prueba U de Mann Whitney para tamaño del ala de *D. mercatorum* (Patía vs Tatacoa).

	♂T vs ♀T	♂P vs ♀P	♂P vs ♀T	♂T vs ♀P	♂P vs ♂T	♀P vs ♀T
N	15	15	15	15	15	15
T=Ub	16	44	22	44	89	75
Valor P	6,84E-05	0,004795	0,0001892	0,004795	0,3401	0,1249

♂: Macho, ♀: Hembra, P: Patía, T: Tatacoa.

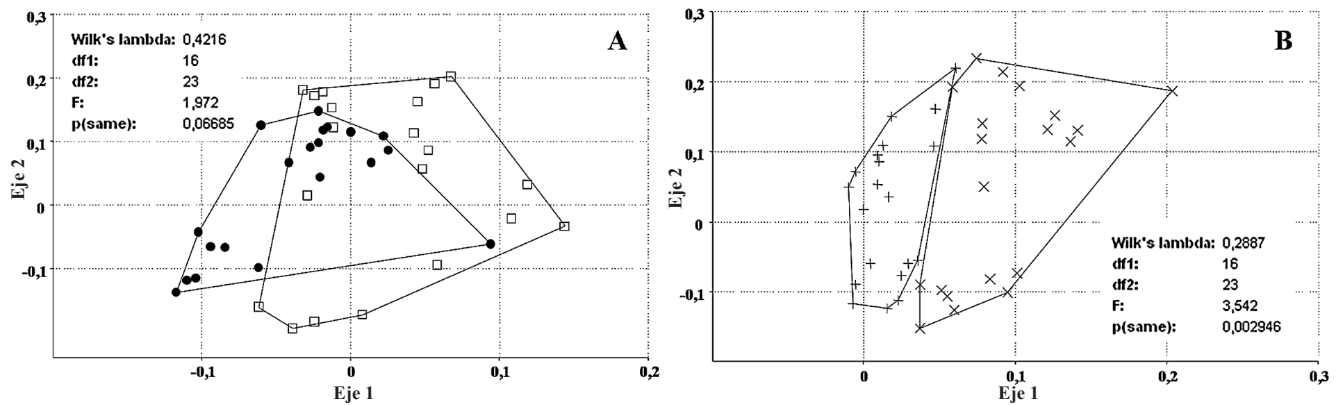


Figura 7. Comparación de la forma de la mancha abdominal entre poblaciones por sexos. ● Machos Tatacoa □ Machos Patía + Hembras Tatacoa x Hembras Patía.

Hay evidencias que indican que diferentes aspectos del ala (tamaño y forma) de especies del género *Drosophila* son blanco de la selección natural, comprobadas en estudios de variación clinal (Gilchrist *et al.* 2004) y relación con el cactus hospedador (Soto *et al.* 2008), por lo tanto es un carácter importante para evidenciar variación genética y relación con el ambiente, sin embargo, dicha variación principalmente atribuida a la plasticidad no se presenta dadas las condiciones controladas en laboratorio.

Teniendo en cuenta que el tamaño del ala es usado para estimar el tamaño del cuerpo, se puede asumir que no hay diferencias en el tamaño de los individuos del mismo sexo entre poblaciones. En la comparación entre sexos se destaca que, al igual que en muchas especies de insectos, las hembras son más grandes que los machos, por lo tanto, esta es una característica que puede representar dimorfismo sexual.

Para la población de *D. mercatorum* del Desierto de la Tatacoa, la correlación canónica del tamaño del aedeagus y el ala

es de 0,9 y para el Valle del Patía es de 0,66 mostrando una correlación positiva en las dos poblaciones (Tabla 3), esto indica que la variación en el tamaño del aedeagus puede atribuirse en parte a la del cuerpo y el resto de su variación puede deberse a otras causas como la pleiotropía o la selección.

Análisis evolutivo. En los cruces interpoblacionales de *D. mercatorum* el contraste múltiple de rangos, muestra diferencias significativas en algunos cruces de los híbridos entre sí o con su población de origen, lo cual puede resultar de la presión exogámica o la divergencia genética de las poblaciones asociada a procesos evolutivos particulares, como mutaciones no compartidas por la falta de flujo genético y que al reunirse en los individuos híbridos pueden generar cierto aislamiento gamético.

La forma del aedeagus de los machos híbridos no fue fenotípicamente intermedia respecto a las poblaciones de origen y su afinidad morfológica varió según el tipo de cruce, es

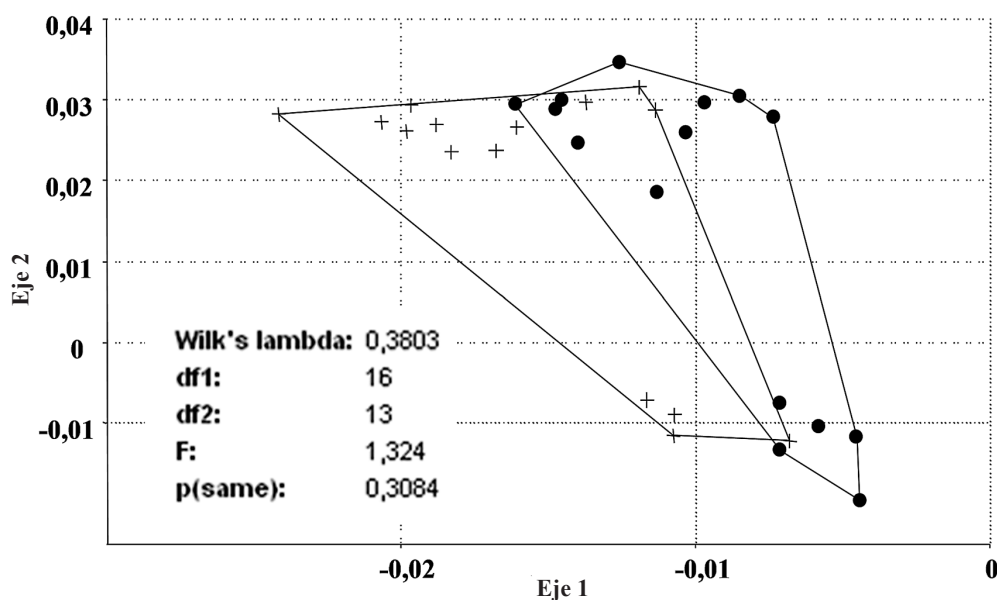


Figura 8. Comparación interpoblacional de la forma del ala de los machos de *D. mercatorum* de Tatacoa y Patía. ● Machos Tatacoa + Machos Patía.

Tabla 3. Correlaciones canónicas para tamaño del ala y el aedeago de *D. mercatorum*.

	Nº	Autovalor	Correlación canónica	Wilks Lambda	Chi-cuadrado	G.I.	P-Valor
Tatacoa	1	0,807407	0,89558	0,192593	28,8256	1	7,44E-08
Patía	1	0,431178	0,656641	0,568822	9,87327	1	0,001661

Número de casos completos: 20 por población. 95% de nivel de confianza.

decir, los híbridos fueron morfológicamente más similares a la población de donde provenía el padre, siendo: los híbridos A1 mas parecidos a la población de Tatacoa y los híbridos A2 a la de Patía. Estos resultados son incompatibles con la idea de que las diferencias en la morfología de órganos genitales propios de los machos se deben a poligenes con efectos aditivos pequeños y que dan como resultado formas intermedias en los aedeagus de los híbridos, reportada por Coyne y Orr (2004) para *D. simulans* y *D. mauritiana*, sin embargo, los autores admiten algún grado de dominancia y epistasia que puede mostrar una tendencia de similitud de los genitales de los híbridos con uno de sus parentales. Estas diferencias en los resultados pueden deberse a que existan diferencias en el tiempo de divergencia entre los miembros de los dos grupos de especies.

Otro argumento para el agrupamiento de los híbridos con las poblaciones de las que proviene el macho usado en el cruce es la posible relación de los genitales internos con genes del cromosoma sexual Y, con posibles inversiones en los cromosomas autosómicos no compartidas entre las poblaciones o con una arquitectura genética más compleja, como ha sido reportado para *D. koepferae* y *D. buzzatii* (Soto *et al.* 2007). Es importante mencionar que los híbridos A2 presentaron una agrupación alejada de los parentales indicando posible variación genética debida a la distinta combinación de los genes de las poblaciones parentales.

La forma de la mancha y las alas no revelan diferenciación genética entre las poblaciones de *D. mercatorum*, así mismo, el tamaño del ala como estimativo del tamaño del cuerpo, tampoco presenta diferencias interpoblacionales en comparaciones de individuos del mismo sexo, sin embargo, el tamaño de las hembras es mayor al de los machos lo cual puede tomarse como un carácter de dimorfismo sexual.

La evolución requiere la sucesión de una serie de hechos que generalmente se hallan distribuidos en un periodo considerable de tiempo por lo que resulta difícil determinar todos y cada uno de estos (Prieto 2006). En este trabajo se señalan algunas evidencias del cambio fenotípico de las poblaciones geográficamente aisladas (Tatacoa y Valle del Patía), que está dado por la variación inter-poblacional que se manifestó en la reconstrucción geométrica de la forma del aedeagus, la medición de su tamaño y el conteo de claspers. Teniendo en cuenta que en el caso de los análisis presentes el ambiente está controlado bajo las condiciones del laboratorio y todas las especies y poblaciones se mantuvieron bajo el mismo tratamiento (temperatura, medio de cultivo, horas de luz/oscuridad, etc), se puede afirmar que dicha variación se debe en mayor parte al componente genético.

Para explicar la evolución de órganos genitales masculinos se han discutido tres hipótesis principales, la hipótesis llave-cerradura (Eberhard 1985, Arnqvist 1998), pleiotropía (Mayr 1963) y selección sexual (Eberhard 1985). Para argumentar qué tipo de hipótesis explica mejor la evolución de

las poblaciones estudiadas, se tiene en cuenta la existencia o no de variación morfológica y correlaciones entre aedeagus y otras características del cuerpo de los individuos por población.

La hipótesis de llave-cerradura propone que el desarrollo de los órganos genitales debería ser altamente canalizado, por lo tanto, se esperaría muy poca variación fenotípica en los rasgos genitales debido a la selección direccional, muy poca plasticidad y además, deben ser relativamente independientes de otros rasgos, como el tamaño del cuerpo; por lo tanto se esperaría bajas correlaciones entre estas características, esto es descartado en este trabajo porque en ambas poblaciones de *D. mercatorum* se presenta alta variabilidad y politipismo, además, existió una correlación positiva en el tamaño del las alas y el aedeagus. Teniendo en cuenta que la variación intra e interpoblacional de la forma y el tamaño del aedeagus es incluso mayor a la de otros caracteres no sexuales (alas y manchas), y que además existió correlación positiva en el tamaño del aedeagus y del ala es posible apoyar la hipótesis de pleiotropía según la cual, los órganos reproductivos tienen correlaciones positivas respecto a otros órganos no relacionados que dependen del mismo gen y por tanto, se ven afectados por el proceso selectivo.

Según la hipótesis de selección sexual, la variación en los rasgos relativos a los genitales está relacionada con el éxito del macho en la fertilización, competencia entre los machos y elección propia de las hembras, lo que sugiere que los rasgos bajo selección sexual muestran variabilidad fenotípica alta. Los resultados de este trabajo se ajustan a esta teoría, puesto que la variabilidad de la forma del aedeagus a nivel intra e interpoblacional fue más alta que la de las alas y las manchas, resultados similares se han reportado en especies del genero *Hystriochophora* (Lepidoptera: Tortricidae) donde los órganos genitales presentan una alta variación morfológica intraespecífica lo cual apoya la hipótesis de selección sexual y rechaza la hipótesis de llave-cerradura (Gilligan & Wenzel 2008).

En esta investigación se presentó correlación en el tamaño del aedeago y el ala, lo cual no se esperaría según la hipótesis de selección sexual, aunque dicha correlación no es necesariamente imposibilitada, puesto que es una teoría muy permisiva debido a que depende del tipo de selección que actúe y de la posibilidad de que existan inversiones cromosómicas influyendo en los caracteres morfológicos. Para *D. mediopunctata* se ha reportado correlación altamente positiva entre el tamaño del cuerpo medido usando como parámetro el ala y el aedeago, de acuerdo a esto, los autores proponen que para esta especie la evolución de los genitales se ajusta a la hipótesis de pleiotropía y de selección sexual (Andrade *et al.* 2009). Arnqvist *et al.* (1997) encontraron correlaciones positivas en el tamaño de los genitales de *Gerris incognitus* y el tamaño del cuerpo y las patas, lo cual evidencia que la morfología de los genitales no fue altamente canalizada como supone la hipótesis de llave-cerradura sino que su evo-

lución se explica mejor según la hipótesis de selección sexual y de pleiotropía.

Las poblaciones de *Drosophila mercatorum*, a pesar de presentar diferencias significativas en la forma del aedeagus, se cruzaron exitosamente y generaron descendencia fértil, en la cual se destaca que el número de individuos híbridos inter-poblacionales fue similar al estandarizado, pero presentó disminución en los cruces entre híbridos y las retrocruzas, dicha disminución podría explicarse por la acumulación de variación propia de cada población, que da como resultado la iniciación del surgimiento de barreras reproductivas post-cigóticas que afecten la viabilidad de los híbridos. El hecho de no encontrar una forma intermedia en los aedeagos de los híbridos respecto a las poblaciones de origen, sino una agrupación separada y con mayor parecido al cruce donde se encontraba el progenitor macho, hace pensar que existen diferencias importantes en los genes, posiblemente del cromosoma Y entre las poblaciones, y que además, la interacción de genes autosómicos en combinaciones diferentes pueden influir en dicha estructura y generar la diferenciación significativa en la forma.

Agradecimientos

Al Sistema de Investigaciones VIPRI de la Universidad de Nariño por el financiamiento de la fase de campo en el concurso Alberto Quijano Guerrero. A los grupos de investigación en Genética de Poblaciones y evolución de las Universidades del Tolima y los Andes. Al Dr. Ignacio Soto del departamento de Ecología, Genética y Evolución de la Universidad de Buenos Aires.

Literatura citada

- ANDRADE, C.; VIEIRA, R.; ANANINA, G.; KLACZKO, L. 2009. Evolution of the male genitalia: morphological variation of the *aedeagi* in a natural population of *Drosophila mediopunctata*. *Genética* 135(1): 13-23.
- ARNQVIST, G. 1998. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature* 393: 784-786.
- ARNQVIST, G. 1997. The evolution of water strider mating systems: causes and consequences of sexual conflicts. En: Choe, J.C.; Crespi, B.J. (eds). *The evolution of mating systems in insects and arachnids*. Cambridge University Press. 387 p.
- ARNQVIST, G.; THORNHILL, R.; ROWE, L. 1997. Evolution of animal genitalia: morphological correlates of fitness components in a water strider. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 613-640.
- BETANCOURT, L. 2007. Aislamiento Reproductivo en Poblaciones Alopátricas Colombianas de *Drosophila starméri*. Tesis Maestría. Universidad de los Andes, Instituto de Genética. Bogotá, Colombia. 69 p.
- BRISSON, J.; TEMPLETON, A.; DUNCAN, I. 2004. Population Genetics of the Developmental Gene *optomotor-blind* (*omb*) in *Drosophila polymorpha*: Evidence for a Role in Abdominal Pigmentation Variation. *Genetics* 168: 1999-2010.
- BROWER, A. 1996a. Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* Butterflies: a phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 50(1): 195-222.
- BROWER, A. 1996b. A new mimetic species of *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae), from southeastern Colombia, revealed by cladistic analysis of mitochondrial DNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society of London* 116: 317-332.
- COYNE, J.; ORR, A. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA. 545 p.
- DAVID, JR.; GIBERT, P.; LEGOUT, H.; PÉTAVY, G.; CAPY, P.; MORETEAU, B. 2005. Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative traits analysis in natural populations. *Heredity* 94: 3-12.
- DE POLANCO, M. 1997. Guía teórico-práctica para el estudio de la genética. Universidad del Tolima.
- EBERHARD, W. 1985. *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Harvard University Press, Cambridge, USA. 256 p.
- FERNÁNDEZ, C.; RUANO, J.; GONZÁLES, J. 2001. La existencia de diferencias en el cortejo no garantiza su intervención en el aislamiento reproductor en dos arañas lobo (*Lycosa*, Araneae, Lycosidae). *Madrid, España. Etología*, 9: 1-8.
- FUTUYMA, D. 1998. *Evolutionary Biology*. 3rd edition, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts: 763 p.
- GIENAPP, P.; TEPLITSKY, C.; ALHO, S.; MILLS, A. 2008. Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology* 17: 167-178.
- GILLIGAN, T.; WENZEL, J. 2008. Extreme intraespecific variation in *Hystriophora* (Lepidoptera: Tortricidae) genitalia - questioning the lock-and-key hypothesis. *Annales Zoologici Fennici*. 45: 465-477.
- GILCHRIST, G.; HUEY, R.; BALANYÀ, J.; PASCUAL, M.; SERRA, A. 2004. A time series of evolution in action: A latitudinal cline in wing size in South American *Drosophila subobscura*. *Evolution* 58: 768-780.
- HEY, J.; FITCH, W.; AYALA, F. 2005. Systematics and the origin of species: An introduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 6515-6519.
- KING, L. 2003. The Evolution of Insect Mating Structures through Sexual Selection. *Florida Entomologist* 86(2): 124-133.
- MAYR, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York, USA. 334 p.
- MAYR, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press. New York, USA. 797 p.
- PRIETO, R. 2006. Análisis morfométrico (tradicional y geométrico) de las alas y los patrones de pigmentación dorsal de cuatro especies del grupo *repleta*. Tesis de Maestría Biología, Universidad del Tolima, Ibagué. 110 p.
- ROCHA, F.; MEDEIROS, H.; KLACZKO, L.B. 2009. The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. *Evolution* 63: 280-287.
- ROJAS, A. 2001. Análisis del Aislamiento reproductivo en las especies cactofílicas del Cluster *martensis*, en dos regiones Colombianas (Costa Norte y Desierto de la Tatacoa). Tesis Maestría. Instituto de Genética, Universidad de los Andes. Bogotá. 105 p.
- SANS DE LA ROSA, M.; MORENO-ROSSI, A.; BUSTOS, E. 1987. Nuevo medio de cultivo para las especies de *Drosophila starméri*, *Drosophila uniseta*, *Drosophila martensis*, y *Drosophila venezolana* del grupo *repleta* del enjambre *martensis*, recientemente colectadas en los desiertos de la Guajira Colombiana. *Evolución Biológica* 2: 305-306.
- SIMÓ, M.; SEGUÍ, R.; PÉREZ-MILES, F. 2002. The copulatory organs of the cryptic species *Lycosa thorelli* and *Lycosa carbonelli* and their hybrid progeny, with notes on their taxonomy (Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology* 30: 140-145.
- SOTO, I.; CARREIRA, V.; FANARA, J.; HASSON, E. 2007. Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. *BMC Evolutionary Biology* 7: 77.
- SOTO, I.; CARREIRA, V.; HASSON, E. 2008. Wing morphology and fluctuating asymmetry are dependent of the host plant in cactophilic *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 598-609.
- SOTO, I. 2008. Evolución morfológica asociada al proceso de divergencia entre especies: el cluster *Drosophila buzzatii* (Diptera, Drosophilidae). Tesis Doctoral. Departamento de Ecología, Genética y Evolución. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 234 p.
- WASSERMAN, M. 1982. Evolution and speciation in selected groups: the *repleta* species group. *The genetics and biology of Drosophila* 3(b): 61-139.
- WASSERMAN, M.; WILSON, F. 1957. IX Further studies on the *repleta* group. *University Texas Publications* 5721: 132-156.

- Sugarcane 16-20
Sumilarv 91-94
Tabla de vida 21-25, 62-64, 66, 117
Tamarindus indica 174
Tanypodinae 162, 163
Tarsonemidae 228
Taxonomía 331, 341
Taxonomy 331, 341
Tecia solanivora 1, 3, 5-7, 27, 33, 34
Temefos 9, 92, 94
Tenebrionidae 251
Termitas 36-41
Tetranychidae 62, 65, 66
Tetranychus cinnabarinus 21-25, 62, 63
Tetranychus desertorum 62
Tetrastichus sp 240
Theobroma 80
Thrasorinae 137, 139
Thrasorino 137
Thrasorus 137
Tobón Flor Ángela 251
Tolerante 16
Tomate 210
Torres C Yusdiel 162
Tortricidae 67, 68, 70
Toxicidad 192, 269
Trialeurodes vaporariorum 210
Trichogramma 238
Trichogramma acacioi 238
Trichogramma caiaposi 238
Trichogramma demoraesi 238
Trichogramma maxacalii 238
Trichogramma pratissolii 238
Trichogramma soaresi 238
Trichogrammatidae 238
Tricorythodes caunapi 327
Tropics 305
Ulumoides dermestoides 251
Uribe S. Sandra Inés 273
Valle Javier 269
Vargas-Osuna Enrique 192
Varipes 346
Varipes sancarlos n. sp. 346
Vector 8-15, 77-94
Veliidae 350
Vendramim José D. 16
Viçosa 80 82 83
Vigna radiata 251
Villalobosothignus 128
Villamizar R Laura 27
Wasmannia auropunctata 279
Witzgall Peter 1
Xerosaprinus sp 103, 105-108
Xilanasa 167
Xilella fastidiosa 77
Xilófagos 56 57
Xylocopa 313
Xylocopini 313
Yepes Francisco 152
YMMV 77-79
You-Qing Luo 240
Zambrano-González Giselle 117
Zamora E Humberto 183
Zea mays 82, 36, 217
Zhang Mengqi 95
Zhuang Quan 95, 96, 98, 100, 102
Zingiberaceae 357
Zoocria 117-119

Fe de erratas número 37 (2)

Por error involuntario el trabajo de la página 244 a la 248 y los trabajos de las páginas 318 a la 359 tienen como número de revista 37 (1) cuando en realidad es 37 (2).

Tricorythodes caunapi: a new species from the rain forest of the colombian pacific (Ephemeroptera: Leptohyphidae)

Tricorythodes caunapi: una nueva especie para el bosque tropical húmedo del pacífico colombiano
(Ephemeroptera: Leptohyphidae)

LUCIMAR G. DIAS¹, TITO BACCA², and PAULO S. F. FERREIRA³

Abstract: *Tricorythodes caunapi* sp. n. is described and illustrated from larvae and adults of both sexes. The name refers to the Caunapi River, located on the Pacific coast of Colombia, where the type-material was collected. This species can be recognized by the following combination of characters of adults: shape of the male genitalia, tibiae and tarsi with blackish bands, abdominal color pattern and small size (approximately 3mm); larvae: maxillary palp absent, tibiae and tarsi with same coloration as adults, tarsal claws with 7-8 marginal and double row of 1-2 + 2-3 submarginal denticles, abdominal color pattern, and triangular operculate gills.

Key words: Mayfly. Taxonomy. Neotropics. Biogeographic Chocó.

Resumen: Se describe e ilustra la larva y adulto de ambos sexos de *Tricorythodes caunapi* sp. n. El nombre de la especie hace alusión al río Cunapi del Pacífico Colombiano, que corresponde al lugar donde el material tipo donde se colectó. Esta especie se reconoce por las siguientes combinaciones de características en el adulto: forma de los genitales del macho, tibia y tarso con bandas oscuras, por el patrón de coloración de abdomen y por su pequeño tamaño (3mm aproximadamente). En la larva: por el palpo maxilar ausente, tibia y tarso con la misma coloración del adulto, clavas tarsales con 7-8 denticulos marginales y una doble hilera de 1-2 + 2-3 de denticulos marginales, por el patrón de coloración abdominal y por las branquias operculares triangulares.

Palabras clave: Efímera. Taxonomía. Neotrópico. Chocó biogeográfico.

Introduction

Tricorythodes Ulmer is a specious genus within the Leptohyphidae. The genus was described by Ulmer (1920), and is widely distributed in the Neotropical region. The genus is represented by twenty-one species in South America (Dias and Salles 2006; Dias et al. 2009a,b; Emmerich 2007; Gonçalves et al. 2010; Molineri 2002; Molineri and Zúñiga 2006). In Colombia four species are known: *T. zunigae* Molineri, 2002 from Chocó Department; *T. trifasciatus* Molineri and Zúñiga, 2006 from Valle del Cauca Department; *T. capuccinorum* Emmerich, 2007 and *T. uniandinus* Emmerich, 2007, these last from Cundinamarca Department (Molineri 2002; Domínguez et al. 2006; Emmerich 2007; Molineri and Zúñiga 2006). All Colombian *Tricorythodes* species have been described based on nymphs and adults.

The municipality of Tumaco is located in the Pacific coastal region of Colombia. Tumaco belongs to the Chocó Biogeographical Region, which exhibits high levels of diversity and endemism (García-Kirkbride 1986; Gentry 1986). Collecting and conducting biodiversity studies in this area is difficult due to armed conflicts, illegal crops and extensive oil palm plantations. Sampling of aquatic insects in this region resulted in the finding of a new species of *Tricorythodes*. In this paper, the authors describe and illustrate *Tricorythodes caunapi* sp. n. based on larvae and adults of both sexes.

Material and Methods

Both larvae and adults were preserved in 90% ethanol. Mouthparts and legs of larvae as well as male genitalia and

wings of the adults were mounted on microscope slides using Euparal. Illustrations were drawn using a camera lucida attached to a stereo microscope. Specimens are deposited in the following Institutions: Colección Entomológica del Programa de Biología de la Universidad de Caldas, Caldas, Colombia (CEBUC); Colección Zoológica de la Universidad de Nariño, Nariño, Colombia (PSO-CZ); Instituto-Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina (IFML). Adults were obtained and associated by rearing larvae in the Caunapi River. All measurements are in millimetres; numbers correspond to the minimum and maximum values.

Systematic account

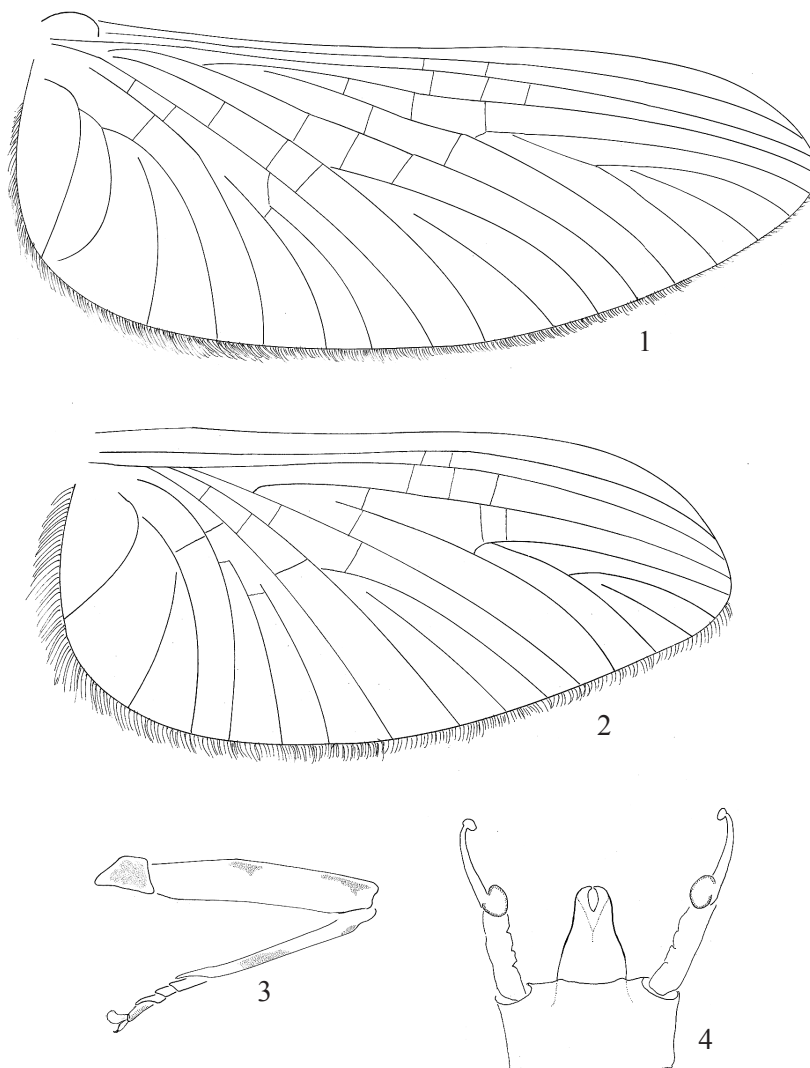
Tricorythodes caunapi sp. n. (Figs. 1-22)

Type Material: Holotype male imago, from Colombia, Tumaco, Tangareal, Río Caunapi. 13m. 1° 32' 78.1" N 78° 40' 59.5" W LAS COORDENADAS NO ESTÁN CLARAS 06-nov-2007, Dias L. G., Bacca. T., Angulo. D., Estacio. J. (IFML). Paratypes: 5 larvae, same data as holotype, except, 05-XI-07 (CEBUC). One male, 1 female imago, same data as holotype (CEBUC). Five larvae, same data as holotype, except, 05-XI-07 (IFML). Other Material: 5 larvae, same data as paratypes (PSO-CZ). One male, 1 female imago, same data as paratypes (PSO-CZ).

Male imago (measurements taken from 5 specimens): Length: body, 2.5 - 2.8mm; forewing, 2.8 - 3.0mm. General colouration yellowish with black and brown marks.

¹ Ph.D., Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. Email: lucimar.dias@ucaldas.edu.co. Corresponding author.

² Ph.D., Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. ³ Ph.D., Museu de Entomologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 36571-000 Viçosa, MG, Brazil.



Figures 1-4. *Tricorythodes caunapi* sp. n.: 1. female fore wing; 2. male fore wing; 3. male mesothoracic leg; 4. male genitalia.

Head: Yellowish with small black marks on posterior margin of eyes and median region of occiput; antennae yellow.

Thorax: Pronotum uniformly shaded with black, except two small yellowish marks on anterior region; mesonotum yellowish, shaded with black; mesoscutellum brownish with black marks, lateral regions yellowish, plumidium absent; metanotum yellowish shaded with black; pleural and sternal sclerites whitish. **Legs** (Fig. 3): coxae and trochanters whitish shaded with black; femora whitish with dark marks on dorsal and subapical regions; tibiae yellowish, shaded with subapical dark band, and a small, basal dark mark; tarsi whitish, except fourth segment blackish. **Forewings** (Fig. 2): grey at base, membrane hyaline; longitudinal veins blackish; cross veins translucent, darkening toward costal margin; costa and subcosta pigmented grey margin; CuP absent.

Abdomen: Terga uniformly shaded with black, except submedian region of terga I-IV, and along lateral margins; sterna whitish shaded with pale gray. **Genitalia** (Fig. 4) whitish, except lateral margins of penis brownish; penis pyramidal

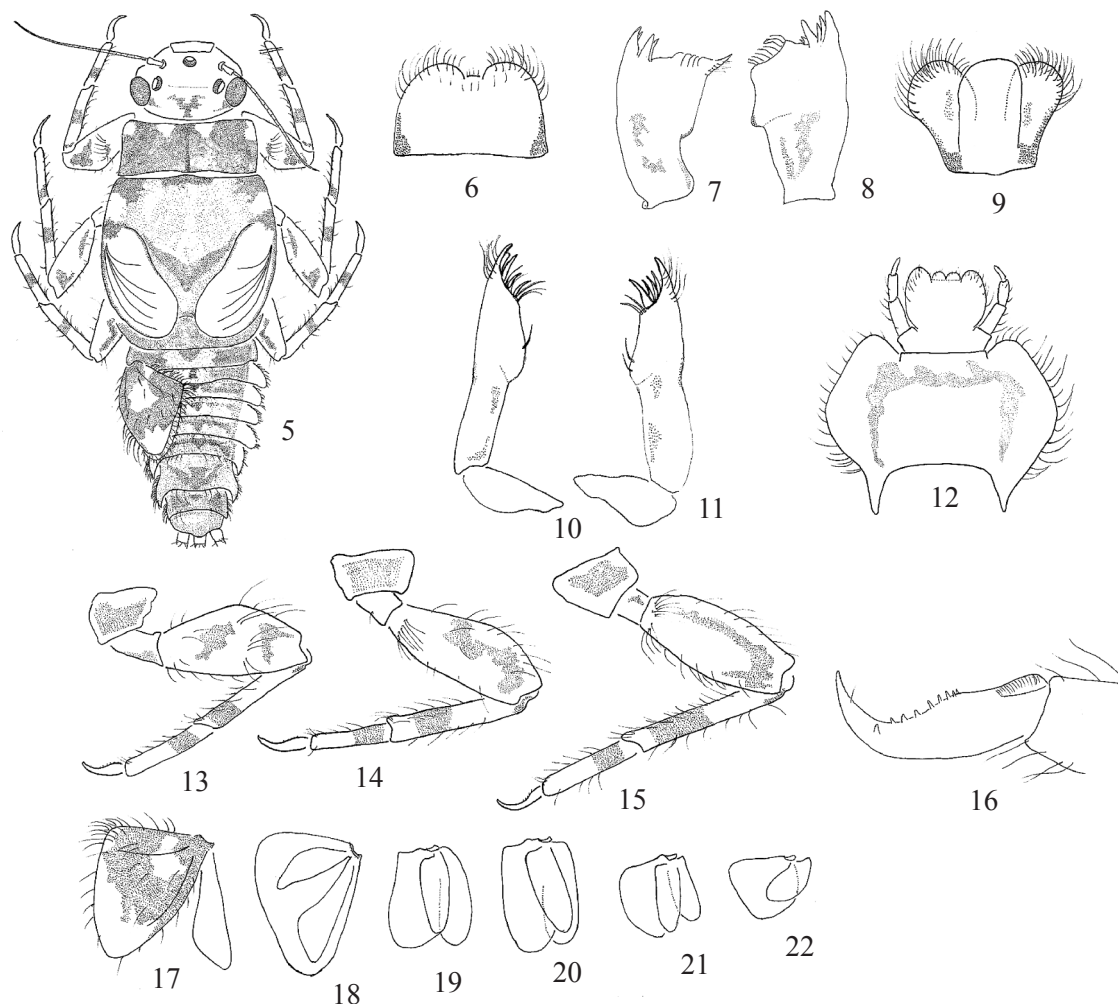
and fused for greater than 75% of their length; segment I of forceps subequal segment II; caudal filaments whitish, translucent.

Female imago. (measurements taken from 2 specimens) Length: body, 2.8-3.0 mm; forewings, 3.0mm.

Female similar to male in morphology and color pattern, except length of wings, longer than male and CuP vein curved, weak and sometimes incomplete (Fig. 1). Abdomen yellowish, shaded black (similar Fig. 5).

Mature larva (Figs. 5-22). (measurements taken from 6 specimens) Male length: body, 2.0-2.5mm, mesonotum, 0.50 - 0.70mm; cerci 1.2mm. Female length: body, 2.5-2.8mm; mesonotum, 0.60-0.70mm; cerci 1.0mm. General colouration yellowish with blackish marks. Small specimens with stout body.

Head (Fig. 5): Yellowish, with small marks on posterior margin of eyes; median region of occiput black; antennae yellowish.



Figures 5-22. *Tricorythodes caunapi* sp. n.: 5. nymphal habitus; 6. labrum; 7. left mandible (dorsal view); 8. right mandible (dorsal view); 9. hypopharynx (dorsal view); 10. left maxilla (dorsal view); 11. right maxilla (dorsal view); 12. labium (dorsal view); 13. foreleg; 14. mid leg; 15. hind leg; 16. tarsal claw; 17. operculate gill (dorsal view); 18. operculate gill (ventral view); 19-22. gills III-VI (ventral view).

lowish, mouthparts yellowish with black marks (Figs. 6-12); frontal shelf absent, genal projection slightly developed; maxillae (Figs. 10, 11) with stipes subequal to galea-lacinia length; inner proximal margin of galea-lacinia with 1 or 2 setae; maxillary palp absent.

Thorax (Fig. 5): Pronotum uniformly shaded black, except two small, yellowish marks on anterior region and sometimes along anterolateral margins; mesonotum yellowish, shaded with black, darker between wing pads; anterolateral region of mesonotum with whitish mark; wing pads yellowish with dark veins; sterna whitish with grey shading. **Legs** (Figs. 13-15) whitish, with blackish marks on dorsal region of femora; femora bordered with long setae, dorsum of fore femora with a transverse row of setae on submedian region; tibiae with basal and subapical blackish bands, tarsi with subbasal blackish band; tarsal claws with 7-8 marginal and a pair of 1-2 + 1-3 submarginal denticles near apex; distal setae present (Fig. 16).

Abdomen (Fig. 5): uniformly shaded black, except submedian region of terga I-IV and lateral expansions of the abdomen (Fig. 5); lateral margins of segments III-VII expanded

with posterolateral spines on segments VII-IX, very short on IX (Fig. 5); posterior margins of abdominal terga with rows of setae; abdominal sterna whitish shaded with grey. Operculate gills (Fig. 17) triangular, shaded black, whitish mark in median and distal regions, with two dorsal ridges and a pair of ventral membranous lamellae (Fig. 18); remaining gills whitish, translucent and shaded with grey (Figs. 19-22); Gill formula 3-3-3-3-2 (Molineri 2003). Caudal filaments yellowish, translucent, shaded with grey, setae present at joints.

Diagnosis. In adults: (1) color pattern similar to figure 5; (2) penis pyramidal (Fig. 4); (3) segment 1 of forceps subequal to segment 2 (Fig. 4). **In larvae:** 1) maxillary palp absent (Figs. 10, 11); 2) tarsal claws with 7-8 marginal and double row of 1-2 + 1-3 submarginal denticles (Fig. 16); 3) opercular gills triangular, blackish, except whitish mark in median and distal regions (Fig. 17); 4) legs with dorsal blackish marks on femora, tibiae with basal and subapical blackish bands, tarsi with subbasal blackish band (Figs. 13-15); 5) transverse row of setae on dorsal surface of fore femora in the submedian region (Fig. 13); 6) general coloration yellowish, heavily shaded with black (Fig. 5); 6) small size (3mm).

The *T. caunapi* shows close resemblances with *T. trifasciatus* Molineri and Zúñiga, the nymphs and adults possess small size and the coloration pattern with black marks. In addition, both species are from Chocó Biogeographical Region. However, these species can be easily distinguished by penis form; in nymphs by the number of denticles of the tarsal claws, the maxillary palp absence in *T. caunapi*, besides the marks on tibia of the new species.

Etymology. The new species is named after the Caunapi River, where the type specimens were collected.

Distribution. Colombia: Nariño Department: Tumaco.

Acknowledgments

We thank the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) for providing funds to first author to conduct her post-graduate program at the Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. We also thank Danny Angulo and Jhon Estacio, students of the Universidad de Nariño for assistance with sampling specimens in Tumaco.

Literature cited

- DIAS, L.G.; SALLES, F.F. 2006. A New Species of *Tricorythodes* (Ephemeroptera: Leptohyphidae) from Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Neotropical Entomology* 35: 56-58.
- DIAS, L.G.; SOUZA, D.; CABETTE, H. 2009a. A new species of *Tricorythodes* Ulmer (Ephemeroptera: Leptohyphidae) and first record of *Tricorythodes quizeri* Molineri from Brazil. *Aquatic Insects* 31(1): 95-99.
- DIAS, L. G.; CRUZ, P.V.; FERREIRA, P.S.F. 2009b. A New species of the *Tricorythodes* Ulmer (Ephemeroptera: Leptohyphidae) from Northern Brazil. *Annales de Limnologie* 45(1): 127-129.
- DOMÍNGUEZ, E.; MOLINERI, C.; PESCADOR, M.; HUBBARD, M.D.; NIETO, C. 2006. *Ephemeroptera of South America*. Pensoft, Sofia-Moscow. 646 p.
- EMMERICH, D.E. 2007. Two new species of *Tricorythodes* Ulmer (Ephemeroptera: Leptohyphidae) from Colombia. *Zootaxa* 1561: 63-68.
- GARCÍA-KIRKBRIDE, M.C. 1986. Biological evaluation of the Chocó Biogeographic Region in Colombia. WWF-US, Washington, D.C. 61 pp.
- GENTRY, A.H. 1986. Species richness and floristic composition of Chocó region plant communities. *Caldasia* 15: 71-91.
- GONÇALVES, I. C.; DA-SILVA, E.R.; NESSIMIAN, J.L. 2010. Two new species of *Tricorythodes* Ulmer, 1920 (Insecta, Ephemeroptera) from Southeastern Brazil. *Zootaxa* 2721: 62-68.
- MOLINERI, C.; ZUÑIGA, M.C. 2006. New species of Leptohyphidae (Insecta: Ephemeroptera) from Colombia with evidence of reproductive time segregation. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 41(2): 139-151.
- MOLINERI, C. 2003. Revision of the South American species of *Leptohyphes* Eaton (Ephemeroptera: Leptohyphidae) with a key to the nymphs. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 39:47-70.
- MOLINERI, C. 2002. Cladistic analysis of the South American species of *Tricorythodes* (Ephemeroptera: Leptohyphidae) with the descriptions of new species and stages. *Aquatic Insects* 24: 273-308.
- ULMER, G. 1920. Neue Ephemeropteren. *Archiv Für Naturgeschichte* 85(11): 1-80.

Received: 23-dic-2010 • Accepted: 25-oct-2011

- Sugarcane 16-20
Sumilarv 91-94
Tabla de vida 21-25, 62-64, 66, 117
Tamarindus indica 174
Tanypodinae 162, 163
Tarsonemidae 228
Taxonomía 331, 341
Taxonomy 331, 341
Tecia solanivora 1, 3, 5-7, 27, 33, 34
Temefos 9, 92, 94
Tenebrionidae 251
Termitas 36-41
Tetranychidae 62, 65, 66
Tetranychus cinnabarinus 21-25, 62, 63
Tetranychus desertorum 62
Tetrastichus sp 240
Theobroma 80
Thrasorinae 137, 139
Thrasorino 137
Thrasorus 137
Tobón Flor Ángela 251
Tolerante 16
Tomate 210
Torres C Yusdiel 162
Tortricidae 67, 68, 70
Toxicidad 192, 269
Trialeurodes vaporariorum 210
Trichogramma 238
Trichogramma acacioi 238
Trichogramma caiaposi 238
Trichogramma demoraesi 238
Trichogramma maxacalii 238
Trichogramma pratissolii 238
Trichogramma soaresi 238
Trichogrammatidae 238
Tricorythodes caunapi 327
Tropics 305
Ulumoides dermestoides 251
Uribe S. Sandra Inés 273
Valle Javier 269
Vargas-Osuna Enrique 192
Varipes 346
Varipes sancarlos n. sp. 346
Vector 8-15, 77-94
Veliidae 350
Vendramim José D. 16
Viçosa 80 82 83
Vigna radiata 251
Villalobosothignus 128
Villamizar R Laura 27
Wasmannia auropunctata 279
Witzgall Peter 1
Xerosaprinus sp 103, 105-108
Xilanasa 167
Xilella fastidiosa 77
Xilófagos 56 57
Xylocopa 313
Xylocopini 313
Yepes Francisco 152
YMMV 77-79
You-Qing Luo 240
Zambrano-González Giselle 117
Zamora E Humberto 183
Zea mays 82, 36, 217
Zhang Mengqi 95
Zhuang Quan 95, 96, 98, 100, 102
Zingiberaceae 357
Zoocria 117-119

Fe de erratas número 37 (2)

Por error involuntario el trabajo de la página 244 a la 248 y los trabajos de las páginas 318 a la 359 tienen como número de revista 37 (1) cuando en realidad es 37 (2).

Lygaeoidea (Hemiptera: Heteroptera) de Parques Nacionales Naturales (PNN) con nuevos registros para Colombia

Lygaeoidea (Hemiptera: Heteroptera) from National Natural Parks (NNP) with new records of Colombia

LAURA ALEXANDRA RENGIFO-CORREA¹ y RANULFO GONZÁLEZ OBANDO²

Resumen: Lygaeoidea es uno de los grupos más numerosos del suborden Heteroptera pero, a raíz de su diversidad, no hay hasta el momento en Colombia estudios que sinteticen la información taxonómica del grupo. La información taxonómica es crítica para poder adelantar otro tipo de estudios, incluyendo aquellos que apuntan a la conservación. Con el fin de mejorar la comprensión de este taxón, se presenta un listado de los géneros de Lygaeoidea para Parques Nacionales de Colombia. Se listan 19 géneros de Lygaeoidea, distribuidos en seis familias. *Craspeduchus xanthostaurus*, *Epipolops scudderi*, *Jalysus reductus*, *Melanopleurus inflatus*, *Neoninus* sp., *Ninyas* sp., *Ochrostomus brasiliensis*, *Polychisme poecilus* y *Spilostethus pandurus* constituyen nuevos registros para el país. *Spilostethus pandurus* constituye además el primer registro para el Neotrópico. Se proveen diagnosis, fotografías para los géneros encontrados y se mencionan los sitios de colecta en los Parques Nacionales.

Palabras clave: Chinchas. Fauna neotropical. Taxonomía.

Abstract: Lygaeoidea is one of the largest groups of the suborder Heteroptera but, due to their diversity, there are not taxonomic reviews of the group in Colombia. Taxonomic information is needed as a base line to allow other kind of studies, including those aimed at conservation. For improve understanding about this taxon, a list of the genera of Lygaeoidea Natural Parks of Colombia is provided. 19 genera of Lygaeoidea that belong to six families are listed. *Craspeduchus xanthostaurus*, *Epipolops scudderi*, *Jalysus reductus*, *Melanopleurus inflatus*, *Neoninus* sp., *Ninyas* sp., *Ochrostomus brasiliensis*, *Polychisme poecilus* and *Spilostethus pandurus* are new records to Colombia. *Spilostethus pandurus* is also recorded for first time in the Neotropic. Diagnosis, photographs for each genera and collecting places in the National Parks are provided.

Key words: True bugs. Neotropical fauna. Taxonomy.

Introducción

Entre los Heteroptera, Lygaeoidea se destaca por ser uno de los grupos más numerosos del suborden con 15 familias, 695 géneros y más de 4200 especies descritas hasta el momento –datos calculados a partir de Cassis (2008)–. Son conocidos como “chinchas de las semillas” por que se alimentan de semillas maduras, aunque algunas especies succionan savia o son entomófagos (Schuh y Slater 1995). Respecto sus hábitats, Slater (1977) reconoce principalmente tres: 1) Arbóreos: especies que viven sobre hierbas (la mayoría) o árboles y son buenos voladores; 2) Lamináfilos: aquellos que viven apasionados entre las hojas o tallos de los pastos, por lo general, malos voladores; 3) Geófilos: viven en la hojarasca o en sus alrededores, con algunas formas micrópteras. Lygaeoidea es un grupo cosmopolita, aunque varios taxones son especialmente diversos en el neotrópico (Schuh y Slater 1995). Presenta una gran variación morfológica, aunque en general, los menos derivados comparten una escasa venación en la membrana de los hemiélitros (5 venas o menos), profémures ensanchados y presencia de almohadillas tricobotriales (Henry 1997a). Para propósitos de este artículo se sigue la propuesta de clasificación de Lygaeoidea según Henry (1997a).

En Colombia es poco lo que se conoce sobre Lygaeoidea. La mayoría de los registros para el país se han realizado con ejemplares de museos extranjeros, los cuales provenían de muestreos esporádicos. En contraste, los especímenes de las colecciones en Colombia no están determinados a un nivel

superior a familia a pesar que estas muestras son representativas de la fauna local, ya que han sido acumuladas continuamente. Es necesario recalcar que las colecciones biológicas proveen importante información pues, como se han formado a lo largo de grandes periodos de tiempo, brindan una perspectiva histórica de la diversidad y distribución de varios taxones. Además, el material que contienen sirve como referencia para trabajos posteriores en los que es necesario una buena resolución taxonómica (Ponder *et al.* 2001).

Así mismo, realizar un inventario de la biodiversidad constituye uno de los principales retos para la conservación, pues la información generada por la taxonomía y la sistemática es básica para dar un manejo adecuado a los recursos naturales (McNeely 2006). En el caso de Colombia, que es calificado como un país megadiverso, todos los intentos de conocer esta alta diversidad son deseables, especialmente en grupos tan pobremente conocidos como los insectos (Campos y Fernández 2002). Esto es de necesaria consideración especialmente en áreas en donde la pérdida acelerada del hábitat natural es un factor común (Chaves y Santamaría 2006). Sin embargo, para evaluar el estado de dichas áreas es necesario tener como referente los inventarios de las zonas que se encuentran bajo categorías de protección como los Parques Nacionales Naturales (PNNs). Gracias a los esfuerzos de colecta entomológica realizados en PNNs de Colombia por el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAVH) y la Unidad Administrativa Especial de Parques Nacionales Naturales (UAESPNN) a través

¹ Bióloga con énfasis en entomología. Joven Investigador de COLCIENCIAS. Grupo de Investigaciones Entomológicas, Universidad del Valle, Carrera 100 Calle 13, Cali, Valle, Colombia. Correo electrónico: larecorr@gmail.com. Autora para correspondencia. ² Ph. D. Grupo de Investigaciones Entomológicas, Universidad del Valle, Carrera 100 Calle 13, Cali, Valle, Colombia.

del proyecto “Insectos de Colombia” (Campos y Fernández 2002) material entomológico de gran calidad está disponible para investigaciones taxonómicas.

Este trabajo presenta una lista de los Lygaeoidea de Parques Naturales de Colombia, exceptuando los de la familia Rhyparochromidae, que ya han sido estudiados (Rengifo-Correa y González 2011a, b; 2012). Así mismo, se proveen diagnosis y fotografías para los géneros encontrados en Parques y se mencionan los sitios de colecta. De esta manera se amplía el conocimiento de este taxón en Colombia.

Materiales y Métodos

El material registrado pertenece a las siguientes colecciones: IAvH - Instituto Alexander von Humboldt; Villa de Leiva, Boyacá; ICN - Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá; MUSENUV - Museo de Entomología de la Universidad del Valle, Santiago de Cali, Valle del Cauca. Los ejemplares del IAvH provienen del proyecto “Diversidad de Insectos de Colombia”, en el que miembros del IAvH y la Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales (UAESPNN) realizaron colectas usando trampas malaise en los años 2000 al 2004 (Campos y Fernández 2002). Entre todos los especímenes colectados, los autores separaron y curaron los Lygaeoidea. De otro lado, el MUSENUV posee principalmente ejemplares que provienen del suroccidente colombiano. Todo el material se procesó e identificó en el laboratorio del Grupo de Investigaciones Entomológicas (GIE) de la Universidad del Valle. Las observaciones de estructuras de animales completos o de preparaciones se realizaron con un estereoscopio Nikon modelo SMZ645 con ocular 20X y un microscopio compuesto Nikon modelo ECLIPSE E200. Las fotografías se realizaron con una cámara marca CASIO modelo Exilim EX-G1 y NIKON Coolpix 4500 al estereoscopio. Para la determinación de los especímenes se utilizaron algunas descripciones de géneros, trabajos monográficos y las claves de Distant (1882 -1883), Slater (1955, 1979), Ashlock (1967), Slater y Brailovsky (1983, 1986), Slater A. (1992) y Henry (1997b, 2006).

Resultados y Discusión

Se revisaron 795 ejemplares de Lygaeoidea distribuidos en seis familias y 19 géneros. Para 15 de estos géneros todas las especies fueron identificadas (total: 19). No se pudo determinar a nivel de especie los ejemplares de *Neoninus*, *Ninyas*, *Nysius* y *Xyonysius*. Entre las muestras de PNNs revisadas se encontró el 18% (12) de las especies registradas para el país hasta el momento, esto es 68 especies (Tabla 1). A este listado se le adicionan siete nuevos registros más a nivel de especie y dos a nivel de género.

Los nuevos registros representan la ampliación de la distribución para *Craspeduchus xanthostaurus*, *Epipolops scudderii*, *Melanopleurus inflatus*, *Ochrostomus brasiliensis* y *Spilostethus pandurus* y se elimina el vacío en la distribución para *Jalysus reductus* y *Polychisme poecilus*. *Spilostethus pandurus* constituye una especie de distribución Paleotropical y su primer registro para el Neotrópico puede considerarse como una introducción. Así mismo, los géneros *Neoninus* y *Ninyas* se registran por primera vez para Colombia.

En el caso de *Toonglasia umbratus* y *Acroleucus nobilis*, quienes en la literatura primaria aparecen registrados para

Bogotá, es probable que la localidad de colecta no corresponda a la realidad sino a un referente que hacía alusión en el pasado al lugar desde el cual las muestras se enviaban a Europa (Forero 2006). Como los registros originales carecen de las elevaciones altitudinales, es difícil confirmar que no corresponden realmente a Bogotá y por tal motivo se conservó esta distribución en el manuscrito. En caso contrario, los registros aquí dados serían los primeros para los cuales se da por primera vez localidades específicas.

No se menciona la información de los hospederos para los registros debido a que las colectas fueron realizadas con trampas malaise. Sin embargo, es necesario resaltar que esta información es de gran importancia y debe ser considerada en colectas futuras, pues existe una asociación muy estrecha entre las especies de Lygaeoidea y sus hospederos vegetales.

Familia: BERYTIDAE

Género: *Jalysus* Stål, 1862

Diagnosis: Cuerpo alargado y delgado. Longitud combinada del fémur y la tibia de cada pata mayor a la longitud del cuerpo. Proceso del ostiolo con forma de espina (Henry 1997b).

Comentarios: Con especies de amplia distribución en el Neotrópico. Se colectaron en PNNs las dos especies que han sido registradas previamente para Colombia y se obtiene el primer registro para *J. reductus*. Estos se encontraron en los departamentos de Bolívar, Magdalena, Putumayo y Tolima. *J. macer* y *J. sobrinus* se registraron hasta una elevación máxima de 1508m.s.n.m, mientras que *J. reductus* se presenta entre los 30 y 180m.s.n.m.

Especie: *J. macer* (Stål, 1859)

Distribución conocida: Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Estados Unidos, Guatemala, Guayana, Honduras, Jamaica, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú (Henry y Froeschner 1998).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Amazonas.** 1 H. Araracuara. 21-jul-1977. R. Restrepo. [ICN]. Det: D. Forero. **Boyacá.** 1 M. Moniquira. La Cumbre. 3-ene-1978. I de Arvalo. [ICN]. Det: D. Forero. **Magdalena.** 1 M. PNN Tayrona. Cerro San Lucas. 11°19'N 73°59'W. 550m.s.n.m. 11-16-ene-2003. C. Sarmiento. [IAvH]. **Tolima.** 3 M. Fresno. Vereda. Colombia. Finca Las Perlas. 5°12'N 75°2'W. 1508m.s.n.m. 23-26-dic-2002. Arias, T.; Arias, D.; Arias, S. [IAvH]. **Santander.** 1 M. Charalá. Bogotacito. 27-nov-1978. I de Arvalo. [ICN]. Det: D. Forero.

Especie: *J. reductus* Barber, 1939

Distribución conocida: Antillas Holandesas, Bahamas, Bolivia, Brasil, Cuba, Estados Unidos (Arizona), El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, México, Panamá, Perú, Puerto Rico, República Dominicana, Tobago, Trinidad, Venezuela (Henry y Froeschner 1998)

Ejemplares examinados: Nuevo Registro. COLOMBIA. **Boyacá.** 1 H. Villa de Leiva. Quebrada La Colorada, área urbana. 5°38'N 73°31'W. 2200m.s.n.m. 24-sep-1998. Forero, D. [IAvH]. Det: D. Forero. **Bolívar.** 1 H. SFF Los Colorados. Villa Roca. 9°54'N 75°07'W. 180m.s.n.m. 6-21-dic-2001. Deulufeut, E. [IAvH]. **Magdalena.** 1 M. PNN Tayrona. Palangana. 11°20'N 74°02'W. 30m.s.n.m. 29-sep-18-oct-2001. Henríquez, R. [IAvH]. **Cundinamarca.** 1 M. San Antonio del Tequendama. Santandercito. 04°36,1'N 74°20,7'W. 1750m.s.n.m. 24-mar-2000. Forero, D. [ICN]. Det: D. Forero.

Especie: *J. sobrinus* Stål, 1862

Distribución conocida: Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Jamaica, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Trinidad, Uruguay, Venezuela (Henry y Froeschner 1998).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Boyacá.** 1H. Duitama. El Carmen. 3450 m.s.n.m. 30-oct-1978. I de Arévalo. [ICN]. Det: D. Forero. **Cundinamarca.** 1M. Cachipay. 10-may-1970. [ICN]. Det: D. Forero. **Magdalena.** 1M. 1H. Santa María. Corregimiento de Minca. 480m.s.n.m. 9-abri-1977. Peña, Yepes, Aponte. [ICN]. Det: D. Forero. **Meta.** 1M. Aca-cias. 9-dic-1970. E. Soler. [ICN]. Det: D. Forero. **Putumayo.** 2 M. PNN La Paya. Bocana. Mamansoya. 0°6'S 74°58'W. 330m.s.n.m. 23-sep-2001. Campos, D. [IAVH]. **Tolima.** 46 M. 9 H. Fresno. Vereda. Colombia. Finca Las Perlas. 5°12'N 75°2'W. 1508 m.s.n.m. 23-26-dic-2002. Arias, T.; Arias, D.; Arias, S. [IAVH].

Género: *Parajalysus* Distant, 1881

Diagnosis: Pronoto con cuatro espinas largas y delgadas, una central en el lóbulo anterior y las restantes en el lóbulo posterior, una en el centro y a las otras dos en cada ángulo húmero. Área evaporatoria de la glándula de olor reducida, con forma de panal; ostiolo sin proceso, canal o espina (Henry 1997b).

Comentarios: *Parajalysus* comprende doce especies, lo que lo convierte en el género de mayor riqueza entre los Berytidae del Nuevo Mundo (Henry 1997b). Hay dos especies registradas para este género en Colombia, siendo *P. andinus* una de ellas (Tabla 1). *Parajalysus andinus* es común sobre el cacao (*Theobroma cacao*) pues es uno de sus principales polinizadores (Henry 1997b).

Especie: *P. andinus* Horvath, 1905

Distribución conocida: Bolivia, Brasil, Colombia, Perú y Venezuela (Henry y Froeschner 1998).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Amazonas.** 2M, 5 H. PNN Amacayacu. Vía Palmeras, bosque Várzea, borde. 1-sep-1997. D.Campos-F.Fernández. [IAVH]. Det: D. Forero.

Familia: BLISSIDAE

Género: *Toonglasa* Distant, 1893

Diagnosis: Se reconoce con base en los genitales y otros caracteres de ejemplares machos. Generalmente tienen un par de proyecciones con forma de espinas a cada lado del conexivo VII. Esternitos del abdomen V – VII con una serie de tubérculos espiniformes (como en el caso de *T. umbratus*). Aurícula de la glándula de olor metatorácica curvada anteriormente, estrecha y alargada. Fémures de las patas anteriores con una espina distal (Slater 1979, Slater y Brailovsky 1983).

Comentarios: Hay dos especies registradas para este género en Colombia (Tabla 1). Para lograr un inventario exhaustivo del grupo se necesitan colectas enfocadas a microhábitats especiales debido al grado de especialización en sus hábitos (fitófagos y lamináfilos). *Toonglasa umbratus* es de amplia distribución (Norteamérica hasta el norte de Suramérica) y presenta una variación morfológica considerable que aparentemente tiene una significancia geográfica (Slater y Brailovsky 1983).

Especie: *T. umbratus* (Distant, 1893)

Distribución conocida: Brasil, Colombia ("Bogotá"), Cos-

ta Rica, Estados Unidos, Honduras, México, Panamá (Slater 1979, Slater y Brailovsky 1983).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Valle del Cauca.** 2 M. Dapa. 03°33'0.5" N 76°32'56" W. 1520 m.s.n.m. 16-oct-2010. Rengifo-Correa, L. [MUSENUV].

Familia: GEOCORIDAE

Subfamilia: PAMPHANTINAE

Género: *Epipolops* Herrich-Schaeffer, 1850

Diagnosis: Cabeza con ojos sobre largos pedúnculos que se extienden más allá de los márgenes del pronoto. Generalmente, cuerpo cubierto de setas modificadas, pronoto presenta espinas y procesos laterales. Hemélitros traslúcidos a opacos, usualmente con proceso con forma de espina sobre el tercio basal del margen lateral (Henry 2006).

Comentarios: Las 14 especies conocidas para el género son de distribución neotropical (Henry 2006). De estas sólo dos se han registrado previamente para Colombia: *E. quadrispinus* y *E. oculuscancrini*, mientras que *E. scudderi*, es reportada por primera vez para el país. Los ejemplares provienen del Valle del Cauca en una de elevación de 671m.s.n.m (*E. scudderi*) y 990-1150m.s.n.m (*E. oculuscancrini*).

Especie: *E. oculuscancrini* (DeGeer, 1773)

Distribución conocida: Brasil, Colombia (Cundinamarca), Costa Rica, Guatemala, Guayana, México, Panamá, Surinam (Slater 1964, Henry 2006).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Valle del Cauca.** 2 M. Cali. La Buitrera. 03°22'19,8"N 76°34'12,2"W. 1150m.s.n.m. 7-jun-2010. González, R. [MUSENUV]. 1 M. Cali. Universidad del Valle. 03°22'N 76°32'W. 990m.s.n.m. 3-nov-2010. González, R. [MUSENUV]. 1M. Mismos datos excepto 6-sep-2010. Arcila, L.

Especie: *E. scudderi* Henry, 2006

Distribución conocida: Panamá (Henry, 2006).

Ejemplares examinados: Nuevo registro. COLOMBIA. **Valle del Cauca.** 1M. Dagua. 03°32'10,0"W 76°52'24,7"W. 671m.s.n.m. 11-sep-2010. González, R.; Duque, D. [MUSENUV].

Subfamilia: GEOCORINAE

Género: *Ninyas* Distant, 1882

Diagnosis: Ojos grandes, dirigidos hacia atrás, sobre pedúnculos. Margen lateral del corio expandido, ancho del ápice mayor al ancho de la base. Membrana larga, sobrepasa considerablemente el ápice del abdomen (Distant 1882-1883).

Comentarios: El género no se había registrado para el país. Se reconocen las siguientes especies: *N. deficiens*, *N. distanti*, *N. humeralis*, *N. solubilis*, *N. strabo* y *N. torvus* (Slater 1964). Este género no ha sido revisado y debido a ello no fue posible en este trabajo la determinación a especie.

Ejemplares examinados: Nuevo Registro. *Ninyas* sp. COLOMBIA. **Valle del Cauca.** 5M. 1H. Cali. La Buitrera. 03°22'19,8"N 76°34'12,2"W. 1150m.s.n.m. 7-jun-2010. González, R. [MUSENUV]. 3M. 1H. Misma información, excepto 23-29-may-2010. 2H. Misma información, excepto 14-sep-2010. 8M. 5H. Dapa. 03°33'0,5"N 76°32'56"W. 1520m.s.n.m. 16-oct-2010. González, R. [MUSENUV]. 1 H. Tuluá. Mateguadua. Jardín Botánico Juan Maria Cespedes. 04°01'N 76°09'W. 1200 m.s.n.m. 21-ago-2010. González, R. [MUSENUV].

Familia: LYGAEIDAE

Subfamilia: LYGAEINAE

Género: *Acroleucus* Stål, 1874

Diagnosis: Membrana del hemélitro café oscura a negra con margen apical hialino; callo del lóbulo anterior del pronoto interrumpido por una carena medial. Ojos distintivamente separados del margen del lóbulo anterior del pronoto, aparentando ser protuberantes. Impresiones del callo no ramificadas. Abdomen sin cicatrices anterolaterales. Longitud: 5,0-14,0mm (Slater 1992).

Comentarios: Es el género de Lygaeoidea de mayor riqueza para el país, con 13 especies (Tabla 1); estas representan el 31% de la totalidad de *Acroleucus* (42 especies). Entre las plantas hospederas se encuentran algunas Solanaceae, Convolvulaceae, Theaceae y Bromeliaceae (Brailovsky y Cervantes 2008). Aquí se menciona el Valle del Cauca como una nueva localidad para *A. nobilis*.

Especie: *A. nobilis* Stål, 1874

Distribución conocida: Bolivia, Colombia ("Bogotá") (Stål 1874, Slater 1964).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Valle del Cauca.** 1M. Chicoral. 1890 m.s.n.m. 2-nov-2005. Montoya, M. [MUSENUV]

Género: *Craspeduchus* Stål, 1874

Diagnosis: Impresión postcallo interrumpida por una línea medial. Lóbulo anterior del pronoto claro u oscuro excepto un margen estrecho. Línea medial clara alcanza el margen anterior. Venas del clavo del mismo color de corio. Impresiones del callo ramificadas. Abdomen sin cicatrices anterolaterales. Longitud: 7,0-9,5mm (Slater 1992).

Comentarios: Según Slater (1992), las estructuras externas de las especies de *Craspeduchus* y *Ochrostomus* son muy similares, por lo que sólo se diferencian con base en la coloración y en los genitales. Es un género de distribución neotropical. *Craspeduchus xanthostaurus* se adiciona a las tres especies registradas para Colombia.

Especie: *C. xanthostaurus* (Herrich-Schaeffer, 1847)

Distribución conocida: Brasil, Guyana Francesa (Slater 1964).

Ejemplares examinados: **Nuevo registro.** COLOMBIA. **Valle del Cauca.** 1M. Yotoco. 03°52'59"N 76°25'52". 1538m.s.n.m. 6-nov-2010. Mendivil J. [MUSENUV].

Género: *Melanopleurus* Stål, 1874

Diagnosis: Pronoto oscuro con excepción de los ángulos humerales, que algunas veces pueden ser rojos. Callo con impresiones no ramificadas o con ramas vestigiales. Abdomen sin cicatrices anterolaterales. Longitud: 4,0-10,0 mm (Slater 1992).

Comentarios: En este género se reconocen 19 especies, presentando la mayoría un alto endemismo (Slater 1992). Entre las de amplia distribución, se encuentra la única especie registrada hasta el momento para Colombia (*M. bitriangularis*). Con el registro de *M. inflatus* en Colombia se extiende ampliamente su distribución, que previamente se consideraba restringida a México.

Especie: *M. inflatus* Brailovsky, 1979

Distribución conocida: México (Slater y O'Donnell 1995).

Ejemplares examinados: **Nuevo registro.** COLOMBIA.

Valle del Cauca. 1M. Tuluá. Mateguadua. Jardín Botánico Juan Maria Cespedes. 04°01'N 76°09'W. 1200 m.s.n.m. 25-mar-1999. Tigreros, N. [MUSENUV]

Género: *Neacoryphus* Scudder, 1965

Diagnosis: Clavo pálido con contrastantes venas negras. Impresiones del callo no ramificadas. Abdomen sin cicatrices anterolaterales. Longitud: 7,0-9,0mm (Slater 1992).

Comentarios: Posterior al trabajo de Slater (1992) sólo dos especies son incluidas en el género. De estas *N. bicrusis* es la que tiene la distribución más amplia.

Especie: *N. bicrusis* (Say, 1825)

Distribución conocida: Brasil, Colombia, Estados Unidos, Guayana, Honduras Británica, México, Nicaragua, Venezuela (Slater 1964).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Tolima.** 1H. Fresno. Vereda Colombia. Finca Las Perlas. 05°12'N 75°02'W. 1508m.s.n.m. 23-26-dic-2002. Arias, T.; Arias, D.; Arias, S. [IAvH].

Género: *Ochrimnus* Stål, 1874

Diagnosis: Lóbulo anterior del pronoto con cuatro surcos transversales detrás del callo, separados por dos carenas postcallo longitudinales. Impresiones del callo ramificadas. Abdomen sin cicatrices anterolaterales. Longitud: 4,0-9,0mm (Slater 1992).

Comentarios: Sus especies se presentan desde el sur de Estados Unidos hasta el centro de Argentina (Slater 1992). Dos especies para Colombia (Tabla 1), una de las cuales corresponde a la que se encontró en PNNs.

Especie: *O. disseptus* (Stål, 1874)

Distribución conocida: Colombia, Panamá (Slater 1992)

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Magdalena.** 1H. PNN Sierra Nevada de Santa Marta. El Ramo. 10°48'N 73°39'W. 2500m.s.n.m. 22-nov-15-dic-2000. Cantillo, J. [IAvH]. 1M. Mismos datos, excepto 27-feb-14-mar-2001.

Género: *Ochrostomus* Stål, 1874

Diagnosis: Impresión postcallo no interrumpida por una línea medial. Lóbulo anterior del pronoto oscuro excepto un margen grueso. Línea medial clara, si presente, no alcanza el margen anterior. Venas del clavo del mismo color de corio. Impresiones del callo ramificadas. Abdomen sin cicatrices anterolaterales. Longitud: 7,0-8,5mm (Slater 1992).

Comentarios: Con especies de distribución neotropical restringida. Aquí se amplía la distribución para una de ellas: *O. brasiliensis*, en Magdalena a 30m.s.n.m. Esta se agrega a las otras cuatro especies registradas en Colombia (Tabla 1).

Especie: *O. brasiliensis* Brailovsky, 1979

Distribución conocida: Brasil (Slater & O'Donnell 1995).

Ejemplares examinados: **Nuevo registro.** COLOMBIA. **Magdalena.** 1 M. PNN Tayrona. Palangana. 11°20'N 74°02'W. 30 m.s.n.m. 21-mar-5-abril-2001. Henríquez, R. [IAvH].

Género: *Oncopeltus* Stål, 1868

Diagnosis: Superficie del escutelo globosa, sin carena longitudinal en forma de cruz. Margen del lóbulo posterior del pronoto sinuosa, ligeramente cóncavo medialmente, convexo y fuertemente protuberante a cada lado del escutelo. Impre-

Tabla 1. Lygaeoidea registrados para Colombia. Ber: Berytidae; Bli: Blissidae; Geo: Geocoridae; Lyg: Lygaeidae; Nin: Niniidae; Pch: Pachygronthidae.

Familia	Género/Especie	Fuente
Ber	<i>Gampsocoris decorus</i>	Henry y Froeschner (1998)
Ber	<i>Jalysus macer</i>	Henry y Froeschner (1998)
Ber	<i>Jalysus reductus</i>	Nuevo registro
Ber	<i>Jalysus sobrinus</i>	Henry y Froeschner (1998)
Ber	<i>Metacanthus multispinus</i>	Henry y Froeschner (1998)
Ber	<i>Metacanthus tenellus</i>	Henry y Froeschner (1998)
Ber	<i>Parajalysus andinus</i>	Henry y Froeschner (1998)
Ber	<i>Parajalysus spinosus</i>	Henry y Froeschner (1998)
Ber	<i>Pronotacantha depressa</i>	Henry y Froeschner (1998)
Bli	<i>Blissus insularis</i>	ICA (1989)
Bli	<i>Blissus leucopterus</i>	ICA (1989)
Bli	<i>Blissus pulchellus</i>	ICA (1989)
Bli	<i>Howdenoblissus slateri</i>	Stys (1991) ²
Bli	<i>Ischnodemus nigripes</i>	Stål (1874) ¹
Bli	<i>Ischnodemus variegatus</i>	Stål (1874) ¹
Bli	<i>Patritius alternatus</i>	Slater y Wilcox (1966) ²
Bli	<i>Patritius colombianus</i>	Slater y Wilcox (1966) ²
Bli	<i>Reticulatodemus orbiculoides</i>	Slater y Wilcox (1966) ²
Bli	<i>Toonglasia collaris</i>	Dohrn (1859) ^{1,2}
Bli	<i>Toonglasia umbratus</i>	Slater y Brailovsky (1983)
Geo	<i>Epipolops oculuscancri</i>	Henry (2006)
Geo	<i>Epipolops quadrispinus</i>	Stål (1874) ¹
Geo	<i>Epipolops scudderi</i>	Nuevo registro
Geo	<i>Geocoris flavilineus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹ , Torre-Bueno (1946) ¹
Geo	<i>Geocoris ochraceus</i>	Fieber (1861) ¹ , Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Geo	<i>Geocoris punctipes</i>	Montandon (1908) ¹
Geo	<i>Ninyas</i> sp.	Nuevo registro
Lyg	<i>Acroleucus argutus</i>	Brailovsky (1980) ²
Lyg	<i>Acroleucus daedalus</i>	Brailovsky (1980) ²
Lyg	<i>Acroleucus diaphanus</i>	Brailovsky (1984) ²
Lyg	<i>Acroleucus dollingi</i>	Brailovsky (1980) ²
Lyg	<i>Acroleucus flavoseptus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Acroleucus haemopterus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Acroleucus marinoi</i>	Brailovsky (1980) ²
Lyg	<i>Acroleucus neomaurus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹ , Torre-Bueno (1914) ¹
Lyg	<i>Acroleucus nigellus</i>	Distant (1893) ¹
Lyg	<i>Acroleucus nigrovittatus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Acroleucus nobilis</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Acroleucus signaticollis</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Acroleucus vittaticeps</i>	Stål (1874) ¹ , Distant (1893) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Biblochrimnus subcarinatus</i>	Stål (1874) ^{1,2} , Lethierry y Severin (1894) ^{1,2}
Lyg	<i>Craspeduchus attrahens</i>	Brailovsky y Barrera (1984) ²
Lyg	<i>Craspeduchus circumceptus</i>	Stål (1867) ¹ , Walker (1872) ¹ , Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Craspeduchus nigrolimbatus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Craspeduchus xanthostaurus</i>	Nuevo registro
Lyg	<i>Dalmochrimnus ayalai</i>	Brailovsky (1984) ²

(Continuación Tabla 1)

Familia	Género/Especie	Fuente
Lyg	<i>Latochrimnus aduncus</i>	Brailovsky (1982) ²
Lyg	<i>Lygaeus ashlocki</i>	Brailovsky (1978) ²
Lyg	<i>Lygaeus inaequalis</i>	Walker (1872) ¹ , Stål (1874) ¹
Lyg	<i>Lygaeus turcicus</i>	Dallas (1852) ¹ , Walker (1872) ¹
Lyg	<i>Melanopleurus bitriangularis</i>	Dallas (1852) ¹ , Stål (1874) ¹ , Distant (1882) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Melanopleurus inflatus</i>	Nuevo registro
Lyg	<i>Neacoryphus bicrusis</i>	Distant (1882) ¹
Lyg	<i>Ochrimnus disseptus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Ochrimnus sceptrum</i>	Brailovsky (1982) ²
Lyg	<i>Ochrostomus brasiliensis</i>	Nuevo registro
Lyg	<i>Ochrostomus neomodestus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Ochrostomus neotropicalis</i>	Stål (1874) ¹ , Distant (1882) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Ochrostomus obsoletus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Ochrostomus subcarinatus</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Oncopeltus aulicus</i>	Stål (1874) ¹
Lyg	<i>Oncopeltus cingulifer</i>	Stål (1874) ¹ , Distant (1882) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹ , Torre-Bueno (1946) ¹
Lyg	<i>Oncopeltus faciatus</i>	Dallas (1852) ¹ , Stål (1874) ¹ , Distant (1882) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Oncopeltus femoralis</i>	Dohrn (1859) ¹ , Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Oncopeltus varicolor</i>	Dallas (1852) ¹ , Walker (1872) ¹ , Stål (1874) ¹ , Distant (1882) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹ , Torre-Bueno (1946) ¹
Lyg	<i>Spilostethus pandurus</i>	Nuevo registro
Lyg	<i>Coleonyxius dimorphus</i>	Ashlock (1967) ²
Lyg	<i>Neortholomus jamaisensis</i>	Uhler (1894) ^{1,2}
Lyg	<i>Nysius nubilus</i>	Dallas (1852) ¹ , Dohrn (1859) ¹ , Walker (1872) ¹ , Stål (1874) ¹ , Distant (1893) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Lyg	<i>Xyonyxius basalis</i>	Lethierry y Severin (1894) ¹ , Barber (1947) ¹
Lyg	<i>Polychisme ferruginosus</i>	Slater y Brailovsky (1986) ¹
Lyg	<i>Polychisme poecilus</i>	Nuevo registro
Nin	<i>Neoninus sp.</i>	Nuevo registro
Pch	<i>Oedancala notata</i>	Stål (1874) ¹ , Lethierry y Severin (1894) ¹
Pch	<i>Pachygrontha longiceps</i>	Stål (1874) ¹ , Distant (1893) ¹ , Torre-Bueno (1946) ¹ , Barber (1947) ¹

Citado en ¹Slater (1964), ²Slater y O'Donnell (1995).

siones del callo no ramificadas. Abdomen con cicatrices con forma de coma entre los esternitos III al VI. Longitud: 8,0–16,0mm (Slater 1992).

Comentarios: Este género es uno de los mejor estudiados entre los Lygaeoidea, sobresaliendo *O. faciatus* como especie modelo para estudios de biología y bioquímica (Schuh y Slater 1995). Para *O. cingulifer* se ha realizado en el Valle del Cauca estudios sobre su biología (Root y Chaplin 1976). Hay cinco especies de este género en Colombia (Tabla 1).

Especie: *O. cingulifer* Stål, 1874

Distribución conocida: Colombia, Costa Rica, Cuba, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, República Dominicana, Venezuela (Slater 1964).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. Valle del Cauca. 1M. Buenaventura. Bajo Anchicayá. 555m.s.n.m. 03°32'N 76°52'W. 26-ago-1994. Olaya, L. A. [MUSENUV].

Género: *Spilostethus* (Stål, 1868)

Diagnosis: Pronoto con dos surcos longitudinales anchos y de color oscuro. Mácula a través del margen costal. Abdomen con cicatrices con forma de coma entre los esternitos III al VII. Longitud: 13,0-15mm.

Comentarios: *Spilostethus* es un género del viejo mundo con 24 especies descritas, de las cuales 18 se encuentran en Etiopía (Sweet 2000). *Spilostethus pandurus* es considerada una especie de importancia económica ya que puede causar daños en cultivos de algodón de seda, *Calitropis gigantea*, (Asclepidaceae = Apocynaceae) y girasol, *Helianthus annuus* (Compositae) principalmente, aunque también otros como ajonjolí, sorgo, maní, alfalfa, caña de azúcar, uva, cítricos y garbanzos. Esta especie participa como vector mecánico de hongos fitopatógenos (Sweet 2000).

Considerando su distribución, el registro de *S. pandurus* corresponde al primero para la región Neotropical y su presencia en Colombia constituye una introducción.

Especie: *S. pandurus* (Scopoli, 1763)

Distribución conocida: Albania, Alemania, Algeria, Austria, Bulgaria, "Checoslovaquia", China, Crimea, Cyprus, España, Francia, Grecia, Hungría, India, Italia, Malta, Rusia, Suiza, Sudáfrica, Yugoslavia (Slater 1964).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Magdalena.** 1H. PNN Tayrona. Palangana. 11°20'N 74°02'W. 30m.s.n.m. 21-mar-5-abril-2001. Henríquez, R. [IAvH].

Subfamilia: ISCHNORHYNCHINAE

Género: *Polychisme* Kirkaldy, 1904

Diagnosis: Espiráculos del esternito abdominal II en posición dorsal, en la membrana entre el tergo y el esterno, espiráculos III al VII en posición ventral, en el margen de los esternitos abdominales. Alas posteriores con hamus. Borde lateral del pronoto expandido. Cuerpo cubierto con puntos profundos y abundantes. Collar amplio, conectado con el lóbulo posterior del pronoto por un puente de puntos, que a su vez separan el callo. Sin carina sobre el pronoto. Clavo amplio con cuatro filas de puntos. Fémures de las patas anteriores sin espinas (Slater y Brailovsky 1986).

Comentarios: Se colectaron en PNNs las dos especies conocidas para el género: *P. poecilus*, de amplia distribución en el Neotrópico y cuyo registro en Colombia es el primero confirmado, y *P. ferruginosus*, que es una especie endémica de Colombia y Venezuela. Estos se encontraron en los departamentos de Bolívar, Cundinamarca y Magdalena. *P. ferruginosus* se registró entre los 2220 y 3560m.s.n.m, mientras que *P. poecilus* se encontró a los 2990m.s.n.m.

Especie: *P. ferruginosus* Slater y Brailovsky, 1986

Distribución conocida: Colombia (Cundinamarca, Norte de Santander), Venezuela (Slater y Brailovsky 1986).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Cundinamarca.** 1M. PNN Chingaza. La Siberia. 4°31'N 73°45'W. 2990m.s.n.m. 30-mar-13-abr-2001. Ragioso, E. [IAvH]. 1 M. Misma información, excepto 14-31-may-2001. 1M. 1H. Misma información, excepto 31-may-15-jun-2001. 3H. 4M. Misma información, excepto 10-24-ago-2001. 2 M. 2 H. PNN Sumapaz. Bocatoma. Cerro el zapato. 4°14'N 74°12'W. 3560m.s.n.m. 2-ene-17-ene-2003. Patiño, A. [IAvH]. 3M. 1H. Misma información, excepto 18-nov-4-dic-2002. **Boyacá.** 1 M. 1 H. SFF Iguaque. Cabaña Mamarramos. 5°25'N 73°27'W. 2855m.s.n.m. 6-23-may-2000. Reina, P. [IAvH]. 3M. 1H. Misma información, excepto 21-ene-9-feb-2001. **Magdalena.** 1H. PNN Sierra Nevada de Santa Marta. La Estación. 10°48'N 73°39'W. 2220m.s.n.m. 15-31-ago-2000. Cantillo, J.

Especie: *P. poecilus* Spinola, 1852

Distribución conocida: Argentina, Bolivia, Chile, Costa Rica (Cervantes-Peredo y Brailovsky 2010).

Ejemplares examinados: Nuevo registro. COLOMBIA. **Cundinamarca.** 2 M. PNN Chingaza. Charrascales. 4°31'N 73°45'W. 2990m.s.n.m. 16-26-abr-2001. Cinfuentes, L. [IAvH]. 1H. Misma información excepto 4-18-oct-2001. 3H. Misma información excepto 11-ene-8-feb-2002. Ragioso, E.

Subfamilia: ORSILLINAE

Género: *Nysius* Dallas, 1852

Diagnosis: Sin áreas estriadas en el corio o el abdomen. Bucula sin puntos. Margen costal recto. Fémures de las patas an-

teriores sin espinas. Alas cubren completamente el abdomen, sin conexivo expuesto (Ashlock 1967).

Comentarios: Este género comprende casi la mitad de las especies de Orsillinae (alrededor de 130 especies) y es de distribución cosmopolita (Ashlock 1967). Barber (1947) proporcióna una clave para determinar algunas de las especies del hemisferio occidental. Para Colombia se ha registrado *N. nubilus* (Tabla 1). Los ejemplares examinados no fueron determinados hasta especie debido a que el género es diverso y su taxonomía es compleja, por lo que se requiere una mayor experiencia de trabajo con el grupo para tener certeza en las determinaciones.

Ejemplares examinados: *Nysius* spp. COLOMBIA. **Boyacá.** 101M. 213H. SFF Iguaque. Cabaña Chaina. 5°25'N 73°27'W. 2600m.s.n.m. 1-16-dic-2001. Roberto, A. [IAvH]. 127M. 139 H. Mismos datos, excepto 16-nov-1-dic-2001. Reina, P. 17 M. 20 H. Mismos datos, excepto 25-oct-16-nov-2001. **Cundinamarca.** 6 M. 11H. PNN Sumapaz. Bocatoma. Cerro el zapato. 4°14'N 74°12'W. 3560m.s.n.m. 18-nov-4-dic-2002. Patiño, A. [IAvH]. 1 H. PNN Chingaza. La Siberia. 4°31'N 73°45'W. 3170m.s.n.m. 30-mar-13-abr-2001. Ragioso, E. [IAvH]. **Chocó.** 1 M. PNN Los Katíos. Centro Administrativo Sautatá. Fuera del Bosque. 7°51'N 77°8'W. 30m.s.n.m. 13-jun-2003. López, P. [IAvH].

Género: *Xyonysius* Ashlock y Lattin, 1963

Diagnosis: Borde lateral del corio estriado (stridilium). Abdomen con margen lateral estriado, mucho más fino que el del corio, se extiende desde la mitad del esternito II hasta la mitad del VII. Bucula sin puntos. Margen costal expandido desde la base. Fémures de las patas anteriores sin espinas. Alas cubren completamente el abdomen, sin conexivo expuesto (Ashlock 1967).

Comentarios: *Xyonysius* es el único género de la tribu Metargini con especies de amplia distribución en área continental: sólo dos géneros (*Balionysius* y *Coleonysius*) tienen una distribución continental restringida y los restantes son de áreas insulares (Ashlock 1967). Para Colombia se ha registrado *X. basalis* (Tabla 1). No fue posible determinar a especie los ejemplares de *Xyonysius* pues no existen claves para el género y la literatura acerca de sus especies se encuentra muy dispersa.

Ejemplares examinados: *Xyonysius* spp. COLOMBIA. **Boyacá.** 3 M. 2 H. SFF Iguaque. Cabaña Chaina. 5°25'N 73°27'W. 2600 msnm. 1-16-dic-2001. Roberto, A. [IAvH]. **Boyacá.** 1 M. SFF Iguaque. Quebrada Los Francos. 5°25'N 73°27'W. 2860msnm. 13-31-mar-2003. Reina, P. [IAvH]. **Magdalena.** 1 M. PNN Sierra Nevada de Santa Marta. Bella Vista. 10°48'N 73°39'W. 1500m.s.n.m. 15-jun-2-jul-2001. Cantillo, J. [IAvH].

Familia: NINIDAE

Género: *Neoninus* Distant 1882

Cuarto antenómero fuertemente engrosado, primer antenómero sobrepasa distintivamente el ápice de la cabeza, segundo y tercero subiguales en longitud y sobrepasan en longitud al cuarto. En contraste con *Ninus* la cabeza y el pronoto son más largos en *Neoninus* (Distant 1882-1883).

Comentarios: El género no se había registrado para el país. *Neoninus* incluye las siguientes especies: *N. argentinensis* (Argentina), *N. illustris* (Brasil, Granada, Guatemala, Islas

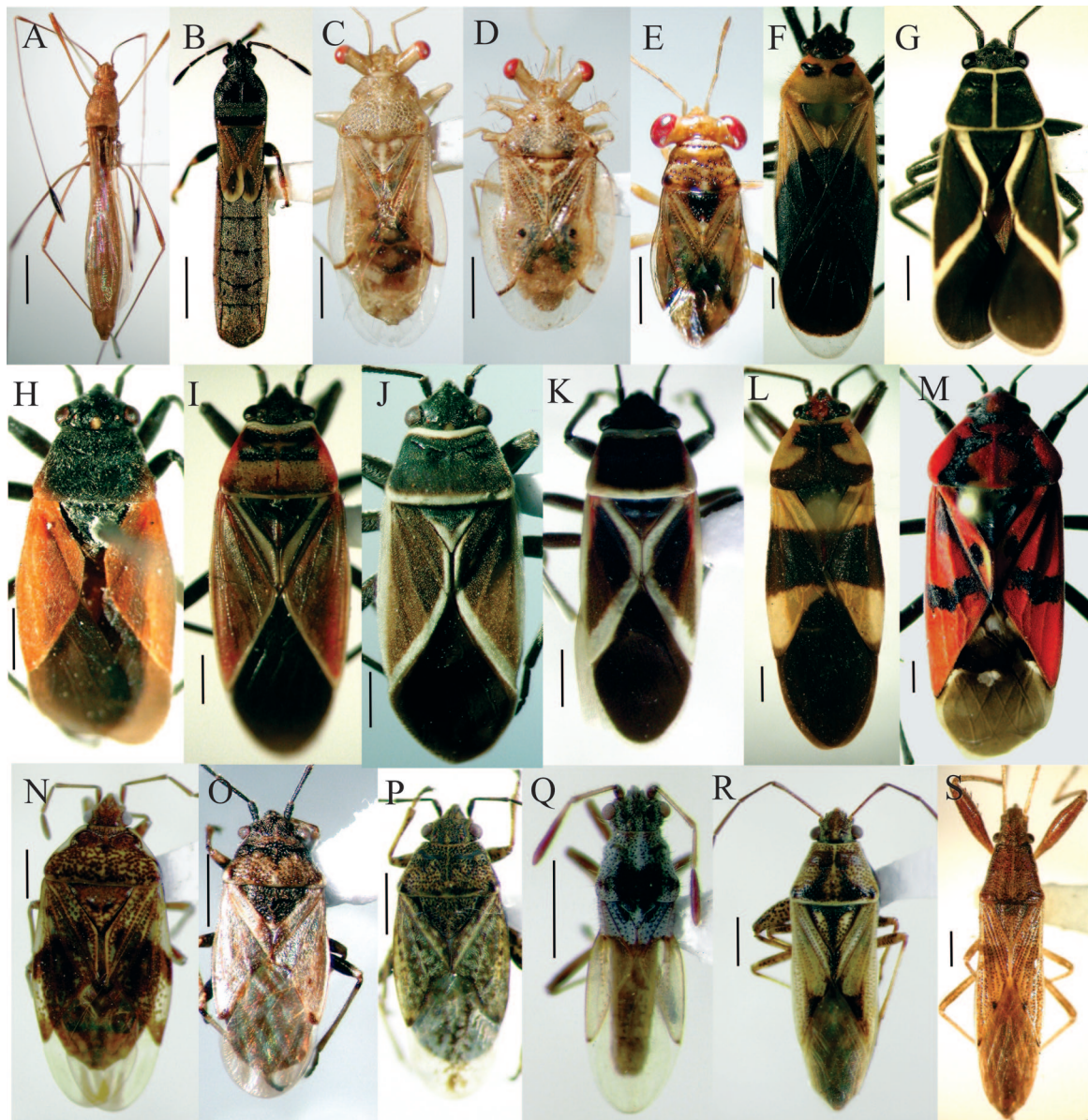


Figura 1. A. *Jalysus reductus* (Berytidae) B. *Toonglasa umbratus* (Blissidae) C.-E. Geocoridae. C. *Epipolops oculuscanri*. D. *E. scudderi*. E. *Ninyas* sp. F.-P. Lygaeidae. F. *Acroleuchus nobilis*. G. *Craspeduchus xanthostaurus*. H. *Melanopleus inflatus*. I. *Neacoryphus bicrusis*. J. *Ochrinnus disseptus* K. *Ochrostomus brasiliensis* L. *Oncopeltus cingulifer*. M. *Spilostethus pandurus*. N. *Polychisme poecilus*. O. *Nysius* sp. P. *Xyonyssius* sp. Q. *Neoninus* sp. (Ninidae) R.-S. Pachygronthidae R. *Oedancala notata* S. *Pachygrontha longiceps*. Escala de la barra: 1mm.

San Vicente, México, Panamá, Trinidad) y *N. montanellus* (Venezuela, Brasil) (Brailovsky 1989; Slater 1964; Slater y O'Donnell 1995). Las características para separar las especies de *Neoninus* (Brailovsky 1989) tienen un alto grado de detalle, por lo que en este trabajo se prefirió conservar el ejemplar hasta el nivel de género ante la dificultad de tener certeza en su determinación.

Ejemplares examinados: *Neoninus* sp. **Nuevo Registro.** 1M. COLOMBIA. **Putumayo.** PNN La Paya. Bocana. Mamansoya. 0°06'S 74°58'W. 330m.s.n.m. 21-sep-2001. Campos, D. [IAvH].

Familia: PACHYGRONTHIDAE

Género: *Oedancala* Amyot y Serville, 1843

Diagnosis: Ojos grandes y elípticos, usualmente tocando el margen anterior del pronoto, longitud del ojo mayor que la longitud preocular. Antenas usualmente más cortas que el cuerpo, primer se engrosa gradualmente hacia el ápice, cuarto antenómero casi tan largo como el II y el III (Slater 1955).

Comentarios: Con especies de amplia distribución en el Hemisferio Occidental. Se colectó en PNNs la única especie que ha sido registrada para Colombia. Esta se encontró en los departamentos de Magdalena, Meta, Putumayo, Vaupés y Vichada, hasta una elevación máxima de 460m.s.n.m.

Especie: *O. notata* Stål, 1874

Distribución conocida: Brasil, Colombia, Costa Rica, Guyana, Honduras, Nicaragua, Perú (Slater 1964).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Magdalena.** 1 H. PNN Tayrona. Cañaveral. 11°20'N 74°2'W. 30m.s.n.m. 22-30-ene-2001. Henríquez, R. [IAvH]. **Meta.** 1 M. PNN Sierra de La Macarena. Caño Curía. 03°21'N 73°56'W. 460m.s.n.m. 17-ene-9-feb-2003. Villalba, W. [IAvH]. **Putumayo.** 1 M. PNN La Paya. Bocana. Mamansoya. 0°6'S 74°58'W. 330m.s.n.m. 21-sep-2001. Campos, D. [IAvH]. 3 M. 4 H. Misma información, excepto 23-sep-2001. 1M. 1 H. Misma información, excepto 26-29-sep-2001. **Vaupés.** 1 M. Estación Biológica Mosiro-Itajura (Caparú). Centro Ambiental. 01°4'S 69°31'W. 60m.s.n.m. 20-ene-1-feb-2003. Sharkey, M.; Arias, D. [IAvH]. **Vichada.** 1 H. PNN El Tuparro. Pie Cerro Tomas. 05°21'N 67°51'W. 250 m.s.n.m. 12-may-22-may-2001. Gil, I. [IAvH].

Género: *Pachygrontha* Germar, 1837

Diagnosis: Ojos tan largos como anchos, margen preocular tan largo como o más largo que la longitud del ojo. Primer antenómero se engrosa abruptamente hacia el ápice, cuarto antenómero más corto que I - III (Slater 1955).

Comentarios: Con especies de distribución pantropical. Se colectó en el Valle del Cauca la única especie que ha sido registrada para Colombia. Esta se registró a una elevación de 240m.s.n.m.

Especie: *P. longiceps* Stål, 1874

Distribución conocida: Colombia, Costa Rica, Cuba, Guatemala, Guyana, Panamá (Slater 1964).

Ejemplares examinados: COLOMBIA. **Valle del Cauca.** 1 H. Buenaventura. La Delfina. 03°49'60"N 76°47'60"W. 240m.s.n.m. 16-oct-2004. Cultid, C. [IAvH].

Agradecimientos

Agradecemos a los revisores anónimos por sus valiosos comentarios al manuscrito. A Dimitri Forero (Heteropteran Systematics Laboratory, University of California Riverside - USA) por brindarnos importantes registros de Berytidae provenientes del IAvH y del ICN. A Thomas Henry (USDA, Systematic Entomology Laboratory) por suministrarnos literatura valiosa. Apreciamos el préstamo de especímenes por el Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt y de la Colección de referencia de la Universidad del Valle. Este trabajo fue parcialmente financiado por Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) y la Universidad del Valle a través del proyecto p-2009-0381 del programa Joven Investigador e Innovador de Colciencias y por la fundación IDEA WILD, a través de la donación de equipos.

Literatura citada

ASHLOCK, P. D. 1967. A generic classification of the Orsillinae of the world (Hemiptera - Heteroptera - Lygaeidae) University of California Publications in Entomology 48: 1-82.
BARBER, H. G. 1947. Revision of the genus *Nysius* in the United States and Canada (Hemiptera Heteroptera: Lygaeidae). Journal of the Washington Academy of Sciences 37: 354-366.
BRAILOVSKY, H. 1989. Una nueva especie del género *Neoninus* Distant (Hemiptera-Heteroptera-Lygaeidae-Cyminae-Ninini) de Sudamérica. Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoológica 59(1): 153-158.

BRAILOVSKY, H.; CERVANTES-PEREDO, L. 2008. Two new species and distribution records of the genus *Acroleucus* in Mexico (Hemiptera: Heteroptera: Lygaeidae: Lygaeinae). Florida Entomologist 91(1): 49-54.
CAMPOS, D. F.; FERNÁNDEZ, F. 2002. El Proyecto "Diversidad de Insectos en Colombia", p. 297-300. En COSTA, C.; VANIN, S. A.; LOBO, J. M.; MELIC, A. (eds). Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática PRIBES-2002. SEA, Monografías Tercer Milenio, Zaragoza, España.
CASSIS, G. 2008. Lygaeoidea. Australian Faunal Directory. Australian Biological Resources Study, Canberra. Disponible en: <http://www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/online-resources/fauna/afd/taxa/LYGAEOIDEA> [Fecha revisión: 4 febrero 2011].
CERVANTES-PEREDO, L.; BRAILOVSKY, H. 2010. Ischnorhynchinae from Costa Rica (Hemiptera-Heteroptera: Lygaeoidea: Lygaeidae) with description of one new species of *Kleydoceris*. Florida Entomologist 93(3): 357-362.
CHAVES, M. E.; SANTAMARÍA, M. (eds). 2006. Informe sobre el avance el conocimiento y la información de la biodiversidad 1998 - 2004. Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D. C., Colombia. 2 Tomos.
DISTANT, W. L. 1880-1893. Insecta. Rhynchota. Hemiptera-Heteroptera. Volume I. [London : published for the editors by R.H. Porter]. 462 pp.
FORERO, D. 2006. New records of Reduviidae (Hemiptera: Heteroptera) from Colombia and other Neotropical countries. Zootaxa 1107: 1-47.
HENRY, T. J. 1997a. Phylogenetic analysis of family groups within the infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera), with emphasis on the Lygaeoidea. Annals of the Entomological Society of America 90 (3): 275-301.
HENRY, T. J. 2006. Revision of the New World lygaeoid genus *Epipolops* (Heteroptera: Geocoridae: Pamphantinae: Epipolopini), with descriptions of five new species. Canadian Entomologist 138: 504-530.
HENRY, T. J. 1997b. Monograph of the stilt bugs, of Berytidae (Heteroptera) of the Western Hemisphere. Memoirs of the Entomological Society of Washington 19: 1-149.
HENRY, T. J.; FROESCHNER, R. C. 1998. Catalog of the Stilt bugs, or Berytidae, of the World (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). Contributions of the American Entomological Institute 30(4): 1-72.
MCNEELY, J. A. 2006. Systems or species? Approaches to conservation for the 21st century. Integrative Zoology 1(2):86-95.
PONDER, W. F.; CARTER, G. A.; FLEMONS, P.; CHAPMAN, R.R. 2001. Evaluation of museum collection data for uses in biodiversity assessment. Conservation Biology 15(3): 648-657.
RENGIFO-CORREA, L. A.; GONZÁLEZ, R. 2011a. Insecta, Hemiptera, Rhyparochromidae, Antillocorini, *Paradema oculata* Slater, 1980: Distribution extension in Colombia. Check List 7(2): 200-201.
RENGIFO-CORREA, L. A.; GONZÁLEZ, R. 2011b. Géneros de Myodochini (Hemiptera: Lygaeoidea: Rhyparochromidae) en Colombia y clave ilustrada para su determinación. Revista Colombiana de Entomología 37(1): 128-136.
RENGIFO-CORREA, L. A.; GONZÁLEZ, R. 2012. En prensa. New Records of Rhyparochromidae (Hemiptera: Heteroptera: Lygaeoidea) from Colombia. Neotropical Entomology.
ROOT, R. B.; CHAPLIN, S. J. 1976. The life-styles of tropical Milkweed bugs, *Oncopeltus* (Hemiptera, Lygaeidae) utilizing the same host. Ecology 57: 132-140.
SCHUH, R. T.; SLATER, J.A. 1995. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history. Cornell University. 336 p.

- SLATER, A. 1992. A genus level revision of western hemisphere Lygaeinae (Heteroptera: Lygaeidae) with keys to species. The University of Kansas Science Bulletin 55: 1-56.
- SLATER, J. A. 1979. The Systematics, Phylogeny, and Zoogeography of the Blissinae of the World (Hemiptera, Lygaeidae). Bulletin of the American Museum of Natural History 165: 1-180.
- SLATER, J. A. 1977. The incidence and evolutionary significance of wing polymorphism in lygaeid bugs with particular reference to those of South Africa. Biotropica 9: 217-229.
- SLATER, J. A. 1964. A catalogue of the Lygaeidae of the world. University of Connecticut. 1668 p.
- SLATER, J. A. 1955. A revision of the subfamily Pachygronthinae of the World (Hemiptera: Lygaeidae). The Philippine Journal of Science 84: 1-160.
- SLATER, J. A.; BRAILOVSKY, H. 1986. The first occurrence of the subfamily Artheneinae in the Western Hemisphere with the description of a new tribe (Hemiptera: Lygaeidae). Journal of the New York Entomological Society 94 (3): 409-415.
- SLATER, J. A.; BRAILOVSKY, H. 1983. Review of the Neotropical Genus *Toonglasa* (Hemiptera: Lygaeidae). Annals of the Entomological Society of America 76: 523-535.
- SWEET II, M. H. 2000. Seed and chinch bugs (Lygaeoidea). En: Schaefer, C. W.; Panizzi, A. R. (Eds.). Heteroptera of economic importance. CRC Press. Boca Raton, Florida. 828 p.

Recibido: 28-feb-2011 • Aceptado: 31-oct-2011

- Sugarcane 16-20
Sumilarv 91-94
Tabla de vida 21-25, 62-64, 66, 117
Tamarindus indica 174
Tanypodinae 162, 163
Tarsonemidae 228
Taxonomía 331, 341
Taxonomy 331, 341
Tecia solanivora 1, 3, 5-7, 27, 33, 34
Temefos 9, 92, 94
Tenebrionidae 251
Termitas 36-41
Tetranychidae 62, 65, 66
Tetranychus cinnabarinus 21-25, 62, 63
Tetranychus desertorum 62
Tetrastichus sp 240
Theobroma 80
Thrasorinae 137, 139
Thrasorino 137
Thrasorus 137
Tobón Flor Ángela 251
Tolerante 16
Tomate 210
Torres C Yusdiel 162
Tortricidae 67, 68, 70
Toxicidad 192, 269
Trialeurodes vaporariorum 210
Trichogramma 238
Trichogramma acacioi 238
Trichogramma caiaposi 238
Trichogramma demoraesi 238
Trichogramma maxacalii 238
Trichogramma pratissolii 238
Trichogramma soaresi 238
Trichogrammatidae 238
Tricorythodes caunapi 327
Tropics 305
Ulumoides dermestoides 251
Uribe S. Sandra Inés 273
Valle Javier 269
Vargas-Osuna Enrique 192
Varipes 346
Varipes sancarlos n. sp. 346
Vector 8-15, 77-94
Veliidae 350
Vendramim José D. 16
Viçosa 80 82 83
Vigna radiata 251
Villalobosothignus 128
Villamizar R Laura 27
Wasmannia auropunctata 279
Witzgall Peter 1
Xerosaprinus sp 103, 105-108
Xilanasa 167
Xilella fastidiosa 77
Xilófagos 56 57
Xylocopa 313
Xylocopini 313
Yepes Francisco 152
YMMV 77-79
You-Qing Luo 240
Zambrano-González Giselle 117
Zamora E Humberto 183
Zea mays 82, 36, 217
Zhang Mengqi 95
Zhuang Quan 95, 96, 98, 100, 102
Zingiberaceae 357
Zoocria 117-119

Fe de erratas número 37 (2)

Por error involuntario el trabajo de la página 244 a la 248 y los trabajos de las páginas 318 a la 359 tienen como número de revista 37 (1) cuando en realidad es 37 (2).

Morphological characterisation of five brazilian species of *Fidicinoides* (Hemiptera: Cicadidae)

Caracterización morfológica de cinco especies brasileñas de *Fidicinoides* (Hemiptera: Cicadidae)

RODRIGO S. SANTOS¹ and NILZA M. MARTINELLI²

Abstract: The objective of this study was to describe and illustrate the morphological characteristics of some species of Brazilian *Fidicinoides* to aid in their identification. Descriptions and illustrations are given of the head, thorax, abdomen, right forewing and the last urosternite of the male of the *Fidicinoides besti*, *Fidicinoides brunnea*, *Fidicinoides duckensis*, *Fidicinoides pseudethelae* and *Fidicinoides sucinalae* species. The main diagnostic characteristics of these species are markings on pronotum and/or mesonotum and male sternite VIII characteristics.

Key words: Cicadoidea. Cicadas. Fidicinini. Morphology. Taxonomy.

Resumen: El trabajo tuvo como objetivo estudiar la morfología de algunas especies del género *Fidicinoides* e ilustrar rasgos que permitan su reconocimiento. Se presentan descripciones e ilustraciones de la cabeza, el tórax, el abdomen, la parte anterior del ala derecha y el último urosternito del macho de *Fidicinoides besti*, *Fidicinoides brunnea*, *Fidicinoides duckensis*, *Fidicinoides pseudethelae* y *Fidicinoides sucinalae*. Los principales caracteres de diagnóstico de estas especies son marcas registradas del pronoto o mesonoto y caracteres del VIII urosternito del macho.

Palabras clave: Cicadoidea. Chicharra. Fidicinini. Morfología. Taxonomía.

Introduction

According to Moulds (2005) the families Tettigarctidae and Cicadidae are grouped under the superfamily Cicadoidea. The family Cicadidae family includes some species of economic importance for Brazil (Metcalf 1963), mainly because some species infest coffee plantations (Martinelli and Zucchi 1989a, 1989b).

Fidicinini, within the Cicadinae, includes genera of Neotropical cicadas whose timbale organ is prominent displayed (Distant 1906). After a review of the tribe by Boulard and Martinelli (1996), the genus *Fidicinoides* was created, which is distinct from *Fidicina* in presenting narrow lateral-metascutellar plates that do not extend to the timbals and do not completely close the timbal chambers. Some species previously belonging to *Fidicina* were included in this genus. Currently the genus *Fidicinoides* is now composed of 35 described species, 18 originally described in the same and 17 that were the result of generic reassignment (Santos *et al.* 2010).

Morphological and occurrence studies of species of the genus *Fidicinoides* have been carried out by Boulard and Martinelli (1996), Sanborn (2008), Sanborn *et al.* (2008), Santos and Martinelli (2007, 2009a, 2009b) and Santos *et al.* (2010). These studies are important for the recognition and identification of cicada species, for the development of dichotomous keys, and for greater knowledge of the cicada fauna in Brazil and the New World. In this sense, the objective of this work was to characterise morphologically some species of Brazilian *Fidicinoides*, presenting illustrations of the head, thorax, abdomen, right forewing and male sternite VIII of the species *F. besti* Boulard and Martinelli, 1996, *F. brunnea* Boulard and Martinelli, 1996, *F. duckensis* Boulard

and Martinelli, 1996, *F. pseudethelae* Boulard and Martinelli, 1996, and *F. sucinalae* Boulard and Martinelli, 1996, thereby complementing the characterisation of these species, originally described by Boulard and Martinelli (1996).

Material and Methods

The research was carried out between 2002 and 2004, studying specimens of cicadas from five Brazilian institutions (Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro (RJ); Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, Manaus (AM); Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA/UNESP), Botucatu (SP); Museu Nacional do Rio de Janeiro/MNRJ, Rio de Janeiro (RJ); Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal (SP)) and one international institution (Muséum national d'Histoire Naturelle/MNHN, Paris, France).

Specimens were compared with their respective holotypes and paratypes, deposited in FCAV/UNESP. The studied specimens were placed in a humid chamber and afterwards, slides were made with the wings distended in a position oblique to the body. For the study of the male genitalia, the abdomen was separated with the aid of forceps, heated in a potassium hydroxide solution (KOH to 5%) in a water bath for approximately 30 minutes, periodically checking the clarification of the piece. Genitalia were then washed with distilled water in order to eliminate all the material from the inside of the body, for subsequent examination under a stereoscopic microscope (Carl Zeiss Jena® lenses). The genitalia were placed in labelled Eppendorf plastic tubes (4cm in height), containing glycerine (60%), and afterwards, compared to the descriptions made by Boulard and Martinelli (1996). The terminology adopted was based in Moulds (2005).

¹ Ph. D. Embrapa Acre - Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre (CPAFAC) - Rod. BR-364, Km 14, CP 321, 69908-970, Rio Branco, AC, Brazil. rodrigo@cpafac.embrapa.br. ² Autor para correspondência. ² Ph.D. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil. nilza@fcav.unesp.br

The structures for the morphological characterization of the species were illustrated with the aid of a camera lucida attached to the stereoscopic microscope. The following structures were illustrated: head and thorax (dorsal view), abdomen (ventral view), right forewing and male sternite VIII. Such illustrations are not present in the work of Boulard and Martinelli (1996). Illustrations of the male genitalia, the operculum, and of the right fore femur were all omitted, as they were given by Boulard and Martinelli (1996). All measurements were taken using a precision caliper.

Results and Discussion

Fidicinoides besti Boulard and Martinelli, 1996

Head (Fig. 1A): lateral ocelli and medial ocellus situated on a black transverse irregular shaped band which extends to the base of the antennae and vertex; median ocellus in a sub-frontal position; distance between lateral ocelli nearly two and half times the distance that separates them from the corresponding eyes; salient eyes, rounded, oblique, with joined sub-ocular marks; postclypeus dorsal portion short and arched; postclypeus face distinctly arched, ochre, with nine dark transverse ridges on both sides of the medial furrow; black anteclypeus; rostrum brownish, long, with the apex reaching the base of the hind trochanters.

Thorax (Fig. 1A): pronotum longer than head; with four shallow furrows; lateral angle of pronotal collar poorly developed and brownish; mesonotum light brownish, with submedian sigilla dark brown well-defined and comma-shaped; the lateral sigilla light brown; a transverse, irregular-shaped stripe and two small black punctiform marks, above the cruciform elevation; cruciform elevation not very long, flattened and with the back apices short, rounded and close together (Fig. 1A); operculum very short, in small arched, ochre-coloured lamina.

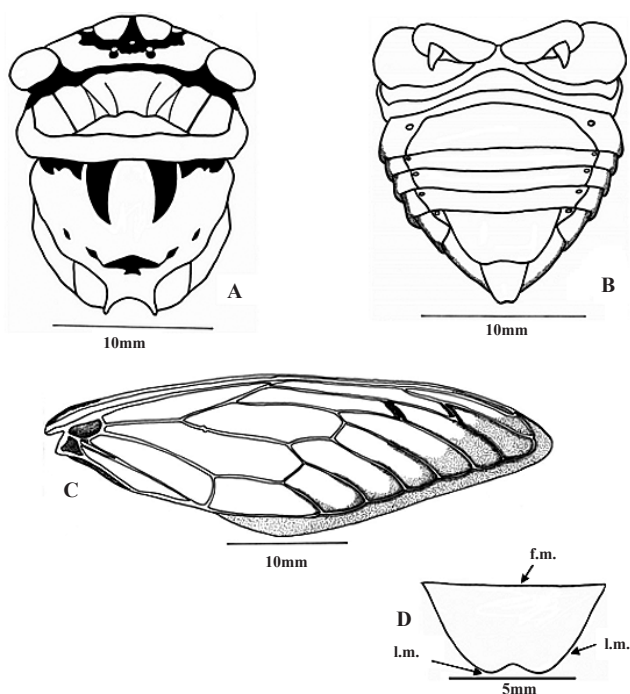


Figure 1. *Fidicinoides besti*: A. Head and thorax (dorsal view); B. Abdomen (ventral view); C. Right forewing; D. ♂ sternite VIII (f.m. – front margin anterior; l.m. – lateral margin and p.m. – posterior margin).

Abdomen (Fig. 1B): a little shorter than the distance from the vertex to the back apices of the cruciform elevation; broad base, not tapering towards the last abdominal segment; ochre tergites; timbal cover dorsally short; sternites ochre, including the last abdominal segment; male sternite VIII twice as long as wide, with anterior margin almost straight, lateral margin oblique, and the posterior margin invaginated (Fig. 1D).

Forewing (Fig. 1C): hyaline; light brown fumose on the apical area; forewing with blackened basal cell; costal vein relatively short and ochre; veins ochre, becoming brownish in the apical area; the extremities of the veins with dark brown markings on both sides, and with deep brown infuscation on the radial and radiomedial crossveins; ambient vein dark brown; apical area octolocate.

Examined material: BRAZIL. Amazonas: Amaná Lake. INPA. 17.IX.1979. (Best. R.), Holotype ♂; ibidem, 13.IX.1979, 5 paratypes ♂♂; Rio Negro. 28.VIII.1969. (several collectors), 1 ♂, ibidem, Humaitá. FCA/UNESP/Botucatu. X.1974. (Scivittaro), 3 ♂♂; ibidem, Ducke Reserve. INPA. 14.VIII.1969. (A. Faustino), 1 ♂; Rondônia: Porto Velho. INPA. 01.IX.1979, 07.IX.1979, 28.IX.1979. (J. Campbell), 7 ♂♂; ibidem, Vilhena. INPA. 06.XI.1979. (Penny and Arias), 1 ♂; Mato Grosso: Humbolt Reserve, Colina Highway. INPA. 26.IX.1975, 27.IX.1975, 03.X.1975. (L. P. Albuquerque and J. B. Moraes), 3 ♂♂; Pará: Cachimbo. FIOCRUZ. 09.X.1956. (Travassos, Oliveira and Adão), 4 ♂♂.

Comment: Medium-sized species, similar to *F. brunnea*, but distinguished by the submedian sigilla, being comma-shaped on the mesonotum.

Fidicinoides brunnea Boulard and Martinelli, 1996

Head (Fig. 2A): lateral ocelli and median ocellus situated on broad irregular-shaped black mark, that extends to the base of the antennae and vertex; medial ocellus in an almost frontal position; distance between the lateral ocelli nearly three times the distance that separates them from corresponding eyes; eyes slightly salient, oblique, with joined sub-ocular marks; postclypeus dorsal portion a little longer than the vertex, arched, ochre, darker on the sides; postclypeus face arched, brown, with eight transverse ridges on both sides of the medial furrow; black anteclypeus; rostrum long, brownish, with apex reaching the medial hind femur.

Thorax (Fig. 2A): pronotum longer than head; lateral angle of pronotal collar little developed; mesonotum brown, with green markings; lateral sigilla dark near the pronotum and on the distal extremities, with the central area lighter and comma-shaped; submedian sigilla short, dark and fusiform; a broad mark and scutal depression black above the long cruciform elevation, flattened, with posterior apices short, rounded and close together (Fig. 2A); very short operculum, flattened, covered with golden hairs.

Forewing (Fig. 2B): hyaline; light brown fumose in the apical area; forewing with basal cell opaque brown; brownish veins, darker in the apical area; the extremities of the veins marked with dark brown on both sides, with deep brown markings on the radial and radiomedial crossveins; ambient vein dark brown; apical area octolocate.

Examined material: BRAZIL. Mato Grosso. FCAV/UNESP/Jaboticabal (Roppa and Alvarenga). 1 paratype ♂.

Comments: Medium-sized species, similar to *F. besti*, but distinguished by the short and fusiform submedian sigilla on the mesonotum.

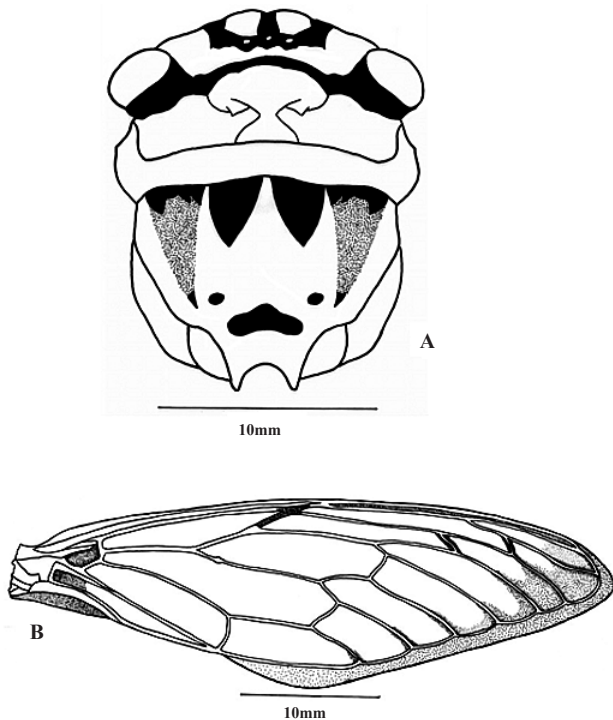


Figure 2. *Fidicinoides brunnea*: A. Head and thorax (dorsal view); B. Right forewing.

Having previously been removed for the study of the genitalia, illustrations of the abdomen and male sternite VIII were not made.

Fidicinoides duckensis Boulard and Martinelli, 1996

Head (Fig. 3A): lateral ocelli and medial ocellus situated on an irregular-shaped broad black mark which extends to the vertex, not extending to the base of the antennae; median ocellus in a frontal position; distance between the lateral ocelli nearly twice the distance that separates them from the corresponding eyes; eyes salient and oblique, with discrete sub-ocular marks; long postclypeus dorsal portion, brownish and slightly arched; postclypeus face distinctly arched, ochre, with nine transverse ridges with black and light brown markings on both sides of the black medial furrow; black anteclypeus; rostrum ochre, long, with apex reaching the insertion of the hind femur.

Thorax (Fig. 3A): pronotum longer than head; lateral angle of pronotal collar poorly developed; mesonotum ochre, with soot black markings; lateral sigilla light coloured triangular-shaped outer markings, the base being two brownish irregular-shaped marks near the pronotum, central area colourless and two small marks at the apices; submedian sigilla triangular, broad, short and black, an irregular-shaped mark and two black punctiform marks above the cruciform elevation; cruciform elevation not very long, with posterior apices pointed and close together (Fig. 3A); operculum with short lamina, broad, arched, ochre-coloured lamina, with dark brown markings on the outer side.

Abdomen (Fig. 3B): a little shorter than the distance covered from the vertex to the back apices of the cruciform elevation; base wide, tapering in the direction of the last abdominal segment; brown and black tergites covered with golden hairs;

timbal cover arched, dark brown; sternites brown, sparsely covered with golden and black hairs; male sternite VIII nearly twice as long as wide, with the front and side margins slightly concave and the back one having a half moon-shaped invagination, and the apices close together (Fig. 3D).

Forewing (Fig. 3C): hyaline; light brown fumose on the apical area; forewing with basal cell partially opaque and ochre coloured, costa long and of the same colour; veins ochre turning brown in the apical area, the extremities of the veins with fumose brown markings on both sides; infuscation on the radial and radiomedial crossveins and the ambient vein, slightly marked brown; apical area octolocate.

Examined material: BRAZIL. Amazonas: Ducke Reserve. INPA. 13.VIII.1979. (H. M. Savage), Holotype ♂; ibidem, INPA. 11.II.1976. (B. C. Ratcliffe), 1 paratype ♀; ibidem, Humaitá. FCA/UNESP/Botucatu. X.1974. (Scivittaro), 1 paratype ♂; ibidem, Manaus. INPA. 04.VIII.1978. (Rodolfo), 1 paratype ♂; ibidem, 24.III.1982. (Latorre L. R.), 1 allotype ♀; ibidem, MN/RJ. 27.IX.1955. (Elias and Roppa), 1 ♂; ibidem, Humaitá. INPA. FCA/UNESP/Botucatu. X.1974. (Scivittaro), 1 ♂; Rondônia: Porto Velho. INPA. 20.VIII.1979, 01.IX.1979. (J. Campbell), 2 ♂♂; ibidem, 11.IX.1963. (Eduardo), 1 ♂; Mato Grosso: Humbolt Reserve. INPA. 26.IX.1975. (L. P. Albuquerque), 1 ♂; Pará: Cachimbo. FIOCRUZ. 09.X.1956. (Travassos, Oliveira and Adão), 1 ♂; ibidem, Rio Trombetas. INPA. 14.IV.1985. (J. E. Binda), 1 ♂.

Comments: Medium-sized species, similar to *Fidicinoides poulaini* Boulard and Martinelli 1996, but distinguished by male sternite VIII having the anterior and lateral margins slightly concave.

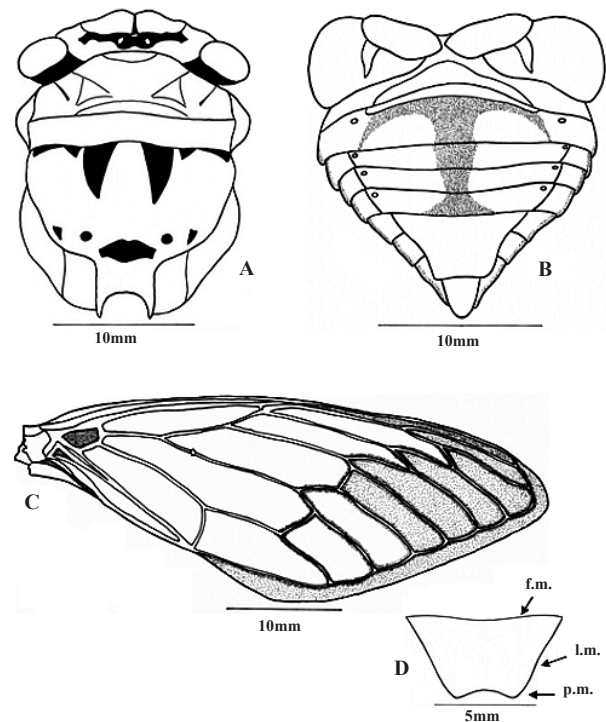


Figure 3. *Fidicinoides duckensis*: A. Head and thorax (dorsal view); B. Abdomen (ventral view); C. Right forewing; D. ♂ sternite VIII (f.m. – front margin; l.m. – lateral margin and p.m. – posterior margin).

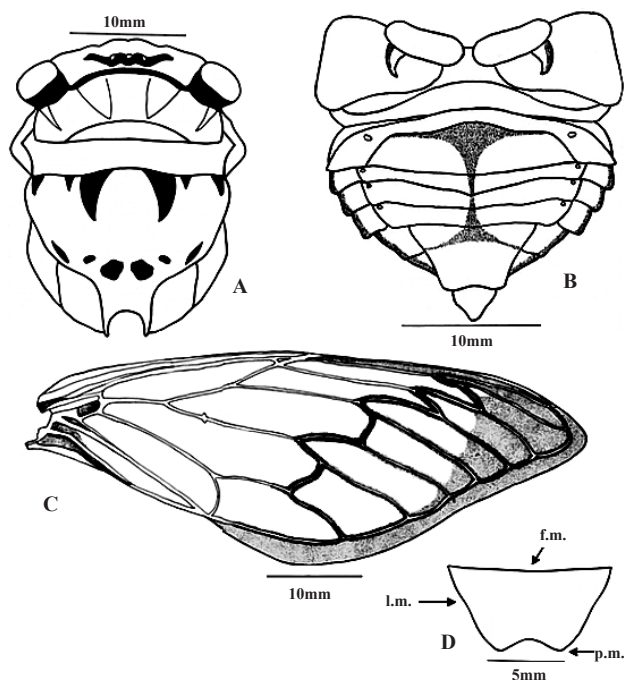


Figure 4. *Fidicinoides pseudethelae*: A. Head and thorax (dorsal view); B. Abdomen (ventral view); C. Right forewing; D. ♂ sternite VIII (f.m. – front margin; l.m. – lateral margin and p.m. – posterior margin).

***Fidicinoides pseudethelae* Boulard and Martinelli, 1996**

Head (Fig. 4A): lateral ocelli and the medial ocellus situated on an irregular-shaped, broad black mark which stops short of the base of the antennae and vertex; median ocellus in frontal position; distance between the lateral ocelli nearly three times the distance that separates them from the corresponding eyes; eyes in short ellipsoids, wide, oblique, with subocular joined marks; postclypeus dorsal portion short and arched; postclypeus face arched, brown, with nine transverse ridges on both sides of the medial furrow; anteclypeus black; rostrum brownish, long, with apex reaching the level of the insertion of the hind trochanters.

Thorax (Fig. 4A): pronotum longer than the head; lateral angle of pronotal collar poorly developed; mesonotum brown, with black markings; lateral sigilla triangular, dark near the pronotum and apices, lighter in the central area; submedian sigilla short, dark and curved; two joined or separated, irregular-shaped markings, scutal depression with almost circular black marks; cruciform elevation flattened, with posterior apices short, pointed and close together (Fig. 4A); operculum with short lamina, with wide, slightly arched, ochre and brown lamina.

Abdomen (Fig. 4B): Shorter than the distance from the vertex to the back apices of the cruciform elevation; broad base, tapering in the direction of the last abdominal section; blackened tergites; black timbal cover, arched and with black markings; brownish sternites with green markings; male sternite VIII nearly twice as wide as long, with the anterior margin almost straight, lateral margin oblique, with a concavity approximately midway, posterior margin concave and rounded, with apices apart from one another (Fig. 4D).

Forewing (Fig. 4C): hyaline; dark brown fumose on the apical area; forewing wide, with basal cell opaque, black;

costa long and brownish, becoming brown at the apical area; the extremities of the veins with dark brown fumose markings on both sides; radial, radiomedial, medial and mediocubital crossveins with strong dark brown infuscation, the ambient vein also being the same colour; apical area octolocate.

Examined material: FRENCH GUIANA. MNHN/Paris. 25.IV.1992. (M. Thouvenot), 1 paratype ♂; ibidem, 16.XII.1992. 1 paratype ♀; BRAZIL. Pará: Cachimbo. FIOC. 21.IX.1955, 18.I.1956. (L. Travassos and S. Oliveira), 4 ♂♂; ibidem, 09.X.1956. (Travassos, Oliveira and Adão), 35 ♂♂; ibidem, Amazonas: Humaitá. FCA/UNESP/Botucatu. X.1974. (Scivittaro), 4 ♂♂; ibidem, Rio Juavá. INPA. 02.VIII.1980. (Francisco, B.), 1 ♂; Rondônia: Porto Velho. INPA. 26.I.1980. (P. Arias and J. Arias), 1 ♂.

Comments: Large-sized species, similar to *Fidicinoides dolosa* Santos and Martinelli 2009 but distinguished by the submedian sigilla being comma-shaped internal marks on the mesonotum.

***Fidicinoides sucinalae* Boulard and Martinelli, 1996**

Head (Fig. 5A): lateral ocelli and medial ocellus situated on a long irregular-shaped black band, that stops short of the base of the antennae and vertex; median ocellus in sub-frontal position; distance between the lateral ocelli nearly three times the distance separating them from the corresponding eyes; eyes salient with sub-ocular discrete marks; postclypeus dorsal portion long, curved, with nine brownish transverse ridges on both sides of the medial furrow; anteclypeus black; rostrum long, ochre, with apex extending between the second and third pair of legs.

Thorax (Fig. 5A): pronotum longer than the head; lateral angle of pronotal collar poorly developed; two punctiform black markings on the posterior part of the internal area; mesonotum light brown with four dark streaks, lateral sigilla long, narrow and discontinuous; submedian sigilla equally

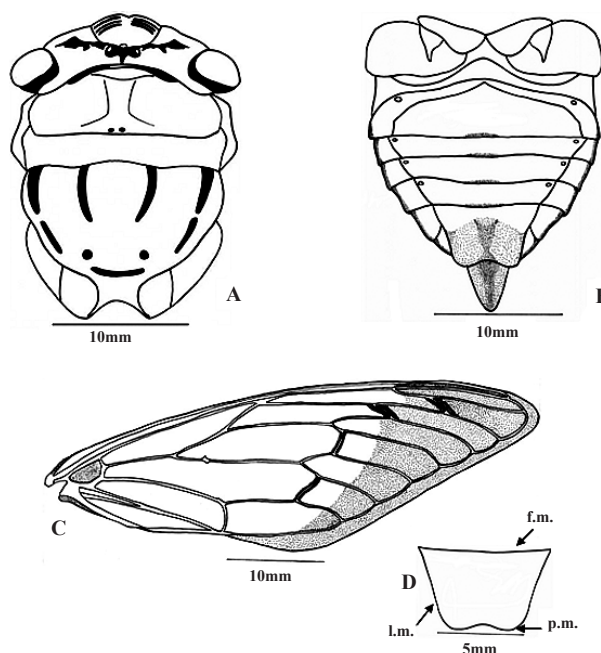


Figure 5. *Fidicinoides sucinalae*: A. Head and thorax (dorsal view); B. Abdomen (ventral view); C. Right forewing; D. ♂ sternite VIII (f.m. – front margin; l.m. – lateral margin and p.m. – posterior margin).

narrow, curved and short; one narrow, long black mark above the cruciform elevation; scutal depression black; cruciform elevation broad, flattened, with posterior apices not prominent and apart from each other, at the level of the mesocutellar expansions (Fig. 5A); operculum with short lamina, broad, arched lamina with ochre-coloured markings.

Abdomen (Fig. 5B): a little shorter than the distance from the vertex to the posterior apices of the cruciform elevation; base equal to the width of the thorax, slightly tapering; brown tergites; timbal cover bordered with black on the front part; sternites ochre, except the eighth, which is darker brownish; last abdominal segment light brown; male sternite VIII nearly one and a half times wider than long, anterior margin almost straight, outer margin oblique and slightly concave, posterior margin with non-pronounced invagination, and apices apart from each other (Fig. 5D).

Forewing (Fig. 5C): hyaline; light brown fumose on the apical region; forewing with basal cell opaque, brown; costa long, ochre; veins ochre turning brown at the apical region; radial, radiomedial, medial and mediocubital crossveins with deep brown infuscation; apical area octolocate.

Examined material: BRAZIL. *Amazonas*: Humaitá. FCA/UNESP/Botucatu. 3.VII.1975. (L. C. Petri), holotype ♂; ibidem, 4 paratypes ♂♂; ibidem, 1 paratype ♂; ibidem, IX.1973. (Scivittaro), 3 paratypes ♂♂; ibidem, X.1974, 2 paratypes ♂♂; *Rondônia*: Porto Velho. INPA. 21.VIII.1979. (J. Campbell), 1 paratype ♂; FCA/UNESP/Botucatu. 24.X.1975. (A. A. G.), 1 paratype ♂; *Pará*: Cachimbo. FIOCRUZ 21.IX.1955. (L. Travassos and S. Oliveira), 2 ♂♂; ibidem, 09.X.1956. (Travassos, Oliveira and Adão), 1 ♂; Without location. INPA. 11.IX.1963. (Eduardo), 1 ♂.

Comments: Medium-sized species, having two marks, adjoined or discrete on the posterior margin of the inner region of the pronotum, as well as having long and discontinuous external markings of the mesonotum.

Acknowledgments

To Allen F. Sanborn Ph.D. (Barry University, Miami Shores, USA) for the revision of the manuscript, and the curators for providing specimens of Cicadidae for study.

Cited Literature

- BOULARD, M.; MARTINELLI, N. M. 1996. Révision des fidicinini; nouveau statut de la tribu, espèces connues et nouvelles espèces (Cicadomorpha, Cicadidae, Cicadinae). EPHE, Biologie et Evolution des Insectes 9: 11-81.
- DISTANT, W. L. 1906. A synonymic catalogue of Homoptera, Part I, Cicadidae. London: British Museum, 207 p.
- MARTINELLI, N. M.; ZUCCHI, R. A. 1989a. Cigarras associadas ao cafeeiro. II. Gênero *Fidicina* Amyot & Serville, 1843 (Homoptera, Cicadidae, Cicadinae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 18: 5-12 (supl.).
- MARTINELLI, N. M.; ZUCHHI, R. A. 1989b. Cigarras associadas ao cafeeiro. III. Gênero *Dorisiana* Metcalf, 1952 (Homoptera, Cicadidae, Cicadinae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 18: 5-12 (supl.).
- METCALF, Z. P. 1963. General Catalogue of the Homoptera, Cicadoidea, Pats 1-2. Raleigh: Waverly 8: 1-919.
- MOULDS, M. S. 2005. An appraisal of the higher classification of cicadas (Hemiptera: Cicadoidea) with special reference to the Australian fauna. Records of the Australian Museum 57: 375-446.
- SANBORN, A. F. 2008. New records of Brazilian cicadas including the description of a new species (Hemiptera: Cicadoidea, Cicadidae). Neotropical Entomology 37: 685-690.
- SANBORN, A. F.; MOORE, T. E. AND YOUNG, A. M. 2008. Two new cicada species from Costa Rica (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae) with a key to the species of *Fidicinoides* in Costa Rica. Zootaxa 1846: 1-20.
- SANTOS, R. S.; MARTINELLI, N. M.; MACCAGNAN, D. H. B.; SANBORN, A. F. AND RIBEIRO, R. 2010. Description of new cicada species associated with the coffee plant and an identification key for the species of *Fidicinoides* (Hemiptera: Cicadidae) from Brazil. Zootaxa 2602: 48-56.
- SANTOS, R. S.; MARTINELLI, N. M. 2009a. Primeiro registro de *Fidicinoides picea* (Walker, 1850) e *Fidicinoides poulaini* Boulard and Martinelli, 1996 no Brasil. Ciência Rural 39: 559-562.
- SANTOS, R. S.; MARTINELLI, N. M. 2009b. Descrição de novas espécies de *Fidicinoides* Boulard & Martinelli, 1996 (Hemiptera: Cicadidae) de ocorrência no Brasil. Neotropical Entomology 38: 638-642.
- SANTOS, R. S.; MARTINELLI, N. M. 2007. Ocorrência de *Fidicinoides pauliensis* Boulard & Martinelli, 1996 (Hemiptera: Cicadidae) em cafeeiro em Tapiratiba, SP. Revista de Agricultura 82: 311-314.

Received: 28-jun-2011 • Accepted: 8-nov-2011

- Sugarcane 16-20
Sumilarv 91-94
Tabla de vida 21-25, 62-64, 66, 117
Tamarindus indica 174
Tanypodinae 162, 163
Tarsonemidae 228
Taxonomía 331, 341
Taxonomy 331, 341
Tecia solanivora 1, 3, 5-7, 27, 33, 34
Temefos 9, 92, 94
Tenebrionidae 251
Termitas 36-41
Tetranychidae 62, 65, 66
Tetranychus cinnabarinus 21-25, 62, 63
Tetranychus desertorum 62
Tetrastichus sp 240
Theobroma 80
Thrasorinae 137, 139
Thrasorino 137
Thrasorus 137
Tobón Flor Ángela 251
Tolerante 16
Tomate 210
Torres C Yusdiel 162
Tortricidae 67, 68, 70
Toxicidad 192, 269
Trialeurodes vaporariorum 210
Trichogramma 238
Trichogramma acacioi 238
Trichogramma caiaposi 238
Trichogramma demoraesi 238
Trichogramma maxacalii 238
Trichogramma pratissolii 238
Trichogramma soaresi 238
Trichogrammatidae 238
Tricorythodes caunapi 327
Tropics 305
Ulumoides dermestoides 251
Uribe S. Sandra Inés 273
Valle Javier 269
Vargas-Osuna Enrique 192
Varipes 346
Varipes sancarlos n. sp. 346
Vector 8-15, 77-94
Veliidae 350
Vendramim José D. 16
Viçosa 80 82 83
Vigna radiata 251
Villalobosothignus 128
Villamizar R Laura 27
Wasmannia auropunctata 279
Witzgall Peter 1
Xerosaprinus sp 103, 105-108
Xilanasa 167
Xilella fastidiosa 77
Xilófagos 56 57
Xylocopa 313
Xylocopini 313
Yepes Francisco 152
YMMV 77-79
You-Qing Luo 240
Zambrano-González Giselle 117
Zamora E Humberto 183
Zea mays 82, 36, 217
Zhang Mengqi 95
Zhuang Quan 95, 96, 98, 100, 102
Zingiberaceae 357
Zoocria 117-119

Fe de erratas número 37 (2)

Por error involuntario el trabajo de la página 244 a la 248 y los trabajos de las páginas 318 a la 359 tienen como número de revista 37 (1) cuando en realidad es 37 (2).

Varipes (Ephemeroptera: Baetidae) en Venezuela: descripción de nueva especie

Varipes (Ephemeroptera: Baetidae) in Venezuela: description of a new species

MARÍA MERCEDES CASTILLO^{1,2} y BELKYS PÉREZ³

Resumen: Se registra el género *Varipes* por primera vez para Venezuela, describiéndose una nueva especie de este género. Se encontraron las ninfas de *V. sancarlos* n. sp. en el río San Carlos, Estado Cojedes. La morfología de las ninfas es similar a las descripciones de algunas especies del género. Las características del hábitat físico y de la calidad del agua en el Río San Carlos sugieren que *V. sancarlos* puede habitar ríos moderadamente afectados por actividades humanas.

Palabras clave: Efimeras. Ninfas. Río San Carlos. Cojedes.

Abstract: The genus *Varipes* is reported for the first time for Venezuela. A new species of the genus *Varipes* is described. Nymphs of *V. sancarlos* n. sp. were collected in the San Carlos River, Cojedes. The morphology of the nymphs similar to descriptions of other *Varipes* species. Physical habitat and water quality conditions at the San Carlos River suggest that *V. sancarlos* can occur in moderately disturbed rivers.

Key words: Mayflies nymphs. San Carlos River. Cojedes.

Introducción

Lugo-Ortiz y McCafferty (1998) establecieron el género *Varipes* con base en material proveniente de Ecuador y Colombia (Fig. 1A). En esa oportunidad se describió la especie *Varipes lasiobranchius*, que posteriormente también fue registrada en México (Randolph y McCafferty 2000). Además, Lugo-Ortiz y McCafferty (1998) concluyen que el género también está presente en Perú, con base en las características de las uñas tarsales de una ninfa no identificada descrita por Traver y Edmunds (1968). Recientemente, Nieto (2004) describió tres nuevas especies de *Varipes*: *V. minutus* y *V. singuil* de Argentina, *V. cajuato* de Bolivia. En Brasil, una nueva especie, *V. helenae*, es descrita para el estado de Matto Grosso (Salles y Batista 2004). De acuerdo con Domínguez et al. (2006) el género también ha sido reportado para Panamá y Costa Rica. En este estudio se presenta el primer registro del género *Varipes* con la especie nueva *Varipes sancarlos* n. sp. para Venezuela. También se incluyen características del hábitat donde se encontraron las ninfas, adicionando la descripción del sustrato y la calidad del agua.

Materiales y Métodos

El río San Carlos, también llamado Tirgua, nace en las montañas de Aguirre (Carabobo) y desemboca en el río Cojedes, Venezuela. El área estudiada se ubicó entre los sectores Campo Alegre y El Genareño, ubicados al sur de la población de Las Vegas (Fig. 1B). En Paso Viboral, ubicado aguas arriba de la zona muestreada, el área de la cuenca del río San Carlos es de 1.486 km² y presenta un caudal promedio de 13 m³ s⁻¹ (Guevara et al. 2006). El uso de la tierra en las adyacencias del río es principalmente agropecuario, observándose cultivos de tabaco, maíz, arroz y actividad ganadera. En el tramo estudiado, el cauce del río ha sido canalizado en algunos

sectores y la vegetación ribereña ha sido alterada, estando compuesta principalmente por plantas herbáceas.

Se colectaron ninfas de Ephemeroptera empleando mallas tipo "Surber" en dos puntos ubicados cerca de los sectores Campo Alegre (Estación 1) y El Genareño (Estación 2) en abril de 2010 (Fig. 1B). Los organismos se preservaron en etanol al 80% y en el laboratorio se identificaron mediante las claves y descripciones de Nieto (2004), Salles y Batista (2004), Domínguez et al. (2006) y Waltz y Burian (2008). En cada punto de muestreo se realizaron mediciones de conductancia específica y la concentración de los sólidos totales disueltos con un conductímetro Exttech EC400. También se midieron la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y el porcentaje de saturación con un oxigenómetro YSI 95. Se tomaron muestras de agua para realizar los siguientes análisis en el laboratorio: pH, alcalinidad total, nitratos, fósforo soluble disuelto, fósforo total y sólidos suspendidos de acuerdo con los métodos de APHA (1995).

Resultados

Varipes sancarlos n. sp.

Ninfas

Longitud corporal: 3,2-4,0 mm; cercos: 1,0-1,2 mm. **Cabeza:** amarillento-marronzco, ojos compuestos marrón pálido en la superficie dorsal y marrón negruzco en la base, ocelos marrón oscuro; antenas pálido amarillentas, 2X la longitud de la cabeza, pedicelo 2X la longitud del escapo (Fig. 2A). **Piezas bucales. Labro:** superficie dorsal del labro con 4-5 setas cortas cercanas a la línea media y 4 setas cercanas al margen lateral (Fig. 2B). **Mandíbula izquierda:** incisivos con 4 denticulos externos y 2 internos, prosteca robusta ramificándose en tres filamentos, proceso triangular de la base de la mola bien desarrollado (Figs. 2C,D). **Mandíbula derecha:**

¹ Departamento de Estudios Ambientales, Laboratorio de Limnología, Universidad Simón Bolívar, Apartado 89000 Caracas 1080-A, Venezuela. ² Departamento de Agroecología, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Villahermosa, Carretera Villahermosa-Reforma km. 15.5, Ranchería Guineo 2ª sección C.P. 86280 Villahermosa, Tabasco, México. mmcastillo@ecosur.mx. Autora de correspondencia. ³ Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Campus de Barbula, Valencia, Venezuela. belpererez@uc.edu.ve

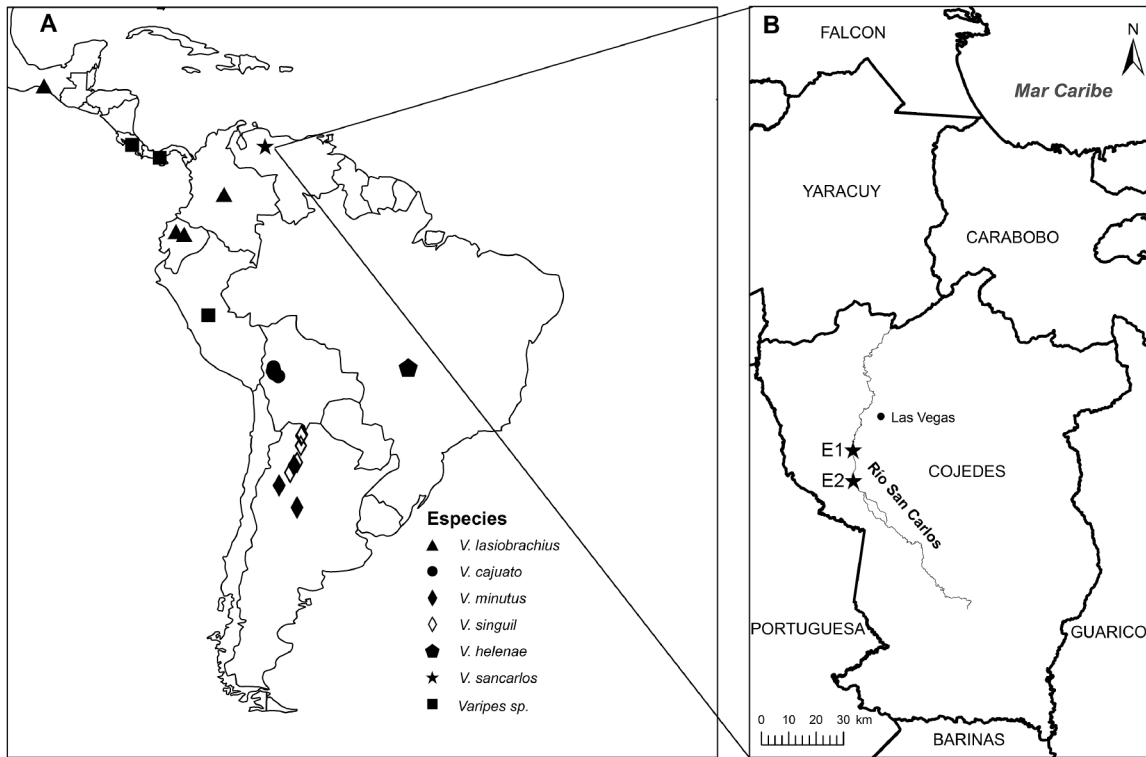


Figura 1. A. Distribución de especies del género *Varipes*. En Perú, Panamá y Costa Rica sólo se conoce la presencia del género. B. Ubicación de las estaciones de muestreo (E1, estación 1; E2, estación 2) en el río San Carlos, Cojedes, Venezuela.

incisivos con 4 denticulos externos y 4 internos; prosteca más delgada y larga y aparentemente bífida (Figs. 2E,F). **Maxila:** segmentos 2 del palpo labial aproximadamente del mismo tamaño que el segmento 1 y sobrepasa el ápice de la galea y la lacinia (Fig. 3A). **Hipofaringe:** lengua redondeada apicalmente y superlingua apicalmente triangular (Fig. 3B). **Labio:** glosa con 9 setas ventrales mediales cortas, delgadas y simples y 4 setas apicales largas, delgadas y simples; paraglosa con 5 setas apicales, largas, delgadas y simples y tres setas ventrales simples, cortas y delgadas mas una seta basal simple y corta, dorso de la paraglosa con una seta dorsal subapical corta, gruesa y simple; dorso del segmento 2 del palpo labial con dos setas simples, región ventral del segmento dos con 8 setas simples, delgadas y cortas (Fig. 3C).

Tórax: amarillento-marronzco, excepto el margen anterior del mesonoto de color marrón oscuro, pterotecas anteriores levemente marrones en su región medial. Sin pterotecas posteriores. **Patas:** anteriores, marronzco-amarillento con el fémur más ancho que las restantes, fila ventral y transversa de setas subapicales, largas, simples y gruesas, aumentan gradualmente de tamaño de un extremo al otro de la fila (Fig. 4A); medias, con fémur con una fila ventral y transversa de setas basales simples, largas y gruesas (Fig. 4B); posteriores, con fémur con pocas setas, no más de 6 setas ventrales y basales simples y larga, sin formar una fila transversal continua (Fig. 4C). **Uñas tarsales** con 3 rara vez 4 denticulos en las márgenes laterales (Fig. 4D).

Abdomen: tergos amarillento pálido, excepto los segmentos 2-3 y 7-8 con coloración marrón oscura (Fig. 4E); tergo abdominales 3-10 con procesos triangulares en el margen pos-

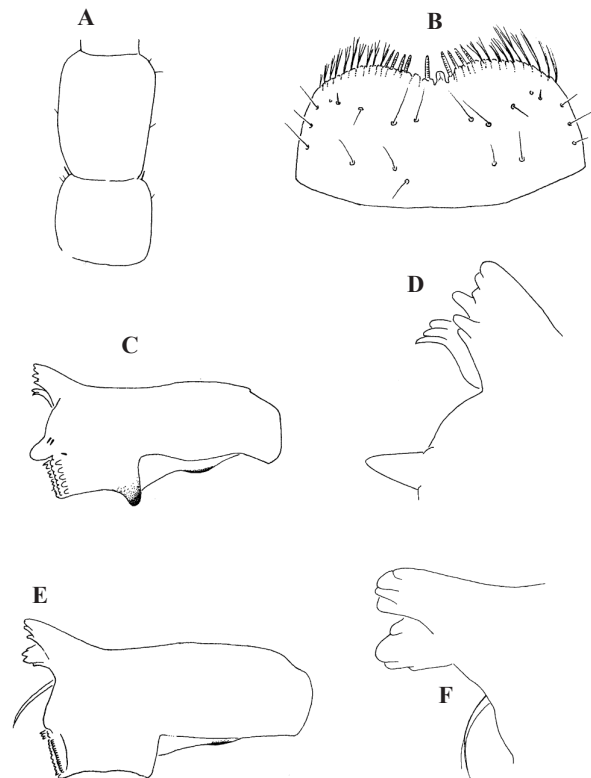


Figura 2. *Varipes sancarlos*: A. antena: escapo y pedicelo, B. superficie dorsal del labro, C. mandíbula izquierda, D. detalle de incisivos de mandíbula izquierda, E. mandíbula derecha, F. detalle de incisivos de mandíbula derecha.

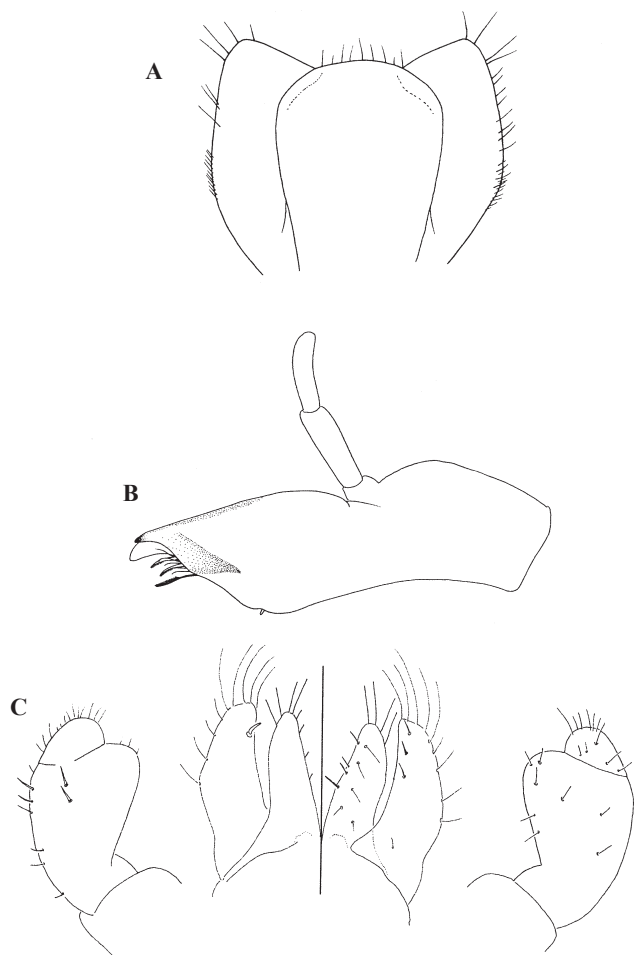


Figura 3. *Varipes sancarlos*: A. maxila, B. hipofaringe, C. labio: palpos, glosas y paraglosas (superficie dorsal a la izquierda - superficie ventral a la derecha).

terior (Fig. 4F), solo tergos 9 y 10 con los procesos a lo largo de todo el margen; branquias blancuecinas con tráqueas poco pigmentadas (Fig. 4G); paraproctos con 8 espinas marginales (Fig. 4H); filamentos caudales blancuecinos.

Adultos: desconocidos

Material examinado: 7 ninfas, 3, ♀, 4, ♂. VENEZUELA. **Cojedes.** Rómulo Gallegos. Estación 1: Campo Alegre. Río San Carlos. 9°29'12"N 68°39'54"W. ALTITUD: 111 msnm. Siete ninfas, 3, ♀, 4, ♂. Estación 2: El Genareño. Río San Carlos. 9°23'10"N, 68°39'51"W. ALTITUD: 94 msnm. 25-ABR- 2010. Castillo, M. Museo de Zoología de la Universidad de Carabobo.

Etimología: el epíteto específico se refiere a la localidad donde las ninfas fueron colectadas, el río San Carlos, Estado Cojedes.

Discusión

Aspectos morfológicos. Este estudio representa el primer registro del género *Varipes* para Venezuela. La especie presenta caracteres descritos para *V. helenae*, *V. singuil* y *V. minutus*. *V. helenae* fue descrita por Salles y Batista (2004) para el

estado de Mato Grosso en Brasil, mientras que *V. singuil* y *V. minutus* fueron descritos por Nieto (2004) para las provincias Tucumán, Jujuy, Salta y Córdoba en Argentina. Otras especies de *Varipes* han sido descritas para Bolivia, Ecuador, Colombia y México (Lugo-Ortiz y McCafferty 1998; Nieto 2004). El género también está presente en Perú, Panamá y Costa Rica (Lugo-Ortiz y McCafferty 1998; Randolph y McCafferty 2000; Domínguez et al. 2006). Por lo tanto, su presencia en Venezuela era esperable.

Algunos caracteres de *Varipes sancarlos* son compartidos con otras especies del género. En tal sentido, la posición lateral de setas simples, delgadas y largas en el margen dorsal del labro se observa en *V. minutus* y *V. singuil* (Nieto 2004); el segmento II del palpo maxilar con una longitud igual a 1,0X del segmento I también es descrito en *V. minutus* mientras que en *V. helenae* es 0,5X más corto (Nieto 2004); tibias y tarsos similares a los de *V. helenae* (Salles y Batista 2004); coloración marrón oscura de los tergos abdominales II-III y VII-VIII está descrita para *V. lasiobranchius* (Lugo-Ortiz y McCafferty 1998) y *V. minutus* (Nieto 2004).

No obstante, *V. sancarlos* se diferencia de las otras especies por la siguiente combinación de caracteres: mandíbula derecha con cuatro incisivos externos y cuatro incisivos internos y prosteca larga y bifida; segmento 2 del palpo maxilar 1,0X el largo del segmento 1 y sobrepasa el ápice de la maxila; fémur anterior con fila ventral y transversal de setas largas y gruesas ubicadas cerca del extremo apical o distal del fémur; tres denticulos, rara vez cuatro, en las uñas tarsales; tergos abdominales II-III y VII-VIII con coloración marrón oscura, paraproctos con ocho espinas marginales.

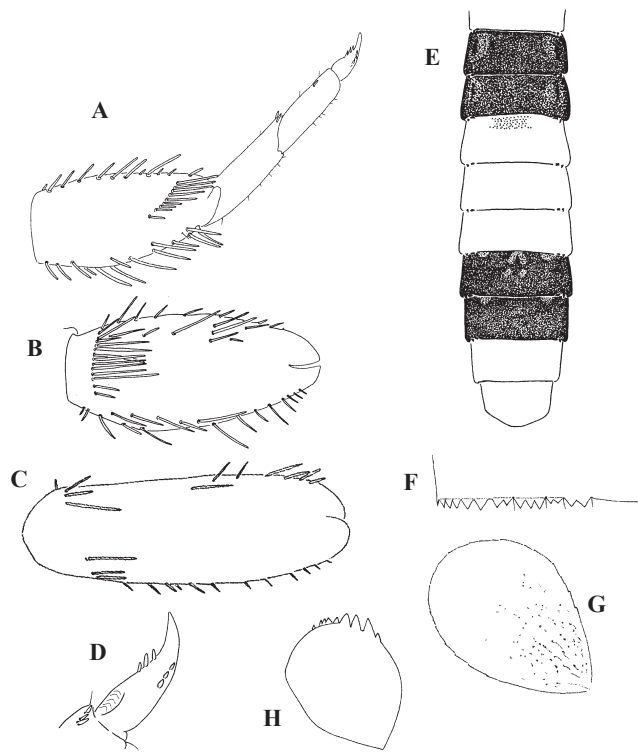


Figura 4. *Varipes sancarlos*: A. fémur, tibia y tarso de pata anterior, B. fémur de pata media, C. fémur de pata posterior, D. uña tarsal, E. tergos abdominales, F. margen posterior del tergo 4, G. branquia del segmento 7, H. paraprocto.

Tabla 1. Valores promedio de las variables de calidad de agua determinadas en las estaciones de muestreo en el río San Carlos, Cojedes, Venezuela.

	Río San Carlos	
	Estación 1	Estación 2
Temperatura agua (°C)	32,3	29,3
Conductividad Especifica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	282	311
Sólidos Totales Disueltos (mg L^{-1})	194	219
pH	8,1	8,1
Alcalinidad	131	136
Oxígeno Disuelto (mg L^{-1})	6,6	5,89
Saturación de Oxígeno (%)	90,9	76,7
Sólidos Suspendidos (mg L^{-1})	18,5	38,10
Nitratos ($\text{mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$)	0,56	0,63
Fósforo soluble reactivo (mg L^{-1})	0,072	0,078
Fósforo total (mg L^{-1})	0,103	0,112

Hábitat y otros Ephemeroptera presentes. El río San Carlos es característico de tierras bajas por presentar un lecho predominado por sustratos de grava y arena, lo cual coincide con lo indicado por Domínguez et al. (2006) en relación al hábitat de *Varipes*. Se observaron algas adheridas a las partículas de grava de mayor tamaño. Las aguas del río San Carlos presentaron valores alcalinos de pH y cantidades moderadas de sólidos suspendidos y nutrientes (Tabla 1). Por otra parte, la cuenca y riberas del río San Carlos en la zona de estudio se encuentran moderadamente intervenidas por desarrollos urbanos y actividades agropecuarias, lo que podría indicar cierta tolerancia de la especie a la perturbación del hábitat por actividades humanas.

En las muestras también se encontraron individuos de *Camelobaetidius* sp. (Baetidae), *Thraulodes* sp. (Leptophlebiidae) y *Tricorythodes* sp. (Leptohyphidae). *Varipes sancarlos* representó 20% de la abundancia de los efemerópteros colectados.

Agradecimientos

Agradecemos el valioso apoyo brindado por Agrobigott y Provita para la realización de este proyecto, especialmente damos las gracias a Leonardo Gutiérrez, Diana Esclasans, Juan Papadakis y Diego Giraldo.

Literatura citada

A.P.H.A. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21 th ed. APHA, Washington, D.C., U.S.A.

- DOMÍNGUEZ, E.; MOLINERI, C.; PESCADOR, M. L., HUBBARD, M. D.; NIETO, C. 2006. Ephemeroptera of South America, Aquatic Biodiversity of Latin America (ABLA Series). Volume 2, Sofia-Moscow, 218 pp.
- GUEVARA, E. F.; PAREDES, N.; CARBALLO; RUMBO, L. 2006. Dry season modeling in Cojedes State, Venezuela by drought analysis of Tirgua river flows. American Geophysical Union Conference Proceedings Marzo 20-22, 2006, pp. 73-84.
- LUGO-ORTIZ, C. R.; MCCAFFERTY, W. R. 1998. Five new genera of Baetidae (Insecta: Ephemeroptera) from South America. *Annals of Limnology* 34: 57-73.
- NIETO, C. 2004. Redescription of *Varipes* (Ephemeroptera: Baetidae), with the Description of New Species from Bolivia and Argentina. *Aquatic Insects* 26: 161-173.
- RANDOLPH, R. P.; MCCAFFERTY, W. P. 2000. Mexican mayflies: inventory and additions (Ephemeroptera). *Annals of Limnology* 36: 113-121.
- SALLES, F. F.; BATISTA, J. D. 2004. The presence of *Varipes* Lugo-Ortiz & McCafferty (Ephemeroptera: Baetidae) in Brazil, with the description of a new species. *Zootaxa* 456: 1-6.
- TRAVER, J. R.; EDMUNDS, G. F. 1968. A revision of the Baetidae with spatulate-clawed nymphs (Ephemeroptera). *Pacific Insects* 10: 629-677.
- WALTZ R. D.; BURIAN, S. K. 2008. Ephemeroptera. pp. 181-236. En: Merrit, R.W.; Cummins, K. W.; Berg, M. B. (Eds.) An Introduction to the Aquatic Insects of North America (4ta edición). Kendall/Hunt. Dubuque. 1.214 p.

Recibido: 23-dic-2010 • Aceptado: 10-nov-2011

- Sugarcane 16-20
Sumilarv 91-94
Tabla de vida 21-25, 62-64, 66, 117
Tamarindus indica 174
Tanypodinae 162, 163
Tarsonemidae 228
Taxonomía 331, 341
Taxonomy 331, 341
Tecia solanivora 1, 3, 5-7, 27, 33, 34
Temefos 9, 92, 94
Tenebrionidae 251
Termitas 36-41
Tetranychidae 62, 65, 66
Tetranychus cinnabarinus 21-25, 62, 63
Tetranychus desertorum 62
Tetrastichus sp 240
Theobroma 80
Thrasorinae 137, 139
Thrasorino 137
Thrasorus 137
Tobón Flor Ángela 251
Tolerante 16
Tomate 210
Torres C Yusdiel 162
Tortricidae 67, 68, 70
Toxicidad 192, 269
Trialeurodes vaporariorum 210
Trichogramma 238
Trichogramma acacioi 238
Trichogramma caiaposi 238
Trichogramma demoraesi 238
Trichogramma maxacalii 238
Trichogramma pratissolii 238
Trichogramma soaresi 238
Trichogrammatidae 238
Tricorythodes caunapi 327
Tropics 305
Ulmoides dermestoides 251
Uribe S. Sandra Inés 273
Valle Javier 269
Vargas-Osuna Enrique 192
Varipes 346
Varipes sancarlos n. sp. 346
Vector 8-15, 77-94
Veliidae 350
Vendramim José D. 16
Viçosa 80 82 83
Vigna radiata 251
Villalobosothignus 128
Villamizar R Laura 27
Wasmannia auropunctata 279
Witzgall Peter 1
Xerosaprinus sp 103, 105-108
Xilanasa 167
Xilella fastidiosa 77
Xilófagos 56 57
Xylocopa 313
Xylocopini 313
Yepes Francisco 152
YMMV 77-79
You-Qing Luo 240
Zambrano-González Giselle 117
Zamora E Humberto 183
Zea mays 82, 36, 217
Zhang Mengqi 95
Zhuang Quan 95, 96, 98, 100, 102
Zingiberaceae 357
Zoocria 117-119

Fe de erratas número 37 (2)

Por error involuntario el trabajo de la página 244 a la 248 y los trabajos de las páginas 318 a la 359 tienen como número de revista 37 (1) cuando en realidad es 37 (2).

Hemiptera acuáticos asociados a los estuarios de la costa pacífica colombiana

Aquatic Hemiptera associated to estuaries of the colombian pacific coast

DORA N. PADILLA-GIL¹ y OSVALDO ARCOS P.²

Resumen: la mayoría de los hemípteros acuáticos son insectos predadores que habitan en agua dulce, estuarios y mar. Las familias que incluyen especies de hábitat salobres y estuarios son Gerridae y Veliidae. Con el fin de contribuir al conocimiento faunístico y ecológico de los hemípteros acuáticos asociados a los estuarios de la Costa Pacífica de Colombia y de la región del Chocó biogeográfico, se estudiaron seis estuarios del municipio de Tumaco: El Bajito, El Morro, Villa del Sol, Agua clara, Chilvi, e Inguapi, donde se realizaron recolecciones y se caracterizó el hábitat a través de la medición de algunos parámetros físicoquímicos del agua. En total se colectaron diez especies, pertenecientes a tres familias: Gerridae con cuatro géneros *Limnogonus*, *Rheumatobates*, *Telmatometroides* y *Trepobates*; Veliidae, con dos géneros *Microvelia* y *Rhagovelia*; y un Mesoveliidae, con *Mesovelia*. Se caracteriza el hábitat y se señalan las especies más abundantes por sitio de muestreo. Se registra por primera vez en Colombia la especie *Microvelia inquilina* y se adicionan nuevos datos para las especies en la costa Pacífica del departamento de Nariño.

Palabras clave: Pacífico Tropical Este. Patinadores neotropicales. Gerridae. Veliidae. Manglar.

Abstract: Most of the aquatic hemipterans are predatory insects that inhabit fresh waters, estuaries and a few live in the open ocean. Ocean-dwelling and estuarine-inhabiting families include Gerridae and Veliidae. With the purpose of contributing to the biodiversity and ecology of aquatic hemipterans associated with estuaries of the Pacific coast of Colombia and the Chocó biogeographical region, six estuaries were studied from the municipality of Tumaco: El Bajito, El Morro, Villa del Sol, Agua clara, Chilvi, and Inguapi. Aquatic hemiptera were collected and each habitat was characterized measuring physical-chemical parameters of the water. In total, ten species were collected belonging to four genera *Limnogonus*, *Rheumatobates*, *Telmatometroides*, and *Trepobates* (Family: Gerridae); and two genera *Microvelia* and *Rhagovelia* (Family: Veliidae); and Mesoveliidae, with *Mesovelia*. The habitat was characterized and the most abundant species by sampling place are showed. The species *Microvelia inquilina* is recorded for the first time. New collection data are added for the species of the Pacific coast of the department of Nariño.

Key words: Eastern Tropical Pacific. Neotropical water striders. Gerridae. Veliidae. Mangrove.

Introducción

La mayoría de hemípteros acuáticos son insectos predadores que viven en la película superficial del agua; habitan en ecosistemas dulceacuicolas, estuarios y marinos. En el Océano Pacífico Tropical Este (PTE) se encuentran tres especies de *Halobates* (Gerridae) pelágicas, con registros de colecta en Colombia: *H. splendens* Witlaczki, 1886, *H. sobrinus* White, 1883 y *H. micans* Eschscholtz, 1822, esta última también presente en el Océano Atlántico (Cheng *et al.* 2010; Molano-Rendón *et al.* 2005). De acuerdo con Polhemus y Manzano (1992), otras especies del PTE con distribución en Colombia pertenecen a los géneros *Rheumatobates* (tres spp.) y *Telmatometroides* (una sp.) de Gerridae; *Microvelia* y *Platyvelia* cada uno con una especie y *Rhagovelia* grupo *salina* con tres especies (Veliidae) y Mesoveliidae con dos géneros *Mesovelia* y *Darwinivelia*, cada uno con una especie.

Halobates es el género más conocido respecto a su biología y ecología (Cheng 1985), con cinco especies pelágicas, únicas capaces de colonizar este ambiente, su distribución y abundancia está relacionada con la temperatura del agua, las corrientes oceánicas y la exposición al sol del cuerpo de agua. La mayoría prefieren temperaturas mayores a 20°C y tanto la composición de la cutícula como el color actúan en sinergia

para la protección de los rayos solares (Usinger y Herring 1957; Andersen y Cheng 2004).

Buena parte de los estudios biológicos y ecológicos de los hemípteros acuáticos asociados a ecosistemas de manglar o marinos neotropicales se refieren a determinadas especies y temas específicos p. e. *Halobates robustus* Barber, 1925 de las Islas Galápagos, su alimentación y comportamiento como predador y agregación (Foster y Treherne 1980); las ninfas de *H. robustus* y *H. micans*, en Galápagos (Cheng y Maxfield 1980); *H. sobrinus*, del PTE, oviposición en mar abierto (Cheng y Pitman 2002); *H. micans*, en el Atlántico Norte, patrones de abundancia vs. latitud (Stoner y Humphris 1985); *Rheumatobates aestuarius* Polhemus, 1969, en la costa de Baja California en México, asociada a las raíces de mangle (Cheng y Lewin 1971); *Rhagovelia plumbeus* (Uhler, 1894), ampliamente distribuida desde Florida (E.U.) hasta las Islas del Caribe y *H. hawaiiensis* Usinger, 1940 de Hawai, respecto a los atrayentes sexuales (Cheng y Roussis 1998; Tsoukatou *et al.* 2001).

La costa del Pacífico de Colombia es altamente diversa como lo señalan los trabajos de Padilla-Gil (2010a, 2010b, 2010c), con la descripción de nueve especies: Notonectidae: *Buenoa* (cinco spp.), *Martarega* (dos spp.); Gerridae: *Tachygerris* (una sp.); Veliidae: *Rhagovelia* (una sp.) todas colec-

¹ Ph. D., Profesora Asociada, Universidad de Nariño, Ciudad Universitaria Torobajo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Bloque 3, piso 4, Pasto, Nariño, Colombia. dnpadilla@udenar.edu.co Autora para correspondencia. ²Zootecnista. Laboratorista, Universidad de Nariño, Ciudad Universitaria Torobajo.

tadas en ecosistemas acuáticos dulceacuicolas cercanos a la costa, en el municipio de Tumaco. Por otra parte, dos especies de *Rhagovelia* grupo salina: *R. aquaclara* Padilla-Gil, 2010 y *R. rosarensis* Padilla-Gil, 2010 fueron colectadas en estuarios del municipio de Tumaco.

En el litoral del Pacífico del departamento de Nariño, los únicos trabajos que hacen referencia a los hemípteros acuáticos asociados a estuarios son los de Polhemus y Manzano (1992) quienes incluyen dentro de los sitios de colecta la localidad de Mosquera y Padilla-Gil (2010d) en Tumaco. Por lo anterior y debido al desconocimiento de los hemípteros acuáticos presentes en los estuarios de la mayor parte de Tumaco, el objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la biota de sus estuarios, así como determinar y caracterizar su hábitat.

Materiales y Métodos

Área de estudio. El municipio de Tumaco se ubica a los 1°48'N 78°51'W, con una temperatura media de 26,2°C y una precipitación media anual de 2.191mm; vegetación, bosque húmedo tropical. Esta zona está formada por terrenos planos o ligeramente ondulados, correspondientes a la llanura del Pacífico. Los estuarios de la costa Pacífica del municipio de Tumaco representan una unidad ecogeográfica, con altitud entre 0-10m y según Rangel (2004) se definen como una zona de influencia del agua de mar y de los ríos que desembocan allí; con vegetación tipo manglar, comunidades de playa y bosques dominados por el nato *Mora megistosperma* Britton & Rose. Se seleccionaron seis estuarios cercanos a la costa Pacífica de Tumaco (Fig. 1): -El Bajito, 1°49'20"N 78°46'19"W, 2m.s.n.m. -El Morro, 1°49'71"N 78°43'82"W, 2m.s.n.m. -Villa del Sol, 1°49'49"N 78°44'26"W, 1m.s.n.m. -Agua clara, 1°42'65"N 78°46'37"W, 4m.s.n.m. -Chilvi e Inguapi 1°41'78"N 78°45'15"W, 5m.s.n.m.

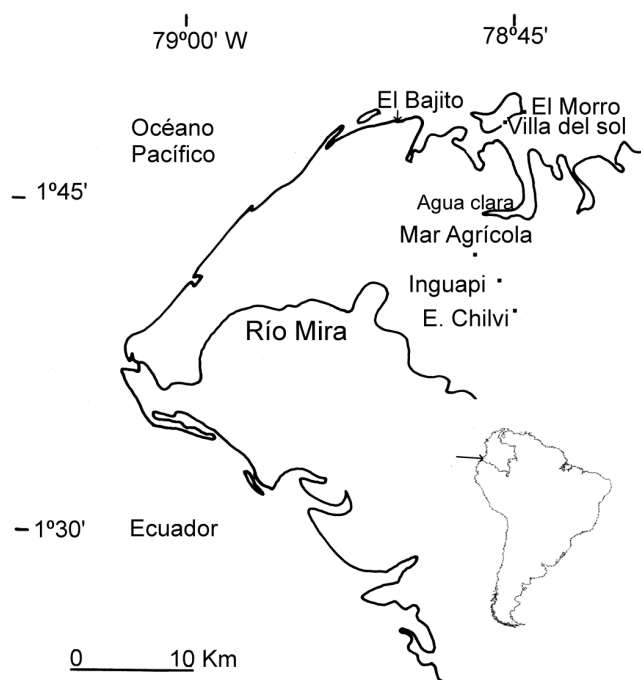


Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo.

Colecta del material. Se realizó una salida de campo del 21 al 25 de junio del 2010 y se practicó un muestreo en cada sitio. Los hemípteros acuáticos se colectaron mediante una red de mano, malla de mm; tres colectores trabajaron simultáneamente en cada sitio de muestreo por dos horas. Los especímenes se depositaron en frascos con alcohol al 70% y luego se transportaron al laboratorio de la Universidad de Nariño, Pasto, donde posteriormente se procesaron y determinaron.

Caracterización del hábitat. Se midieron los siguientes parámetros fisicoquímicos para caracterizar el agua: pH, pH-metro; Oxígeno disuelto (mg/L), método Winkler (APHA 1996); conductividad (S/m), conductímetro digital; temperatura del agua y del ambiente, termómetro. Se determinaron los parámetros en tres muestras réplicas, por cuerpo de agua.

Determinación del material. Los principales autores consultados son: Nieser y Alkins-Koo (1991), Polhemus y Manzano (1992), Nieser y Melo (1997), Aristizábal (2002). Todo el material está depositado en la colección de entomología de la Universidad de Nariño [PSO-CZ] y se relaciona como material examinado. Las abreviaturas utilizadas son: macho (M), hembra (H), áptero (apt), macróptero (macr).

Resultados y Discusión

Se capturaron un total de 334 individuos en los seis estuarios, correspondientes a diez especies, siete géneros y tres familias: *Limnogonus*, *Rheumatobates*, *Telmatometroides* y *Trepobates* (Gerridae); *Microvelia* y *Rhagovelia* (Veliidae) y *Mesovelia* (Mesoveliidae). Las localidades que presentaron el mayor número de individuos fueron Villa del Sol con 96 individuos (28,7%), seguida de El Bajito con 68 individuos (20,3%). A continuación se indican las especies colectadas, abundancia, hábitat y algunas observaciones por estuario.

El Bajito. Se capturaron tres especies: *Rhagovelia arcuata* (Polhemus & Manzano, 1992). 1H apt., *Rheumatobates probolicornis* Polhemus & Manzano, 1992. 17M apt, 28H apt. y *Telmatometroides rozeboomi* (Drake & Harris, 1937). 6M apt, 16H apt.

El hábitat corresponde a ecosistema de manglar (Tabla 1), suelo lodoso, los especímenes se colectaron en marea baja; esta parte de la costa tiene contacto directo con el mar. En total se colectaron 68 individuos, la especie más abundante de este sitio es *Rheumatobates probolicornis* (66,1%), sólo presente en ésta localidad; anteriormente colectada en Mosquera, también en la costa Pacífica del departamento de Nariño y en los departamentos de Chocó y Valle del Cauca (Polhemus y Manzano 1992).

El Morro. Se capturaron cuatro especies: *Limnogonus franciscanus* (Ståhl, 1859). 1M macr., *Rheumatobates longisetosus* Polhemus & Manzano, 1992. 3M apt., *Mesovelia mulsanti* White, 1879. 2M macr, 2H macr., y *Telmatometroides rozeboomi*. 17M apt, 33H apt.

El hábitat corresponde a ecosistema de manglar (Tabla 1), suelo arenoso, los especímenes se colectaron en marea baja en un brazo de mar, rodeado por vegetación secundaria. En total se colectaron 58 individuos, La especie más abundante es *Telmatometroides rozeboomi* (86,2%). *Limnogonus fran-*

ciscanus y *Mesovelvia mulsanti* se las puede considerar como especies visitantes pues todos los especímenes colectados son alados, euritolerantes y estas especies habitan en ecosistemas dulceacuícolas cercanos a la costa.

Villa del Sol. Se capturaron cuatro especies: *Trepobates taylori* (Kirkaldy, 1899). 1M macr., *Mesovelvia mulsanti*. 2H macr., *Telmatometroides rozeboomi*. 13M apt, 19H apt. y *Rheumatobates longisetosus*. 23M apt, 38H apt.

Su hábitat corresponde a estero, rodeado por vegetación secundaria, poco profundo y suelo lodoso, muy cercano a calles, con alta intervención antrópica; agua con baja cantidad de oxígeno disuelto (Tabla 1). En total se colectaron 96 individuos, la especie más abundante es *Rheumatobates longisetosus* (63,5%); igual que en el caso anterior *Trepobates taylori* y *Mesovelvia mulsanti*, también se pueden considerar como especies visitantes.

Agua clara. Se capturaron cuatro especies: *Trepobates taylori*. 1M apt., *Rheumatobates longisetosus*. 2M apt, 3H apt., *Telmatometroides rozeboomi*. 5M apt, 3H apt. y *Rhagovelvia aguacilara*. 7M apt, 6H apt.

Se trata de un estero rodeado por mangle, los especímenes fueron colectados en marea baja en las raíces superficiales del mangle, el cuerpo de agua permanece umbroso por el follaje de la vegetación circundante; presenta alta intervención antrópica y cerca de vías; agua con baja concentración de oxígeno (Tabla 1). En total se colectaron 27 individuos, la especie más abundante es *Rhagovelvia aguacilara* (48,1%).

Chilvi. Se capturaron tres especies: *Microvelia inquilina* Polhemus & Hogue, 1972. 1M apt., *Rhagovelvia aguacilara*. 2M apt, 7H apt. y *Rhagovelvia arcuata*. 26M apt, 11H apt.

Es un estero rodeado por mangle, los especímenes fueron colectados en marea baja en las orillas del estero, el cuerpo de agua permanece umbroso por el follaje de la vegetación circundante; presenta ligera intervención antrópica; agua con baja concentración de oxígeno (Tabla 1).

En total se colectaron 47 individuos con *Rhagovelvia arcuata* como la especie más abundante (79%), comparte el hábitat con otras dos especies de velidos. *Microvelia inquilina*, que es nuevo registro para Colombia, distribuida en Costa Rica (Puntarenas; Boca de Barranca) (Polhemus y Manzano 1992).

Inguapi. Se capturaron cuatro especies: *Microvelia longipes* Uhler, 1894. 1H macr., *Microvelia inquilina*. 1M apt, 1H apt., *Rheumatobates longisetosus*. 1M apt, 2H apt. y *Rhagovelvia aguacilara*. 21M apt, 11H apt.

Es un estero rodeado por bosque, los especímenes fueron colectados en marea baja, el cuerpo de agua permanece umbroso por el follaje de la vegetación circundante; agua con alta concentración de oxígeno (Tabla 1).

En total se colectaron 38 individuos, la especie más abundante es *Rhagovelvia aguacilara* y comparte el hábitat con dos especies de *Microvelia*: *M. longipes*, especie visitante, habitante de ecosistemas dulceacuícolas cercanos y con *M. inquilina*, al parecer restringida a estuarios o ambientes marinos.

Aspectos generales. Los ecosistemas de manglar, donde habitan estos hemípteros acuáticos, se caracterizan por temperaturas altas tanto ambientales (25-30°C) como del agua (26,5-30°C), pH neutro 6-7,5 y conductividad de 1 S/m; con saturación de oxígeno variable 40-110% (Tabla 1).

Todos los especímenes son más fácilmente colectados en marea baja. La diversidad por ecosistemas es baja, El Bajito y Chilvi presentan tres especies y las otras localidades cuatro especies. Hay especies ampliamente distribuidas como es el caso de *Telmatometroides rozeboomi*, que prefiere aguas abiertas, con intervención antrópica y *Rheumatobates longisetosus* que se encuentra en los canales con aguas eutróficas. *Microvelia inquilina* se recolectó en dos esteros, Chilvi e Inguapi, éstos se encuentran muy cercanos, en la hacienda Mar Agrícola y mantienen bosque poco intervenido en su proximidad. Esta especie está asociada a los agujeros de cangrejos *Ucides* en la costa Pacífica de Costa Rica (Polhemus y Manzano 1992). *Rhagovelvia aguacilara* prefiere condiciones de aguas umbrasas rodeadas por vegetación; es la especie más abundante en los esteros Inguapi y Aguacilara. Por otra parte es una especie hasta ahora registrada a los estuarios de la costa del municipio de Tumaco, especie similar es *Rhagovelvia colombiana*, no se colectó en estos sitios, pero está presente en la costa Pacífica de los departamentos del Cauca y del Valle (Polhemus y Manzano 1992).

Rheumatobates probolicornis está restringida al Bajito, ecosistema abierto, rodeado de mangle y en contacto con mar abierto; no se encontró con ninguna otra especie del mismo género, Polhemus y Manzano (1992) la registran junto con *R. carvalhoi* Drake & Harris, 1944, esta última especie no se colectó en este estudio.

Cuatro especies de las diez colectadas, *Limnogonus franciscanus*, *Mesovelvia mulsanti*, *Microvelia longipes* y *Trepobates taylori* probablemente provienen de ecosistemas dulceacuícolas cercanos y que llegaron como visitantes. No se colectaron especies de los géneros *Halobates*, *Platyvelia* y *Darwinivelia*, registradas para el Pacífico de Colombia por Polhemus y Manzano (1992), posiblemente porque su biotopo presenta otras condiciones ambientales. De las diez especies

Tabla 1. Características físico-químicas de las aguas superficiales de seis Estuarios de Tumaco, junio 2010, en condiciones normales.

Parámetros físico-químicos	El Bajito	El Morro	Villa del Sol	Agua clara	Chilvi	Inguapi
Temperatura aire °C	25,5	29	30	27	25	25,5
Temperatura agua °C	30	29	28,5	28	26,5	27
pH	7,5	7,5	7,5	6	6	6
Conductividad S/m	1	1	1	1	1	1
Oxígeno disuelto mg/L	110	110	40	52	65	108

colectadas en los seis estuarios estudiados, cuatro especies presentan distribución restringida para Colombia, es posible que las condiciones ambientales y latitudinales (próximas al Ecuador) determinen su abundancia y distribución.

Se determinaron las especies de hemípteros acuáticos presentes en seis estuarios de la costa Pacífica del municipio de Tumaco y se caracterizó el hábitat. Seis especies están estrechamente asociadas a los estuarios y cuatro al parecer son visitantes, euritolerantes respecto a la salinidad del agua.

Los ecosistemas estudiados representan comunidades ecológicas cercanas espacialmente, que comparten temperaturas mayores a 26,5°C e igual conductividad; sin embargo su composición y abundancia de hemípteros acuáticos es ligeramente diferente; al parecer estos aspectos están relacionados con determinados ambientes, cuyos biotopos se caracterizan por la vegetación circundante (vg., manglar), el sustrato, la proximidad al mar abierto, el grado de eutrofización del cuerpo de agua y la tolerancia específica ante los factores ambientales. Estas observaciones son preliminares y están sujetas al tiempo y espacio en que se realizaron, sin embargo sirven de base para futuras investigaciones sobre la biología y ecología de los hemípteros acuáticos en el litoral pacífico de Colombia y del Chocó biogeográfico.

Se contribuye con un nuevo registro para Colombia de la especie *Microvelia inquilina* y se proporcionan nuevos datos de distribución geográfica y ecológicos para las especies incluidas en este estudio, principalmente para *R. aquaclara* y *Rheumatobates* spp.

Agradecimientos

A la Universidad de Nariño, VIPRI por financiar esta investigación.

Literatura citada

- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). 1996. Standard methods for the examination of water and wastewater. The Association. Washington. USA. 406-414p.
- ANDERSEN, N. M.; CHENG, L. 2004. The marine *Halobates* (Heteroptera: Gerridae): biology, adaptations, distribution, and phylogeny. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 42: 119-180.
- ARISTIZÁBAL, H. 2002. Los hemípteros de la película superficial del agua en Colombia. Parte I. Familia Gerridae. Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Editora Guadalupe, Bogotá. Colombia. 239 p.
- CHENG, L.; SPEAR, L.; AINLEY, D. G. 2010. Importance of marine insects (Heteroptera: Gerridae, *Halobates* spp.) as prey of Eastern Tropical Pacific sea birds. *Marine Ornithology* 38: 91-95.
- CHENG, L.; PITMAN, R. 2002. Mass Oviposition and Egg Development of the Ocean-Skater *Halobates sobrinus* (Heteroptera: Gerridae). *Pacific Science* 56 (4): 441-447.
- CHENG, L.; ROUSSIS, V. 1998. Sex attractant in the marine insect *Trochopus plumbeus* (Heteroptera: Veliidae): a preliminary report. *Marine Ecology Progress Series* 170: 283-286.
- CHENG, L. 1985. Biology of *Halobates* (Heteroptera: Gerridae). *Annual Review of Entomology* 30: 111-135.
- CHENG, L.; MAXFIELD, L. 1980. Nymphs of two sea-skaters, *Halobates robustus* and *H. micans* (Heteroptera: Gerridae). *Systematic Entomology* 5: 43-47.
- CHENG, L.; LEWIN, R. 1971. An interesting marine insect, *Rheumatobates aestuarius* (Heteroptera: Gerridae), from Baja California, Mexico. *Pacific Insects* 13 (2): 333-341.
- FOSTER, W. A.; TREHERNE, J.E. 1980. Feeding, Predation and Aggregation Behaviour in a Marine Insect, *Halobates robustus* Baber (Hemiptera: Gerridae), in the Galapagos Islands. *Proceeding of the Royal Society* 209 (1177): 539-553.
- MOLANO-RENDÓN, F.; CAMACHO-PINZÓN, D. L.; SERRATO-HURTADO, C. 2005. Gerridae (Heteroptera: Gerromorpha) de Colombia. *Biota Colombiana* 6 (2): 163-172.
- NIESER, N.; MELO, A. 1997. Os heterópteros aquáticos de Minas Gerais. Editora UFMG. Belo Horizonte. Brasil. 177 p.
- NIESER, N.; ALKINS-KOO M. 1991. The water bugs of Trinidad & Tobago. Occasional Paper N. 9. Department of Zoology. The University of the West Indies. St. Augustine, Trinidad. 127 p.
- PADILLA-GIL, D. N. 2010a. Five new species of *Buenoa* (Hemiptera: Heteroptera: Notonectidae) from Colombia. *Zootaxa* 2411:22-32.
- PADILLA-GIL, D. N. 2010b. Two new species of *Martarega* (Hemiptera: Heteroptera: Notonectidae) and a new species of *Tachygerris* (Hemiptera: Heteroptera: Gerridae) from Colombia. *Zootaxa* 2560: 61-68.
- PADILLA-GIL, D. N. 2010c. A new species of *Rhagovelia* in the *R. elegans* group from Colombia. (Heteroptera: Veliidae). *Aquatic Insects* 32 (4): 293-297.
- PADILLA-GIL, D. N. 2010d. Two new species of *Rhagovelia* in the Salina group from Colombia (Hemiptera: Heteroptera: Veliidae). *Zootaxa* 2621: 63-68.
- POLHEMUS, J. T.; MANZANO, M. A. 1992. Marine Heteroptera of the Eastern Tropical Pacific (Gelastocoridae, Gerridae, Mesoveliidae, Saldidae, Veliidae) p. 302-320. En: Quintero, D.; Aiello, A. (eds). *Insects of Panama and Mesoamerica, Select Studies*. Oxford University Press, Oxford.
- RANGEL-CH, J. O. 2004. Ecosistemas del Chocó biogeográfico: síntesis final. p 937-976. En: Rangel-Ch, J. O. (ed.). *Colombia Diversidad Biótica IV: El Chocó biogeográfico/Costa Pacífica*. Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá. Colombia. 1024 pp.
- STONER, A. W.; HUMPHRIS, S. E. 1985. Abundance and distribution of *Halobates micans* (Insecta: Gerridae) in the northwest Atlantic. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 32 (6): 733-739.
- TSOUKATOU, M.; CHENG, L.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. 2001. Chemical and behavioral responses of the marine insect *Halobates hawaiiensis* (Heteroptera: Gerridae). *Zeitschrift für Naturforschung* 56 (7-8): 597-602.
- USINGER, R. L.; HERRING, J. L. 1957. Notes on marine water striders of the Hawaiian Islands (Hemiptera: Gerridae). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 16 (2): 281-283.

Recibido: 13-ago-2010 • Aceptado: 31-mar-2011

- Sugarcane 16-20
Sumilarv 91-94
Tabla de vida 21-25, 62-64, 66, 117
Tamarindus indica 174
Tanypodinae 162, 163
Tarsonemidae 228
Taxonomía 331, 341
Taxonomy 331, 341
Tecia solanivora 1, 3, 5-7, 27, 33, 34
Temefos 9, 92, 94
Tenebrionidae 251
Termitas 36-41
Tetranychidae 62, 65, 66
Tetranychus cinnabarinus 21-25, 62, 63
Tetranychus desertorum 62
Tetrastichus sp 240
Theobroma 80
Thrasorinae 137, 139
Thrasorino 137
Thrasorus 137
Tobón Flor Ángela 251
Tolerante 16
Tomate 210
Torres C Yusdiel 162
Tortricidae 67, 68, 70
Toxicidad 192, 269
Trialeurodes vaporariorum 210
Trichogramma 238
Trichogramma acacioi 238
Trichogramma caiaposi 238
Trichogramma demoraesi 238
Trichogramma maxacalii 238
Trichogramma pratissolii 238
Trichogramma soaresi 238
Trichogrammatidae 238
Tricorythodes caunapi 327
Tropics 305
Ulumoides dermestoides 251
Uribe S. Sandra Inés 273
Valle Javier 269
Vargas-Osuna Enrique 192
Varipes 346
Varipes sancarlos n. sp. 346
Vector 8-15, 77-94
Veliidae 350
Vendramim José D. 16
Viçosa 80 82 83
Vigna radiata 251
Villalobosothignus 128
Villamizar R Laura 27
Wasmannia auropunctata 279
Witzgall Peter 1
Xerosaprinus sp 103, 105-108
Xilanasa 167
Xilella fastidiosa 77
Xilófagos 56 57
Xylocopa 313
Xylocopini 313
Yepes Francisco 152
YMMV 77-79
You-Qing Luo 240
Zambrano-González Giselle 117
Zamora E Humberto 183
Zea mays 82, 36, 217
Zhang Mengqi 95
Zhuang Quan 95, 96, 98, 100, 102
Zingiberaceae 357
Zoocria 117-119

Fe de erratas número 37 (2)

Por error involuntario el trabajo de la página 244 a la 248 y los trabajos de las páginas 318 a la 359 tienen como número de revista 37 (1) cuando en realidad es 37 (2).

Scientific note

Predation behavior of the *Myrmeleon brasiliensis* (Neuroptera: Myrmeleontidae) larval instars

Comportamiento de depredación de los estadios larvales de *Myrmeleon brasiliensis* (Neuroptera: Myrmeleontidae)

LUCIMARA MODESTO NONATO¹ and TATIANE DO NASCIMENTO LIMA²

Abstract: *Myrmeleon brasiliensis* larvae are predators that use the sit-and-wait tactic to catch their prey, and to fulfill this pit-making funnel traps in the sandy soil and remain buried waiting for prey to slip. The objective of this study was to observe the predation behavior of larvae of *M. brasiliensis* in the three larval instars, for this leaf cut ant were collected manually and offered within the plastic pots as prey for 14 larvae of 1st instar larvae, 33 of 2nd and 3rd instar. It was counted the number of attacks of the predator to prey, the number of escapes from jail and the success of prey capture for each larva of *M. brasiliensis*. The larvae of *M. brasiliensis* 1st instar attacked more times its prey, followed by larvae of 2nd and 3rd instar. On the number of escape of prey, there was no significant difference in this behavior among larvae. Regarding the success in capturing prey, the larvae of 3rd instar were more successful, with a predation rate of 96.96%, followed by the larvae of 2nd (69.70%) and 1st instar (14.28 %).

Key words: Ant-lion. Foraging. Predator.

Resumen: Las larvas de *Myrmeleon brasiliensis* son depredadoras que utilizan la estrategia de forrajeo de tipo “sit-and-wait” para capturar a sus presas y así construyen trampas en forma de embudo en el suelo arenoso y permanecen enterradas esperando que caigan las presas. El objetivo de este trabajo fue observar el comportamiento de depredación de las larvas de *M. brasiliensis* en los tres instares larvales, para eso, se recolectaron hormigas cortadoras y se ofrecieron manualmente como presas a 14 larvas de 1^o instar y 33 de 2^o y 3^o instar. Se contó el número de ataques del depredador a la presa, el número de escapes de la presa y el éxito de captura de presas de cada larva de *M. brasiliensis*. Las larvas de *M. brasiliensis* de 1^o instar atacaron más a sus presas, seguidas por las larvas de segundo y tercer instar. En cuanto al número de escapes de las presas, no se observó diferencia significativa para ese comportamiento entre las larvas. En relación al éxito en la captura de las presas, las larvas de 3^o instar presentaron más éxito, con una tasa de depredación de 96,96%, seguida por las larvas de 2^o (69,70%) y 1^o instar (14,28%).

Palabras claves: Depredador. Forrajeo. Hormiga león.

Introduction

Several types of foraging strategies can be employed by predators in search for preys. These models may range from the ambush, in which the predator waits for its prey, to active search, when, as the name suggests, the predator hunts the prey (Nilsson 2006; Scharf *et al.* 2006). Depending on the behavior, the capture of preys may be determined by several factors, such as their morphology, the kind of prey, the structure of habitat, the presence of competitors, the physical conditions and the interactions among them (Endler 1991). In this context, a large array of tactics of capture and subjugation of preys arise; and, for the same species, adults and young specimens may adopt diverse strategies (Bekoff 1983).

Ant-lion (Neuroptera, Myrmeleontidae) larvae are predators that use the tactics of ambush for catching their preys. These larvae build funnel-shaped traps in the sandy soil and remain interred while waiting for their preys, arthropods that move on the soil surface, to fall into their traps (Crowley and Linton 1999; Lomáscolo and Farji-Brener 2001; Napolitano 1998). On falling into the traps, the preys find difficulty escaping because of the sand granulation and the inclination of the funnel walls, and are therefore easily subjugated by the larvae (Devetak 2005; Devetak *et al.* 2005). Other factors, such as the availability of sites with dry and sandy soil for

the building of the funnels, the texture and temperature of soil, the abundance of preys and the competition for space between the larvae are variables that may affect the costs and benefits of foraging (Faria *et al.* 1994; Heinrich and Heinrich 1984; MacClure 1976; Prado *et al.* 1993).

Larvae of ant-lion *Myrmeleon brasiliensis* (Návas, 1914) go through three instars before the formation of pupa. Each instar lasts about 26 days, depending on the diet of the larvae (Missirian *et al.* 2006). First-, second- and third-instar *M. brasiliensis* present a mean body size of 4.3 (S.D.: $\pm$ 0.55mm), 6.1 ($\pm$ 0.92mm) and 9.9 ($\pm$ 1.23mm), respectively (Missirian *et al.* 2006). Lima and Faria (2007) observed that there is a positive relation between body size of *M. brasiliensis* and trap size, and researchers who studied other ant-lion larvae species (e.g. Allen and Croft 1985; Day and Zalucki 2000; Faria *et al.* 1994; Griffiths 1980, 1986; Heinrich and Heinrich 1984) observed that the increase in both body size and trap size are positively related to the success of capturing preys.

Thus, because the changes of instars of *M. brasiliensis* larvae yield an increase in their body size and, consequently, in their trap size, the larvae's changes of phases may eventually affect their foraging behavior. The objective of this note was to describe the way different larval stages of *M. brasiliensis* behave during the capture of preys. This study presents

¹ B. Sc. Univ. Federal do Mato Grosso do Sul, Departamento de Mestre em Ecologia e Conservação. Biologia/CCBS, Cidade Universitária s/nº, C. postal 549, 79070-900, Campo Grande, MS. ² B. Sc. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação/CCBS, Univ. Federal do Mato Grosso do Sul Cidade Universitária s/nº, C. postal 549, 79070-900, Campo Grande, MS. E-mail: nlntati@yahoo.com. Corresponding author.

three specific objectives: 1) to compare the number of times *M. brasiliensis* ant-lions attack their preys in the three instars; 2) to compare the number of times the preys of *M. brasiliensis* manage to escape in the three instars; and 3) to compare the prey capture success by *M. brasiliensis* in the three instars.

Materials and Methods

M. brasiliensis larvae were collected in the municipality of Aquidauana, Mato Grosso do Sul, in a permanent protection area - Área de Proteção Permanente (APP) (20°26'25"S, 55°39'21"W) - belonging to the State University of Mato Grosso do Sul, in October 2008. The experiments were conducted in the Zoology Laboratory of the Federal University of Mato Grosso do Sul, campus of Campo Grande, from October 2008 to May 2009.

The larvae had their funnel diameter noted and were later collected with the help of a spoon and stored in plastic bags with some sand from the site of origin to be transported to the laboratory. In order to differentiate the instars, the larvae had their body length (head-abdomen) and cephalic capsule width measured with the help of a digital caliper (resolution 0.01mm). After the trial they were stored individually in transparent plastic pots (13cm in length and 10cm in diameter) with sand.

To assess the predation behavior, the following experiment was performed: workers of leaf-cutting ant, *Atta laevigata* (S. Smith, 1858), with mean size of 5.78 ± 1.09 mm, were collected and manually offered in the plastic pots as preys for 14 first-instar larvae and 33 second- and third-instar larvae. Each larvae was fed only once with only one ant. During the experiment the larvae were observed for five minutes and then three variables were counted: the number of attacks of the predator on the preys (attack was so considered when there was a rapid movement of jaws throwing sand, in an attempt to reach the preys for them to fall into the bottom of the trap); the number of prey escapes (escape was so considered when the larva releases its prey for it to leave or not the trap); and the successful capture of preys for each *M. brasiliensis* larva (successful capture was so considered when the larva seizes the prey with its jaws and submerges it in sand).

Kruskal-Wallis test (followed by Dunn test) was used to compare the number of attacks of *M. brasiliensis* larvae on their preys and the number of escapes of preys in the three larval instars. The comparison among the successful capture of preys throughout the three instars was assessed by the 3X2 contingency table utilizing G Test.

Results

The diameter of the funnels varied from 14.7 to 27.9mm; the larvae's body length, from 1.91 to 10.17mm; and the cephalic capsule, from 0.48 to 1.44mm. The variations in size among the instars can be observed in Table 1.

When the preys were offered to *M. brasiliensis* larvae, they all tried to seize them by moving head and mandible. The pattern of capture of first-instar larvae was to attack their preys with assaults on the legs and, later, on the abdomen, whereas second- and third-instar larvae would attack their preys directly on the abdomen, which made capture and manipulation easy.

First-instar *M. brasiliensis* larvae attack their preys more often, followed by second- and third-instar larvae (Kruskal-Wallis, $df = 2$, $p < 0.001$). Dunn test, performed later, showed that this difference occurred among first- and third-instar larvae. The mean number of attacks observed for first-, second- and third-instar larvae was 38.0 (minimum 1-maximum 171), 18.3 (min. 1 – max. 84) and 7.6 (min. 1 – max. 32) (Fig. 1), respectively.

No significant difference was seen regarding the number of escapes of the preys, although first-instar larvae had a higher average of escapes (2.6 ± 3.20 , against 1.81 ± 1.46 and 1.3 ± 1.45 for second and third-instar larvae, respectively). First-instar larvae, even attacking their preys more often, did not manage to seize them effectively, that is, the attack did not involve any kind of contact with the preys, which therefore is not characterized as an escape. On the other hand, other instar larvae (especially third) attacked less often and, when the attack occurred, *M. brasiliensis* managed to capture their preys in an efficient way, which contributed for the sharp decrease in number of escaping.

Third-instar larvae were more successful in capturing preys (96.96%) whereas first- and second-instar larvae capturing 14.28 % and 69.7 % respectively.

Discussion

Larvae at the beginning of development attacked more often than third-instar ones. Heinrich and Heinrich (1984) observed that first-instar *Myrmeleon immaculatus* DeGeer, 1773 larvae did not consume ants (*Camponotus herculeanus* L. 1758) whose body size ranges from 9 and 10mm. Misirlian *et al.* (2006) observed that first-instar *M. brasiliensis* did not attack leaf-cutting ants (*Atta* spp) with body size bigger than 5.24 ± 1.91 mm. In this paper, working with preys with mean body size of 5.78 ± 1.09 mm, it was seen that most larvae attacked only once or twice and, in not being successful, ignored the prey whereas a minority (three larvae) attacked their preys many times (more than 100). This behavior represents a laboratory situation, in which the prey size was standardized to different sizes of *M. brasiliensis*. Probably if the prey size varies positively with size ant-lion larvae, the number of attacks at the preys would not vary between different instars of *M. brasiliensis*.

The animals are susceptible to decisions such as where to forage and what to eat (Scharf *et al.* 2010). Furthermore, predators tend to have a more efficient foraging behavior if, after attacking their preys, they begin to adjust their behavior in order to enhance their success rate (Dall *et al.* 2005; Iwasa and Higashi 1981). First-instar *M. brasiliensis* larvae may have ignored the preys because they do not represent a suitable energy return, as the cost of capture is very high. Also, the bigger the prey, the more significant the destruction caused to the trap during the attempt to capture (Griffiths 1980). The building and maintenance of traps require energy (Griffiths 1986); larvae having their trap disturbed present a growth rate reduced in 50% when compared with the ones whose trap was not disturbed (Griffiths 1980). Thus, smaller larvae would tend to ignore large preys, avoiding the expenditure with capture and a later trap re-building.

There was no significant difference in the number of prey escape among the instars. Smaller larvae did not manage to seize their preys, therefore no escape was seen (see methodology). On the other hand, when bigger larvae managed to

do it, the attack was successful and, in this case, no escape occurred either. In the field, the capture rate of ant-lion larvae is quite reduced (Heinrich and Heinrich 1984) and, since smaller larvae do not manage to efficiently seize their prey in the first attack, they start suffering from inanition. Faria *et al.* (1994) observed that, in a population of *Myrmeleon uniformis* (Návas, 1936) smaller individuals tend to disappear more often than bigger individuals, which, besides being more successful during foraging, also bear a longer period without food. Coelho *et al.* (2008) and Cohen (1998) draw the attention to the fact that, for predators with extra-oral digestion (bugs, spiders and ant-lion larvae), the predator-prey contact is extremely relevant. It should occur in such a way that the predator manages to immobilize the prey so as to inject the toxins of digestion in the tissues and, then, perform the ingestion of liquefied content.

Third-instar bigger larvae present an efficient predation behavior, demonstrated by few attacks to the prey and highly successful capture (96.96%). For these larvae, the higher success in capture of preys is due to both body size and trap characteristics, since bigger larvae manage to use their long mandible to seize the prey directly at the abdomen, unlike smaller larvae that tend to seize preys at legs, and then at the abdomen. On seizing the prey at the abdomen, ant-lion larvae shake them to break their exoskeleton and then release digestive enzymes (Devetak 2005).

Regarding the relation between trap size and successful capture, it can be observed that, on falling into the traps, the prey has more difficulty escaping due to the greater depth of the trap and also because the larvae use their mandibles to throw sand against the prey. This makes its escape difficult, causing it to slide more easily downwards the trap, where the larva can seize it. Dias *et al.* (2006) observed that the probability of escape of *Myrmeleon* sp. preys decreases as the funnel diameter enlarges, and predicted that when funnels have diameters about eight times larger than the prey size, the probability of escape decreases in 50%. Moreover, this efficiency may also be associated with the knowledge "older" larvae have of vibration signal on the sand and availability of preys going together (Devetak 1998; Guillette *et al.* 2009).

Thus, through of laboratory experiments, in which the prey size was standardized, it can be concluded that changes in the larval stage of *M. brasiliensis* affect its predation behavior. Larvae at the beginning of development attack their preys many times, generating greater investment in capture of preys; this larger investment, though, does not yield an increase in the accomplishment of predation. On the other hand, larvae at the end of development present a more efficient predation behavior, occurring few attacks to preys and a highly successful predation. Probably under field conditions, in which, the prey size varies, the larvae efficiency of first instar in the capture of small preys, it would be similar to larvae of second instar, and principally of the third instar in the capture of the big preys.

Cited Literature

- ALLEN, G.; CROFT D. B. 1985. Soil particle size and the pit morphology of the Australian ant-lions *Myrmeleon diminutus* and *M. pictifrons* (Neuroptera: Myrmeleontidae). Australian Journal of Zoology 33: 863-874.
- BEKOFF, M. 1983. Predatory strategies and behavioral diversity. American Biology Teacher 45: 334-342.
- COHEN, A. C. 1998. Solid-to-liquid feeding: the inside(s) story of extra-oral digestion in predaceous Arthropoda. American Entomological 44: 103-115.
- CROWLEY, P. H.; LINTON, M. C. 1999. Antlion foraging: tracking prey across space and time. Ecology 80: 2271-2282.
- COELHO, R. R.; DE ARAUJO JÚNIOR, J. M.; TORRES, J. B. 2008. Comportamento de predação de *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) em função da disponibilidade de alimento. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo 75 (4): 463-470.
- DAY, M. D.; ZALUCKI, M. P. 2000. Effect of density on spatial distribution, pit formation and pit diameter of *Myrmeleon acer* Walker (Neuroptera: Myrmeleontidae): patterns and processes. Australian Journal of Ecology 25: 58-64.
- DALL, S. R. X.; GIRALDEAU, L. A.; OLSSON, O.; MCNAMARA, J. M.; STEPHENS, D. W. 2005. Information and its use by animals in evolutionary ecology. Trends in Ecology & Evolution 20: 187-193.
- DEVETAK, D. 2005. Effects of larval antlions *Euroleon nostras* (Neuroptera, Myrmeleontidae) and their pits on the escape-time of ants. Physiology Entomology 30: 82-86.
- DEVETAK, D. 1998. Detection of substrate vibration in Neuropterodea: a review. Acta Zoologica Fennica 209: 87-94.
- DEVETAK, D.; PERNJAK, A.; EKOVIĆ, F. 2005. Substrate particle size affects pit building decision and pit size in the antlion larvae *Euroleon nostras* (Neuroptera: Myrmeleontidae). Physiological Entomology 30: 158-163.
- DÍAS, S. C.; SANTOS, B. A.; WERNECK, F. P.; LIRA, P. K.; CARRASCO-CARBALLIDO, V.; FERNANDES, G. W. 2006. Efficiency of prey subjugation by one species of *Myrmeleon* larvae (Neuroptera: Myrmeleontidae) in the central Amazônia. Brazilian Journal of Biology 66: 441-442.
- ENDLER, J. A. 1991. Interactions between predators and prey. P. 169 - 196. En: Krebs, J. R.; Davies, N. B (eds.). Behavioral Ecology: An Evolutionary approach. Volume III. Blackwell Scientific Publications. Oxford Editors. 482 p.
- FARIA, M. L.; PRADO, P. I.; BEDÊ, L. C.; FERNANDES, G. W. 1994. Structure and dynamics of a larval population of *Myrmeleon uniformis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). Brazilian Journal of Biology 54: 335-344.
- GRIFFITHS, D. 1980. The feeding biology of ant-lion larvae: prey capture, handling and utilization. Journal of Animal Ecology 49: 99-125.
- GRIFFITHS, D. 1986. Pit construction by antlion larvae: a cost-benefit analysis. Journal of Animal Ecology 55: 39-57.
- GUILLETTE, L. M.; HOLLIS, K. L.; MARKARIAN, A. 2009. Learning in a sedentary insect predator: Antlions (Neuroptera: Myrmeleontidae) anticipate a long wait. Behavioural Processes 80: 224-232.
- HEINRICH, B.; HEINRICH, M. J. E. 1984. The pit-trapping foraging strategy of the Antlion *Myrmeleon immaculatus* DeGeer (Neuroptera: Myrmeleontidae). Behavioral Ecology and Sociobiology 14: 151-160.
- IWASA, Y.; HIGASHI, M. 1981. Prey distribution as a factor determining the choice of optimal foraging strategy. The American Naturalist 117: 710-723.
- LOMÁSICOLO, S.; FARJI-BRENER, A. G. 2001. Adaptive short-term changes in pit design by antlion larvae (*Myrmeleon* sp.) in response to different prey condition. Ethology, Ecology and Evolution 13: 393-397.
- LIMA, T. N.; FARIA, R. R. 2007. Seleção de microhabitat por larvas de formiga-leão *Myrmeleon brasiliensis* (Návas) (Neuroptera: Myrmeleontidae), em uma Reserva Florestal, Aquidauana, Mato Grosso do Sul. Neotropical Entomology 35 (4): 812 - 814.
- MACCLURE, M. S. 1976. Spatial distribution of pit-marking ant-lion (Neuroptera: Myrmeleontidae): density effects. Biotropica 8: 179-183.
- MISSÍRIAN, G. B.; UCHÔA-FERNANDES, M. A.; FISCHER, E. 2006. Development of *Myrmeleon brasiliensis* (Návas) (Neuroptera, Myrmeleontidae), in laboratory, with different natural diets. Revista Brasileira de Zoologia 23 (4): 1044-1050.
- NAPOLITANO, J. F. 1998. Predatory behavior of a pit-marking antlion, *Myrmelon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). Florida Entomologist 81: 562-566.
- NILSSON, P. A. 2006. Avoid your neighbors: size-determined spatial distribution patterns among northern pike individuals. Oikos: 435-440.
- PRADO, I. F. L.; BEDÊ, L. C.; FARIA, M. L. 1993. Asymmetric competition of antlion larvae. Oikos 68: 525-530.
- SCHARF, I.; BARKAE, E. D.; OVADIA, O. 2010. Response of pit-building antlions to repeated unsuccessful encounters with prey. Animal Behaviour 79: 153-158.
- SCHARF, I.; NULMAN, E.; OVADIA, O.; BOUSKILA, A. 2006. Efficiency Evaluation of Two Competing Foraging Modes under Different Conditions. The American Naturalist 168 (3): 350- 357.

- Sugarcane 16-20
Sumilarv 91-94
Tabla de vida 21-25, 62-64, 66, 117
Tamarindus indica 174
Tanypodinae 162, 163
Tarsonemidae 228
Taxonomía 331, 341
Taxonomy 331, 341
Tecia solanivora 1, 3, 5-7, 27, 33, 34
Temefos 9, 92, 94
Tenebrionidae 251
Termitas 36-41
Tetranychidae 62, 65, 66
Tetranychus cinnabarinus 21-25, 62, 63
Tetranychus desertorum 62
Tetrastichus sp 240
Theobroma 80
Thrasorinae 137, 139
Thrasorino 137
Thrasorus 137
Tobón Flor Ángela 251
Tolerante 16
Tomate 210
Torres C Yusdiel 162
Tortricidae 67, 68, 70
Toxicidad 192, 269
Trialeurodes vaporariorum 210
Trichogramma 238
Trichogramma acacioi 238
Trichogramma caiaposi 238
Trichogramma demoraesi 238
Trichogramma maxacalii 238
Trichogramma pratissolii 238
Trichogramma soaresi 238
Trichogrammatidae 238
Tricorythodes caunapi 327
Tropics 305
Ulmoides dermestoides 251
Uribe S. Sandra Inés 273
Valle Javier 269
Vargas-Osuna Enrique 192
Varipes 346
Varipes sancarlos n. sp. 346
Vector 8-15, 77-94
Veliidae 350
Vendramim José D. 16
Viçosa 80 82 83
Vigna radiata 251
Villalobosothignus 128
Villamizar R Laura 27
Wasmannia auropunctata 279
Witzgall Peter 1
Xerosaprinus sp 103, 105-108
Xilanasa 167
Xilella fastidiosa 77
Xilófagos 56 57
Xylocopa 313
Xylocopini 313
Yepes Francisco 152
YMMV 77-79
You-Qing Luo 240
Zambrano-González Giselle 117
Zamora E Humberto 183
Zea mays 82, 36, 217
Zhang Mengqi 95
Zhuang Quan 95, 96, 98, 100, 102
Zingiberaceae 357
Zoocria 117-119

Fe de erratas número 37 (2)

Por error involuntario el trabajo de la página 244 a la 248 y los trabajos de las páginas 318 a la 359 tienen como número de revista 37 (1) cuando en realidad es 37 (2).

Staphylinidae y Nitidulidae (Coleoptera) asociados a inflorescencias de *Etlingera elatior* (Zingiberaceae)

Staphylinidae and Nitidulidae (Coleoptera) associated with inflorescences of *Etlingera elatior* (Zingiberaceae)

MARGARITA M. LÓPEZ-GARCÍA^{1,2}, DIANA M. MÉNDEZ-ROJAS^{1,3} y ROCÍO GARCÍA CÁRDENAS^{1,4}

Resumen: Se caracterizó la fauna de estafilínidos y nitidúlidos asociados a las inflorescencias de *Etlingera elatior*, en relación con su senescencia. Se colectaron 322 estafilínidos, distribuidos en cinco subfamilias y 28 morfoespecies; y 301 nitidúlidos pertenecientes a dos subfamilias y ocho morfoespecies. Los géneros más abundantes fueron *Colopterus* (Nitidulidae) y *Coproporus* (Staphylinidae). Staphylinidae fue más diversa que Nitidulidae, en términos de estructura de la comunidad. No se encontraron diferencias significativas en la abundancia y riqueza de las familias entre los estados de senescencia. Los estafilínidos fueron oportunistas y visitantes ocasionales que aprovechan los recursos que ofrecen las inflorescencias de *E. elatior*; mientras que los nitidúlidos mostraron una mayor asociación entre sus ciclos de vida y esta planta.

Palabras clave: Diversidad. Estafilínidos. Nitidúlidos. Bastón del Emperador. Quindío.

Abstract: Staphylinid and nitidulid fauna associated with *Etlingera elatior* inflorescences was characterized, in relation to their senescence. 322 rove beetles belonging to five subfamilies and 28 morphospecies were collected; and 301 nitidulids belonging to two subfamilies and eight morphospecies were found. The most abundant genera were *Colopterus* and *Coproporus*. Staphylinidae was more diverse than Nitidulidae in terms of community structure. There were not statistically significant differences in abundance and richness of each subfamily among senescence stages. Rove beetles were opportunists and casual visitors taking advantage of resources that inflorescences of *E. elatior* offer; while sap beetles showed a stronger association between their life cycles and this plant.

Key words: Diversity. Rove beetles. Sap beetles. Red Torch Ginger. Quindío.

Introducción

Las fitotelmatas, son microhábitats acuáticos formados en estructuras de plantas terrestres como las brácteas de flores o bromelias (Kitching 2001). Estas son importantes para algunas comunidades de insectos, pues muchos grupos se han adaptado a la dinámica de floración y a los cambios en la entrada de nutrientes de varias especies de plantas (Kitching 2000). Los insectos han sido estudiados en asociaciones con familias como Gesneriaceae, Marantaceae, Zingiberaceae y Heliconiaceae, siendo Coleoptera uno de los grupos más comúnmente encontrados (Seifert y Seifert 1979; Greeney 2001).

Dentro de Coleoptera, los nitidúlidos y estafilínidos con 2.800 y 55.440 especies descritas en el mundo, respectivamente (Habeck 2002; Grebennikov y Newton 2009) son uno de los grupos más importantes tanto taxonómica como ecológicamente, ocupando una gran variedad de nichos (Newton *et al.* 2005; Buchholz *et al.* 2008) que incluyen diferentes estructuras de plantas. Habeck (2002) reporta las brácteas, hojas, flores y frutos que contienen depósitos de agua como hábitats probables para algunos nitidúlidos. Henao y Ospina (2008) documentan estafilínidos en especies de heliconias y, Frank y Barrera (2010) estudian el comportamiento de *Belonchus* en brácteas de heliconias.

Etlingera elatior (Jack) Smith 1986, de origen indonesio, es la especie de su género más cultivada como ornamental en el mundo (Jaafar 2007); sin embargo, no existen reportes específicos sobre su asociación con comunidades

de insectos. Henao y Ospina (2008) la incluyen dentro de una caracterización de insectos en varias plantas ornamentales, pero no especifican la entomofauna asociada a esta especie. En este trabajo se caracterizó la comunidad de estafilínidos y nitidúlidos asociados a las inflorescencias de *E. elatior*, debido a que son unas de las familias más abundantes en este microhábitat.

Materiales y Métodos

Se realizaron cuatro muestreos cada 15 días entre el 3 de octubre y 14 de noviembre de 2008, en el Parque de la Vida (4°31'57"N 75°40'44"O; 1450 m.s.n.m); ubicado en el perímetro urbano de Armenia (Quindío). *E. elatior* se encuentra en las orillas de los lagos artificiales y presenta agrupaciones en colonias separadas entre sí por más de 2 ó 3m. Durante las cuatro visitas, se muestrearon nueve colonias obteniendo 36 unidades de muestreo y un esfuerzo de 25 horas/hombre. Los estados de senescencia de las inflorescencias se establecieron a partir de su fenología (Sheehan 1958; Branney 2005): 1E. Inicio de antesis (Brácteas estériles); 2E. Antesis (Brácteas con flores maduras); y 3E. Infrutescencia (Brácteas descompuestas).

Los especímenes se colectaron en viales con alcohol (70%) y se almacenaron en la Colección de Insectos de la Universidad del Quindío (CIUQ). Para la determinación taxonómica se consultó a Habeck (2002) y Navarrete-Heredia *et al.* (2002). Para evaluar la diversidad local de cada familia, se cuantificó la abundancia y riqueza; y se calcularon

¹ Centro de estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (CIBUQ). Universidad del Quindío. A.A. 460. Armenia, Colombia. ² Bióloga. Universidad del Quindío. margaralopezg@gmail.com. Autora para correspondencia. ³ Bióloga. Universidad del Quindío. dianamendez04@gmail.com ⁴ Bióloga entomóloga. M. Sc. Universidad del Quindío. rociogarcia06@yahoo.es

los índices de Simpson (D) y Pielou (J) (Biodiversity Pro). Para comparar la abundancia y riqueza de escarabajos entre los estados de senescencia, se realizó un ANOVA paramétrico (Statgraphics Plus 5.1).

Resultados

Se colectaron 623 escarabajos, de los cuales 322 pertenecen a Staphylinidae y se distribuyen en cinco subfamilias y 28 morfoespecies. Los 301 individuos restantes pertenecen a Nitidulidae, representando ocho morfoespecies de dos subfamilias (Tabla 1). Cillaeinae (Nitidulidae) presentó el mayor número de individuos (272), seguido por las subfamilias de Staphylinidae, Aleocharinae (172), Tachyporinae (124) y Staphylininae (20). Las morfoespecies más abundantes fueron *Colopterus* sp. 1 (Nitidulidae) y *Coproporus* sp. 1 (Staphylinidae). Para Nitidulidae, se obtuvo una equitatividad baja ($J=0,28$) y valores altos de dominancia ($D=0,84$); mientras que Staphylinidae mostró una estructura de la comunidad más equitativa ($J=0,78$, $D=0,30$).

Los estafilínidos fueron abundantes tanto al inicio (1E) como al final de la floración (3E), mientras que los nitidúlidos mostraron mayor abundancia al inicio (1E) (Tabla 1). A pesar de la alta abundancia de esta familia, su riqueza no alcanzó las ocho morfoespecies en ningún grado de senescencia. Por el contrario, Staphylinidae mostró mayor abundancia en flores descompuestas (3E) y su riqueza fue similar en los tres estados. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la abundancia (AB) y la riqueza (RQ) de especies entre los grados de senescencia, ni para Nitidulidae (AB:

$F=2,72$, $p=0,07$; RQ: $F=1,04$, $p=0,36$) ni para Staphylinidae (AB: $F=2,65$, $p=0,07$; RQ: $F=2,62$, $p=0,07$).

Discusión

Las inflorescencias de *E. elatior* acumulan humedad y materia orgánica a medida que senescen, proporcionando un hábitat propicio para muchos invertebrados similar al presentado en otras especies de plantas como bromélias (Greeney 2001). Esto explica la frecuencia de muchos insectos (Coleoptera, Diptera, Dermaptera, Hymenoptera), arácnidos y anélidos durante el muestreo (obs. pers.). Sin embargo, Nitidulidae y Staphylinidae fueron los taxa más frecuentemente encontrados. Según Prince y Young (2006), los nitidúlidos de Carpophilinae y Cillaeinae son comúnmente colectados en flores, inflorescencias y frutos. Asimismo muchos estafilínidos han sido reportados en inflorescencias o brácteas de heliconias, palmas y bromelias (Greeney 2001; Greeney 2004).

Nitidulidae fue menos equitativa que Staphylinidae por la alta abundancia de *Colopterus*, que abarca más del 80% de las colectas de esta familia. Este género es comúnmente colectado en sustratos con abundante materia orgánica y azúcares fermentados (Prince y Young 2006), explicando su dominancia en estas inflorescencias. Por otro lado, Staphylinidae presentó una mayor diversidad debido a que este microhábitat contienen materia orgánica utilizada por saprófagos y detritívoros como muchos tachiporinos (Navarrete-Heredia *et al.* 2002), y a la vez albergan otros insectos que sirven de presas para los estafilínidos predadores (Greeney 2004; Frank y Barrera 2010). La baja abundancia de las es-

Tabla 1. Nitidúlidos y estafilínidos recolectados en diferentes estados de senescencia (1E, 2E y 3E) de las inflorescencias de *Etlingera elatior*.

Taxa	Estado de senescencia			Total	Taxa	Estado de senescencia			Total
	1E	2E	3E			1E	2E	3E	
Nitidulidae					Staphylinidae				
Carpophilinae					Aleocharinae				
Brachypeplus sp.	0	1	0	1	Hoplandria sp.	1	0	0	1
Carpophilus sp.	8	7	0	15	Aleocharinae sp.1	7	2	10	19
Cillaeinae					Aleocharinae sp.2	25	13	49	87
Colopterus sp.1	170	49	37	256	Aleocharinae sp.3	0	2	1	3
Colopterus sp.2	15	6	1	22	Aleocharinae sp.4	10	0	13	23
Nitidulidae sp.1	0	1	0	1	Aleocharinae sp.5	0	2	3	5
Nitidulidae sp.2	1	1	0	2	Aleocharinae sp.6	16	0	9	25
Nitidulidae sp.3	2	1	0	3	Aleocharinae sp.7	4	0	2	6
Nitidulidae sp.4	1	0	0	1	Aleocharinae sp.8	0	0	4	4
Staphylinidae					Aleocharinae sp.9	1	0	0	1
Megalopsidiinae					Aleocharinae sp.10	0	4	0	4
Megalopinus sp.1	0	0	2	2	Aleocharinae sp.11	1	0	0	1
Megalopinus sp.2	0	0	1	1	Aleocharinae sp.12	0	0	1	1
Staphylininae					Omaliinae				
Belonuchus sp.1	0	0	1	1	Phloeonomus sp.	0	1	0	1
Belonuchus sp.2	2	0	3	5	Tachyporinae				
Paederomimus sp.1	2	0	3	5	Cilea sp.	0	1	0	1
Paederomimus sp.2	0	0	1	1	Coproporus sp. 1	56	8	51	115
Paederomimus sp.3	0	3	3	6	Coproporus sp. 2	1	0	0	1
Philonthus sp.	0	0	1	1	Tachyporinae sp.1	0	0	1	1

pecies encontradas indica que la mayoría de estafilínidos son oportunistas y visitantes ocasionales.

Aunque no hubo relación entre la diversidad de escarabajos y los estados de senescencia, se observó una mayor abundancia de estafilínidos cuando las inflorescencias están más descompuestas y hay mayor cantidad de larvas de dípteros. Esto ha sido observado por Greeney (2004), en las brácteas descompuestas de las flores de *Iriarte deltoidea* Ruiz & Pav. (Arecaceae). En contraste, Nitidulidae, específicamente *Colopterus* sp. 1, mostró mayor abundancia al inicio de la floración, donde se observaron varios eventos de cópula. Este comportamiento ha sido documentado para varios nitidúlidos en otras plantas, donde estas especies desarrollan su ciclo de vida (Udovic 1986). Sin embargo, es necesario realizar crías en laboratorio de *Colopterus* sp 1, con el fin de confirmar el desarrollo de la especie en *E. elatior*.

Agradecimientos

Agradecemos a Andrew Cline (California Department of Food & Agriculture, California), Alfred Newton (Field Museum of Natural History, Chicago) y al Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad del Quindío (CIBUQ).

Literatura citada

- BUCHHOLZ, S.; SCHIFFER, M.O.; SPIEWOK, S.; PETTIS, J. S.; DUNCAN, M.; RITTER, W.; SPOONER-HART, R.; NEUMANN, P. 2008. Alternative food sources of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Apicultural Research and Bee of World* 47(3): 202-209.
- BRANNEY, T.M. 2005. Hardy Gingers including *Hedychium*, *Roscoeia*, and *Zingiber*. Timber Press Inc. United States. 267 p.
- FRANK, J.H.; BARRERA, R. 2010. Natural history of *Belonuchus Nordmann* spp. and allies (Coleoptera: Staphylinidae) in *Heliconia* L. (Zingiberales: Heliconiaceae) flower bracts. *Insecta Mundi* 0110: 1-12.
- GREBENNIKOV, V.V.; NEWTON, A. F. 2009. Good-bye Scydmaenidae, or why the ant-like stone beetles should become megadiverse Staphylinidae in su latissimo (Coleoptera). *European Journal of Entomology* 106: 275-301.
- GREENEY, H.F. 2001. The insects of plant-held waters: a review and bibliography. *Journal of Tropical Ecology* 17: 241-260.
- GREENEY, H.F. 2004. Fallen flower bracts of the stilt-root palm *Iriarte deltoidea* (Palmae: Iriarteeae) as phytotelmata habitats in a lowland Ecuadorian rainforest. *Milwaukee Public Museum Contributions in Biology and Geology* (101): 1-20.
- HABECK, D. H. 2002. Nitidulidae: 311-315. En: Arnett, R.H.; Thomas, M.C.; Skelley, P.E. y Frank, J.H. (Eds.). *American Beetles. Volumen II*. CRC Press. Boca Raton. Estados Unidos. 861 p.
- HENAO, E.; OSPINA, K.A. 2008. Insectos benéficos asociados a cultivos de heliconias en el Eje Cafetero Colombiano. *Boletín Científico Museo de Historia Natural Universidad de Caldas* 12: 157-166.
- JAAFAR, F.M.; OSMAN, C. P.; ISMAIL, N. H.; AWANG, K. 2007. Analysis of essential oils of leaves, stems, flowers and rizomas of *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* 11 (1): 269-273.
- KITCHING, R.L. 2000. Food webs and container habitats. The natural history and ecology of phytotelmata. Cambridge University Press. Cambridge. 419 p.
- KITCHING, R.L. 2001. Food webs in phytotelmata: "bottom-up" and "top-down" explanations for community structure. *Annual Review of Entomology* 46: 729-760.
- NAVARRETE-HEREDIA, J.L.; NEWTON, A.F.; THAYER, M.K.; ASHE, J.S.; CHANDLER, D.S. 2002. Guía ilustrada para los géneros de Staphylinidae (Coleoptera) de México. Universidad de Guadalajara y CONABIO. México. 401 p.
- NEWTON, A.F.; GUTIÉRREZ-CHACÓN, C.; CHANDLER, D.S. 2005. Checklist of Staphylinidae (Coleoptera) of Colombia. *Biota Colombiana* 6 (1): 1-72.
- PRINCE, M.B.; YOUNG, D. K. 2006. An annotated checklist of Wisconsin sap and short-winged flower beetles (Coleoptera: Nitidulidae, Kateretidae). *Insecta Mundi* 20 (1-2): 69-84.
- SEIFERT, R.P.; SEIFERT, F.H. 1979. A *Heliconia* Insect Community in a Venezuelan Cloud Forest. *Ecology* 60 (3): 462-467.
- SHEENAN, T.J. 1958. Zingiberaceae for Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 71: 382-388.
- UDOVIC, D. 1986. Floral predation of *Yucca whipplei* (Agavaceae) by the sap beetle, *Anthrenus agavensis*. (Coleoptera: Nitidulidae). *Pan-Pacific Entomologist* 62: 55-57.

Recibido: 2-nov-2010 • Aceptado: 2-may-2011

- Sugarcane 16-20
Sumilarv 91-94
Tabla de vida 21-25, 62-64, 66, 117
Tamarindus indica 174
Tanypodinae 162, 163
Tarsonemidae 228
Taxonomía 331, 341
Taxonomy 331, 341
Tecia solanivora 1, 3, 5-7, 27, 33, 34
Temefos 9, 92, 94
Tenebrionidae 251
Termitas 36-41
Tetranychidae 62, 65, 66
Tetranychus cinnabarinus 21-25, 62, 63
Tetranychus desertorum 62
Tetrastichus sp 240
Theobroma 80
Thrasorinae 137, 139
Thrasorino 137
Thrasorus 137
Tobón Flor Ángela 251
Tolerante 16
Tomate 210
Torres C Yusdiel 162
Tortricidae 67, 68, 70
Toxicidad 192, 269
Trialeurodes vaporariorum 210
Trichogramma 238
Trichogramma acacioi 238
Trichogramma caiaposi 238
Trichogramma demoraesi 238
Trichogramma maxacalii 238
Trichogramma pratissolii 238
Trichogramma soaresi 238
Trichogrammatidae 238
Tricorythodes caunapi 327
Tropics 305
Ulumoides dermestoides 251
Uribe S. Sandra Inés 273
Valle Javier 269
Vargas-Osuna Enrique 192
Varipes 346
Varipes sancarlos n. sp. 346
Vector 8-15, 77-94
Veliidae 350
Vendramim José D. 16
Viçosa 80 82 83
Vigna radiata 251
Villalobosothignus 128
Villamizar R Laura 27
Wasmannia auropunctata 279
Witzgall Peter 1
Xerosaprinus sp 103, 105-108
Xilanasa 167
Xilella fastidiosa 77
Xilófagos 56 57
Xylocopa 313
Xylocopini 313
Yepes Francisco 152
YMMV 77-79
You-Qing Luo 240
Zambrano-González Giselle 117
Zamora E Humberto 183
Zea mays 82, 36, 217
Zhang Mengqi 95
Zhuang Quan 95, 96, 98, 100, 102
Zingiberaceae 357
Zoocria 117-119

Fe de erratas número 37 (2)

Por error involuntario el trabajo de la página 244 a la 248 y los trabajos de las páginas 318 a la 359 tienen como número de revista 37 (1) cuando en realidad es 37 (2).

Índice del volumen 37

- A. albopictus* 269
A. inornatum 164
A. podalyriaefolia 80, 81
A. truncatipenne 164
 Abd El-Ghaffar Nahed Ibrahim 192
 Abeja-real 121
 Abejas carpinteras 313
 Abejas sin aguijón 121, 126, 127
 Abejas sociales 121
 Abundancia 83, 87, 103-109, 118, 158
 Acacia 80
Acacia podalyriaefolia 80
 Acari 21, 24, 25, 26, 42, 52, 62, 63, 64, 65, 66, 113, 120, 228
 Ácaro blanco 228
 Aceite 251
 Acevedo Flor E. 173
 Aciole Sullamy D. G. 262
 Acridomorpha 140, 144
Acrolophyses 128
 Actividad externa 121, 122, 126
 Acuña Z. José R. 167
 ADN mitocondrial 273
Aedes aegypti 91, 93, 94, 262, 269
 Age 67, 68, 69, 70, 164, 115, 160
 Aging 67, 69
 Aguilera G. Carolina 167
 Aislamiento reproductivo 318
Albizia 80
 Alcantara J. José Angel 228
 Aldebis Hani K. 192
 Aleyrodidae 8, 14, 210
 Algodón 192
 Aliso 48, 49, 50, 51, 53, 54, 55
Alnus acuminata 48, 55
 Alvarenga Soares Marcus 80
 Álvarez G. Deivys 77, 78
 Álvarez Leslie 91
 Amazonia colombiana 36, 37, 40, 41, 120
 Amfimíctico 43, 46
Anacroneuria 305
 Andalo Vanessa 203
 Andes 48, 55, 75, 91, 92, 94, 121, 122, 143, 161, 164, 165, 305
Anisagrion 164, 165
Anisagrion allopterum 164
Anisagrion inornatum 164, 165
 Anisolabididae 234
Annona 80
Annona muricata 223
 Annonaceae 262
Anopheles calderoni 256
Anopheles malefactor 256
Anopheles punctimacula 256
 Antibiosis 16, 19
 Ant-lion 354
 Ants 159, 160, 161
 Aphelinidae 210
 Apidae 121, 126, 127, 313
 Araña del desierto 63, 65
 Araya Clericus Jaime 56
 Arcila C. Ángela María 279
 Arcos P. Osvaldo 350
 Área foliar 228
 Argueta Ana L. 269
 Armbrecht Inge 279
 ARN interferente 167
 Aspártico proteasas 183
 Asteraceae 25, 113, 117
 Auad Alexander M. 198, 244
 Auchenorrhyncha 80
 Augusto Solange Cristina 313
 Avila A Daniel 157, 158
 Bacca Tito 327
Bacillus thuringiensis 192
 Baculoviridae 27, 34
 Baculovirus 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35
 Badnavirus 77, 79
 Baetidae 346
 Barrenador 48 74
 Bastón del emperador 357
 Batata 249
 Batista Jacinto de Luna 234
 Bautista M. Néstor 217
Beauveria bassiana 217, 234, 236
 Beetles 55, 82, 83, 95, 96, 99, 100, 101, 102, 103, 109, 110, 155, 156
 Begomovirus 8-14
 Bello G. Orestes C. 162
 Beltrán H. Javier 77
Bemisia tabaci 8-15
 Benavides Pablo 48, 173
Bergicoris 128
 Berrio Alejandro 173
Bertholletia excelsa 174
 Betulaceae 48
 Biocomercio 117
 Biodiversity 46, 109, 111, 112, 114, 115, 116, 136, 159, 163, 164, 165
 Biogeographic Choco 327
 Biological control 203, 238
 Biometry 305
 Biotipos 8-15, 74, 75, 76
 Blanco-Labra Alejandro 183
Blepharocalyx sp 137
 Body size 305
 Bohórquez Hugo 305
 Bolaños-Martínez Ivón Andrea 117, 118, 120
 Boraginaceae 117
 Bosa Carlos Felipe 1, 2, 4, 6
 Bosque alto andino 157
 Bosques chaqueños 294
 Botelho Paulo S. M. 16
Brachiaria plantaginea 244
Brachiaria ruziziensis 244
Brachymeria sp. 249
Bracon sp 240
Brassica oleracea 223
 Brazil 16, 17, 18, 20, 25, 41, 68, 80, 81, 82, 83, 101, 103, 111, 112, 115, 116, 127, 160, 161

- Briceño Valdivia Romina 62
 Broca del café 167, 173, 174
 Brochero Helena L. 71
 Bromeliáceas 162
 Bueno Mari Rubén 84, 86, 88, 90
C. columbianus 49, 52, 53, 54
C. punctatissimus 49
 Caballitos del diablo 164, 165
 Cabbage moth 223
Caesalpina pulcherrima 174
 Cai Jifeng 95
Cajanus 80
 Calliphoridae 273
 Campo J Ary A. 36
 Campos Vicente P. 203
 Cantaloupe 21, 22, 23, 24
 Cantor R Fernando 210
 Caña de azúcar 198
Capsicum annuum 71
 Caquetá 36, 37, 41, 128, 132, 159, 160
 Carlavirus 77
 Carnevale Nelida 294
Caryocar brasiliense 289
 Caryocaraceae 289
 Cassia 80
 Castillo María Mercedes 346
 Castillo Martínez Pamela 62
Catenes 128-136
 Cauca 8, 9, 12, 13, 14, 43, 44, 71-76, 117, 118, 119, 128-134, 143, 145, 146, 155, 159
 Caucho natural 36, 37, 40, 41
 Cecidomyiidae 111, 113
 Cerambycidae 6, 82, 83
Ceratocystis sp 48, 52
 Cercopidae 16, 18, 19, 20, 198
 Chaves-Alves Talles Marques 313
 Chen Yaoqing 95
 Chicharritas 77
 Chinchas 128, 331
 Chironomidae 162, 163
 Chizas 152
Cholula 128-136
 Chrysomelidae 249
 Cicadas 341
 Cicadélidos 77, 79
 Cicadellidae 77
 Cicadidae 341
 Cicadoidea 341
 Citocromo b 273
 Citocromos P 450, 167
 Citogenética 173
Citrus 80
 Claudioperla 305
 Clave taxonómica 72, 152
 Clavijo Andrea 1
 CMV 77, 79
Cnephiasia jactatana 67, 70
 Coccinellidae 217
 Coenagrionidae 164, 165
Coffea 80
Coffea arabica L. 167, 175, 183
 COI gene 95, 96, 98, 99, 100, 101
 Cojedes 346
 Cola Zanuncio José 80, 82, 238
 Coleoptera 2, 6, 48, 55, 76, 82, 83, 95-113, 152, 156, 167, 173, 183
Collaria oleosa 244
 Collembola 157, 158
 Colombia 1, 7, 8, 12, 14, 27, 28, 32, 34, 36-54, 300
 Colombian Amazon 36, 159, 160
 Comovirus 77
 Competencia 289
 Complejo fálico 140-144
 Complementariedad 103, 104, 107
 Compuestos volátiles 1, 2, 3, 4, 5, 49, 51
 Comunidades de artrópodos 294
 Conchuela del frijol 217
 Conservación 109, 117, 118, 120, 127, 144, 163
 Constantino Luis M. 173
 Control alternativo 91
 Control biológico 1, 2, 27, 34, 43, 44, 47, 62, 65, 66, 210, 249
 Control de Malaria 256
 Control de vectores 262, 269
 Control microbiano 198
 Convolvulaceae 249
Coptotermes 36, 40, 42
 Corduliidae 164, 165
 Corn plants 82, 83
Corthylus andinus 49
Corthylus zulmae 48, 49, 51, 53, 54, 55
 Costa Emmanoel V. 262
 Costa Valmir A. 249
 Cotes Alba Marina 1
 Crambidae 71, 75, 76
 Cría 2, 4, 14, 28, 48, 49, 50, 52, 54, 72, 73, 75, 94, 117, 118, 119, 120, 121, 126, 127
 Criaderos larvarios 84, 87
 Cucomovirus 77
Cucumis melo 8 21, 23
 Cuéllar J. María Elena 8, 10, 12, 14
 Cui Ya-Qin 240
Culex pipiens 84, 87
 Culicidae 84, 89, 90, 93, 94, 256, 262, 269
 Culicidos 84, 85, 86, 87, 89
Culiseta longiareolata 84, 87, 89
 Cundinamarca 1, 2, 3, 28, 71-76, 120, 129, 130, 132, 133, 145, 149, 152, 155, 157, 158
 Curculionidae 48, 49, 55, 105, 113
 Cure José Ricardo 210
 Cyclocephalini 152, 155
Cydia pomonella 2, 68, 70
 Cytb 273
 da Silva Paulo Pedro 223
 DaBV 77, 79
 Damsel fly 164, 165
 Danainae 117
Darwinivelia 350
 DAV 77
 de Brito Carlos Henrique 234
 de Jesus Fabiene Maria 289
 de Moraes Rosana M. 67, 68, 70
 de Oliveira Harley Nonato 238
 de Oliveira Monteiro Caio Márcio 198
 de Souza Luna Josiane 223
Delonix 80

- Deltachilum scabriusculum* 103, 105, 108
 Demolin Leite Gernano Leão 289
 Dengue 91, 92, 94, 262
 Depresión 251
 Dermaptera 234
 Desarrollo postembrionario 22, 62, 63, 64, 66
 Deuteromycota 36, 37
 Diamondback moth 223
Dianthus caryophyllus 21
 Dias Lucimar G. 327
 Díaz M Ana Elizabeth 71, 72, 74, 76
 Díaz S Juan 77
 Dinámica poblacional 24, 48, 49, 50, 117
Dioscorea rotundata 77, 79
 Dioscoreaceae 77
 Diptera 84, 89, 90, 94, 95, 96, 100, 101, 102, 104, 113, 162, 163, 256, 262, 273, 318
Dipteryx 80
 Discoid gall 289
 Diversidad 62, 74, 75, 83, 89, 103, 104, 105, 107, 109, 110, 111, 117, 128, 143, 150, 163, 357
 Dolichoderinae 159, 160, 161
 Dragonflies 164
Drosophila mercatorum 318
 Drosophilidae 318
 Duque L Jonny E. 262
Dushinckanus 128, 129, 130, 131, 133, 134, 136
 Dynastinae 107, 152, 156
Dyscinetus dubius 152, 153, 154, 155
 Eficacia 27, 29, 32, 33, 39, 44, 91, 92, 93, 94
 Eficiencia de transmisión 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15
 Efimeras 327, 346
 Eggs parasitoid 238
 Elder Simões de Paula Batista 198
 Elephant grass 244
 El-Sayed Hatem Adel 192
Emersonella niveipes 249
Emersonella trimaculata 249
Encarsia formosa 210
 Enemigos naturales 249
Enicospilus 145-151
Enterolobium 80
 Entomobryomorpha 157
 Entomofauna Neotropical 140
 Entomología Forense 273
 Entomopathogenic fungi 234
 Ephemeroptera 327, 346
Epilachna varivestis 217
 Eryophidae 111, 113
 Escarabajos inmaduros 152
 Escarabajos longicornios 82
 Especiación 318
 Espinillo savannah 111-115
 Essential oils 262
 Estabilidad 27-35
 Estafilínidos 357
 Estrada F. Ana Patricia 318
 Estructura social 279
 Estuarios 350
Etlingera elatior 357
Euborellia annulipes 234
Eucalyptus sp 36, 80, 83, 238
Euceroptres 137
Euceroptrinae 137
Eugenia sp 137
 Eulophidae 249
 Eumastacidae 140, 144
Exorista larvarum 240
 Extradomicilio 256
 Fabaceae 137
 Fagaceae 6, 56, 57, 60
 Fagundes Pereira Fabrício 238
 Fauna neotropical 128, 331
 Feng Hua 95
 Fenología 103, 105, 106, 107, 121
 Fernandes Geraldo Wilson 289
 Feromonas 1, 5, 49
 Ferreira de Lima María Raquel 223
 Ferreira Paulo S. F. 327
 Fidicina 341
 Fidicinini 341
Fidicinoides 341
 Figitidae 137, 139
 Fingerprints 173
 Fitoseidos 62-65
 Fitotelmata 162
 Flatidae 80 81
 Flórez R. Claudia P. 167
 Fonseca do Nascimento Aline 289
 Forage 244
 Foraging 354
 Forensic entomology 95, 101, 102
 Formicidae 159, 161, 279
 Formulaciones 27, 28, 29, 31, 33, 34, 35
 Forrajeo 121-127
 Forrajeras 121-126
Fragaria x ananassa 21
 Fragmentación 279
 Fríjol habichuela 8, 9, 13
Fusarium solana 48, 52
Fusarium sp. 48, 52
Galia arava 21
Galleria mellonella 44, 46, 47
 Galling arthropods 111, 113-116
 García Cárdenas Rocío 357
 García G. Cipriano 217
 García García Alexander 145
 García José F. 16, 18, 20
 Gelechiidae 1, 2, 6, 7, 27, 32, 34, 35, 70
 Geminiviridae 8
 Genes cry 192
 Genitales 318
 Geometridae 238
 Gerridae 350
 Gil Zulma Nancy 48
 Giraldo H Paula Andrea 273
Glycine max 251
 Gómez A. Martha 27
 Gómez M. Carlos A. 36
Gomphomacromia fallax 164, 165
 González Adalberto 91
 González M. María Berenice 217
 González Obando Ranulfo 128, 130, 132, 134, 136, 256
 Goulart Santana Antônio Euzébio 223
Gracilidris 159, 160, 161
 Granulovirus 27-31, 33, 34, 35

- Grapholita molesta* 67-70
 Grazing systems 159
 Grupos tróficos 294
 Guare 121
Guatteria 262
 Guerrero Roberto J. 159, 160
 Guevara Giovany 305
 Guo Yadong 95
 Gusano cogollero 217
 Gutiérrez E. M. Alejandra 228
 Gutiérrez Z. Gloria Patricia 251
H. bacteriophora 44, 45
Harlommillsia oculata 157, 158
Heliothis punctigera 44
 Hemiptera 16, 18, 19, 20, 79, 80, 81, 104, 113, 120, 128, 136, 198, 210, 244
 Hemiptera acuáticos 350
 Hermafrodita 43, 44, 45, 46
 Hernández C. Elías 228
 Heteroptera 331
 Heterorhabditidae 43-47, 198, 203
Heterorhabditis sp. 43-47, 198, 203
Heterotermes tenuis 36, 41, 42
Hevea brasiliensis 36, 37, 41
 Himenóptero 137
 Histeridae 95, 99, 103-10
 Hojarasca 294
 Honeydew 22, 23, 24, 212
 Hongo entomopatígeno 36
 Hormigas 294
 Host plant 1, 6, 7, 21, 25, 26, 76, 82, 111-115
 Hualo 56, 57
 Huella digital 173
 Huerta Fuentes Amanda 56, 58, 60
 Hurtado T. Hernando 279
 Hussien Amal Ibrahim 192
Hyalenna 117, 120
Hymenaea courbaril 174
 Hymenoptera 101, 104, 113, 119, 121, 126, 127, 137, 139, 151, 159, 161, 210, 238, 249, 279, 289
 Hyphomycetes 36, 41
Hypothenemus hampei 167, 173, 175, 183
Hypothenemus obscurus 173, 175
 Ichneumonidae 145, 150, 151
 IC-RT-PCR 77, 78, 79
 Infectivity 203
Inga edulis 48
Inga sp 48, 80
Inga spectabilis 48
 Inhibición de emergencia 91-94
 Inhibidor de aspártico proteasa 183
 Inhibidores de proteasas 183
 Insecticidas 1, 28, 34, 36, 37, 39, 71, 75, 91, 94
 Insecto ambrosial 48, 52, 54
 Insectos agalla 289
 Insectos de la corteza 56, 58
 Insectos del follaje 56, 58
 Insectos plaga 1, 2, 4, 6, 36, 37, 46, 47
Ipomoea batatas 249
Ipomoea purpurea 249
 Isoptera 36, 41, 42
 Ithomiini 117, 119, 120
 Itóminos 117
 Jaramillo C. Yenda 157, 158
 Jaramillo Jorge L. 48, 50, 52, 54
 Jiménez Peydró Ricardo 84, 86, 88, 90
 Kairomonas 1, 2
 Karlsson Miriam Frida 1
 Kennedy A. 164
 Lamiinae 82
 Lan Lingmei 95
 Larvicidal activity 262
 Larvicides 262
 Leguminosae 183
 Lenhart Audrey 91
 Lepidoptera 1-7, 27, 32, 34, 35, 43, 44, 67-76, 104, 113, 117, 119, 120, 223, 238, 240
Leptinotarsa decemlineata 2 6
 Leptohiphidae 327
 Lima Tatiane do Nascimento 354
 Lipid reserves 203
 López N Juan Carlos 43, 44, 46
 López R Andrés 273
 López-García Margarita M. 357
 Lorscheiter Rafael 67
Lucilia eximia 273
 Lucumi-Aragón Diana 256
Lupinus bogotensis 183
 Lygaeoidea 128, 129, 136, 331
 Lymantriidae 240
M. asilvai 121
M. beecheyi 121
M. bicolor 121
M. boliekiae 162
M. compressipes 121
M. crinita 121
M. eburnea fuscopilosa 121
M. grandis 121
M. marginata 121
M. quadrifasciata 121
M. scutellaris 121
M. seminigra 121
M. subnitida 121
Macadamia integrifolia 174
 Macedo de Oliveira Paulo Eugênio Alves 313
 Maestre H. Mario 77
 Magra Gustavo 294
Mahanarva fimbriolata 16, 17, 19, 20, 198
 Malaquias José Bruno 234
 Mananasa 167
 Manglar 350
 Manguifera 80
 Mao-Ling Sheng 240
 Marcadores moleculares 273
 Marina Carlos F. 269
 Marinho João Alfredo 80
 Marques Francisco A. 262
 Martinelli Nilza M. 341
 Martins Pires Evaldo 80, 82
 Mating 55, 67, 68, 69, 70
 Maximiniano Cleber 203
 Mayfly 327
Medicago sativa 21
Megaleria 117 120
 Mejía G. Marta Liliana 251
Melipona eburnea 121, 122, 123, 125, 127

- Meliponini 121, 127
 Melolonthidae 38, 152, 156
 Méndez-Rojas Diana M. 357
 Mendonça Jr. Milton De S. 111
 Mendonça Lúcia A. 203
 Mercado Víctor Tello 21, 22, 24, 62, 64, 66
 Mesoveliidae 351
Metamasius callizona 162, 163
Metarhizium anisopliae 16, 36, 37, 41, 42, 217, 234, 236
 Metopreno 91
 Microscopía electrónica 173
Microvelia 350
Mikeius 137
 Mimosoideae 80
 MIP 21, 22, 151
 Miridae 244
 Mitochondrial DNA 95, 96, 101, 102
 Modelación matemática 279
 Modesto Nonato Lucimara 354
 Moino Jr Alcides 203
 Molecular identification 95, 99, 100
 Molina V Diana 183
Monopelopia 111, 121, 128, 137, 145, 146, 150, 162, 163
Monopelopia tillandsia 162, 163
 Monteiro Priscila H. 244
 Montero Guillermo A. 294
 Montes Sônia Maria N. M. 249
 Monteze Alves Sérgio 289
 Montoya Esther C. 48
 Montoya Lerma James 8
 Mora A Antonio 228
 Morales Franciso J. 8
 Moreira Da Silva Isabel 80, 82
 Morfometría 318
 Morphology 341
 Mortalidad 269
 Mosca blanca 8, 13, 14, 210
 Mosquito control 262
 Mosquitos 84, 85, 87, 89, 92, 93, 94
 Muñoz Alegría Franciso 56
 Mycoinsecticides 234
 Myodochini 128, 129, 130, 131, 133, 134, 135, 136
Myrciaria sp 137
Myrmeleon brasiliensis 354
 Myrmeleontidae 354
Myrtopsen 137
Myrtopsen colombiensis n. sp. 137, 138
N. rileyi 198
 Naranjo-López Alma Gabriela 103
 Nates-Parra Guiomar 121, 122, 124, 126
 Natural enemy 234, 249
 Navarrete Valdivia Wilson 56
 Navarrete-Heredia José Luis 103, 104, 106, 108, 110
 Navarro Lucio 173
 Navarro-Silva Mario A. 262
 ND1 273
 Necrócolos 103, 104, 105, 107, 108
 Neita-Moreno Jhon César 152
 Nematodo entomopatígeno 43, 46
Neoleucinodes elegantalis 71-76
Neomyocoris 128-132, 134-136
 Neotrópico 162, 163
 Neotropics 305
 Neuroptera 354
Nicrophorus olidus 103, 105, 106, 108, 109
 Nitidulidae 357
 Nitidúlidos 357
 Nonato Junqueira Camila 313
Nothofagus glauca 56-60
 Nuevos registros 128, 129
 Ñame 77, 78, 79
Ochlerotatus caspius 84, 87
 Odonata 164, 165
 Olfatómetro 1, 2, 3, 4, 6
Oncometopia sp 77, 78, 79
 Oncopoduridae 157, 158
 Ophioninae 145, 151
Orgyia ericae 240
 Oriental moth 67
 Orthoptera 104, 140, 144
 Ospina Carlos M. 48
 Otero-Colina Gabriel 228
 Oviedo Milagros 91
Oxelytrum discicolle 103, 105-108
Oxydia vesulia 238
Oxymerus aculeatus 82
P. aprilei 140, 143, 144
P. cannaensis 62
P. duquei 140, 143, 144
P. lingulata 140, 143
P. medellina 117, 118, 119
P. mexicanus 62
P. mutilata 140, 143
P. nigra 140, 144
P. poecilosoma 140, 144
P. rosebergi 140
P. rotundus 62
P. temperellus 62
Pachacutia 117, 120
 Padilla H Beatriz E. 167
 Padilla-Gil Dora N. 350
Paenibacillus polymyxa 192
Paisana 128
Panonychus citri 62
Panonychus ulmi 62
 Papa 1-7, 27, 28, 29, 34, 35, 38, 41
 Papayo 228
Paracholula 128-133, 135
Paramastax 140-144
Paraselenis flava 249
 Parasitoide 240, 249
 Parasitoids 240, 249
Paravelia 350
 Parques Naturales de Colombia 128, 331
Passiflora quadrangularis 8
 Pathogenicity 234
 Patinadores neotropicales 350
 Patogenicidad 36-41, 43-46
 PCR 229
Pegascynips 137
Penissetum purpureum 244
Pephyssena 128-131, 133, 134
 Pequi 289
 Peralta C Osman 21, 22, 24, 63
 Pereira Adriano Elias 80
 Pereira dos Santos Emmerson 234

- Pérez Belkys 346
 Pérez H Antonio 77
 Pérez M Diana Elizabeth 210
 Peridomicilio 256
 Perlidae 305
 Persistencia 192
Phaseolus vulgaris 8, 14, 21, 25, 63, 187, 217
Photorhabdus 43, 46, 47
Phthorimaea operculella 2, 4, 6, 27, 34, 35, 70
 Phytoseiidae 62, 64, 65, 66, 120
 Piccoli Carla F. 262
Pichia sp 48, 52
 Pimenta Daniel S. 244
 Pinheiro Maria Lúcia B. 262
 Pinto Rosenilson 80
Pinus radiata 56
Pithecelobium 80
 Plant bug 244
 Plant resistance 16
 Planta hospedera 1, 2, 4, 5, 6, 21, 23, 74, 75, 111
 Platypodinae 49, 55
 Plecoptera 305
 Plectocynipinae 137
Plectocynips 137
Plutella xylostella 223
 Plutellidae 223
 PMI 95 101
 Poaceae 244
Poekilloptera phalaenoides 80, 81
 Polen 65, 121-127
 Polilla guatemalteca 1, 2, 6, 7, 27, 34
 Polygamy 67, 70
Polyphagotarsonemus latus 228
 Potexvirus 77
 Potyvirus 77, 78, 79
 Prado Simone S. 16
 Pratisoli Sirceu 238
 Predator 354
 Prédes Trindade Roseane Cristina 223
 Preferencias de anidación 313
 Prieto S Rodrigo 318
 Prioninae 82
Proprioseiopsis 62-66
Proprioseiopsis iorgius 62, 63, 65
 Prunas 80
Prunus cerasus 21
Prunus persica 21
Pseudoparmius 128-131, 134, 135
Psidium 80
Pteronymia zerlina 117
 Pujade-Villar Juli 137, 138
 Pyriproxyfen 91, 92, 93, 94
 Queiroz de Oliveira Flávia 234
 Quindío 357
 Quiroga Isabel 27, 28, 30, 32, 34
 Rebelo Maria T. 262
 Redaelli Luiza R. 67
 Regulador de crecimiento 91, 93
 Reinoso Gladys 305
 Relación ácaro-virus 228
 Rengifo-Correa Laura Alexandra 128, 130, 132, 134, 136, 331
 Resende Tiago T. 198, 244
 Resistencia genética 8
Reticulitermes 36, 40, 41, 42
 Rhabditida 20, 43, 44, 46, 47
Rhagoletia 350
 Rhinotermitidae 36, 37, 41, 42
 Rhyparochromidae 128, 136
Riekcynips 137
 Río San Carlos 346
 Riparian forests 111-113, 115
 Roble maulino 56, 57
 Rodríguez C Daniel 210
 Rodríguez C. Ángela 121, 122, 124, 126
 Rojas-Riaño Nancy Carolina 164
Rosa 80
 Rubio David 173
 Rubio G José D. 167
S. riobravae 45
 Sabana 289
Saccharopolyspora spinosa 269
Saccharum 16
Saccharum officinarum 36
 Sáenz A Adriana 43, 44, 46
 Salas-Quinchucua Cristhian 256
 Sales Maia Beatriz H. L. N. 262
 Salguero R Beatriz 279
 Salivazo 16
 Salivazo de los pastos 198
 Saltahojas 77
 Saltamontes payaso 140
 Sanabria Catalina 159, 160
 Sant'Ana Josué 67
 Santillán-Galicia Ma. Teresa 228
 Santos Rodrigo S. 341
 Sarcosaphagous beetles 95, 96, 99, 100
 Scarabaeidae 99, 101, 103-110, 156
 Scarabaeoidea 96, 103, 109
Schinopsis balansae 294
Scintillocoris 128
 Scolytinae 48, 49, 52, 55, 173, 183
 Selectivity 234
 Semioquímicos 1
 Shi-Xiang Zong 240
 Silenciamiento génico 171
 Silphidae 95, 96, 99, 100, 103-110
 Silva Daniela M. 244
 Sistema Nervioso Central 251
 Solanaceae 117, 118
Solanum lycopersicum 71, 210
Solanum melongena 71
Solanum quitoense 71
Solanum tuberosum 1, 2 6
 Solis Alma 71
Sorghum bicolor 251
 Souza Rabelo Laice 313
Spathodea campanulata 313
 Spinosad 269
 Spittlebug 16-20, 198
Spodoptera frugiperda 217
Spodoptera littoralis 192
 Staphylinidae 357
Steinernema 198
Steinernema feltiae 45, 47
 Steinernematidae 198, 203

- Sterling C Armando 36, 38, 40, 42
Stridulocoris 128-131, 134, 135
 Suárez Jorge 91
 Sugarcane 16, 17, 18, 19, 20
 Sumilarv 91, 92, 93, 94
 Tabla de vida 21-25, 62, 63, 64, 66, 117
Tamarindus indica 174
 Tanypodinae 162, 163
 Tarsonemidae 228
 Taxonomía 331, 341
 Taxonomy 331, 341
Tecia solanivora 1, 3, 5, 6, 7, 27, 33, 34
 Temefos 9, 92, 94
 Tenebrionidae 251
 Termitas 36, 37, 38, 39, 40, 41
 Tetranychidae 62, 65, 66
Tetranychus cinnabarinus 21-25, 62, 63
Tetranychus desertorum 62
Tetrastichus sp 240
Theobroma 80
 Thrasorinae 137, 139
 Thrasorino 137
Thrasorus 137
 Tobón Flor Ángela 251
 Tolerante 16
 Tomate 210
 Torres C Yusdiel 162
 Tortricidae 67, 68, 70
 Toxicidad 192, 269
Trialeurodes vaporariorum 210
 Trichogramma 238
Trichogramma acacioi 238
Trichogramma caiaposi 238
Trichogramma demoraesi 238
Trichogramma maxacalii 238
Trichogramma pratissolii 238
Trichogramma soaresi 238
 Trichogrammatidae 238
Tricorythodes caunapi 327
 Tropics 305
Ulumoides dermestoides 251
 Uribe S. Sandra Inés 273
 Valle Javier 269
 Vargas-Osuna Enrique 192
Varipes 346
Varipes sancarlos n. sp. 346
 Vector 8-15, 77-94
 Veliidae 350
 Vendramim José D. 16
 Viçosa 80 82 83
Vigna radiata 251
Villalobosothignus 128
 Villamizar R Laura 27
Wasmannia auropunctata 279
 Witzgall Peter 1
 Xerosaprinus sp 103, 105, 106, 107, 108
 Xilanasa 167
Xilella fastidiosa 77
 Xilófagos 56 57
Xylocopa 313
 Xylocopini 313
 Yepes Francisco 152
 YMMV 77, 78, 79
 You-Qing Luo 240
 Zambrano-González Giselle 117
 Zamora E Humberto 183
Zea mays 82, 36, 217
 Zhang Mengqi 95
 Zhuang Quan 95, 96, 98, 100, 102
 Zingiberaceae 357
 Zoocria 117, 118, 119

REVISTA COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA

Volumen 37 No. 2 Julio - Diciembre 2011

- Screening of entomopathogenic nematodes to control *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae)
Elder Simões de Paula Batista, Alexander M. Auad, Tiago Teixeira de Resende, and Caio Márcio de Oliveira Monteiro 198
- Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes
Vanessa Andalo, Alcides Moino Jr., Cleber Maximiano, Vicente P. Campos, and Lúcia A. Mendonça 203
- Dispersión de *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitando *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) en tomate bajo invernadero
Diana Elizabeth Pérez M., Fernando Cantor R., Daniel Rodríguez C. y José Ricardo Cure 210
- Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae)
Cipriano García G., María Berenice González M. y Néstor Bautista M. 217
- Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)
Roseane Cristina Prêdes Trindade, Josiane de Souza Luna, Maria Raquel Ferreira de Lima, Paulo Pedro Da Silva, and Antônio Euzébio Goulart Sant'ana 223
- Relación entre *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae) y el virus de la mancha anular del papayo (PRSV-p)
José Angel Alcantara J., Ma. Teresa Santillán-Galicia, Gabriel Otero-Colina, Antonio Mora A., M. Alejandra Gutiérrez E. y Elías Hernández C. 228
- Notas científicas / Scientific notes**
- Susceptibility of the predator *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae) to mycoinsecticides
Flávia Queiroz de Oliveira, Jacinto de Luna Batista, José Bruno Malaquias, Carlos Henrique de Brito, and Emmerson Pereira Dos Santos 234
- Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species as an agents of biological control of *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae)
Harley Nonato De Oliveira, José Cola Zanuncio, Fabrício Fagundes Pereira, and Dirceu Pratissoli 238
- Emergence patterns of *Orgyia ericae* (Lepidoptera: Lymantriidae) parasitoids
Cui Ya-Qin, Sheng Mao-Ling, Luo You-Qing, and Zong Shi-Xiang 240
- Collaria oleosa* (Hemiptera: Miridae) on *Brachiaria ruziziensis* and *Penisetum purpureum* (Poaceae): Characterization of injury and biological aspects
Alexander M. Auad, Daniel S. Pimenta, Daniela M. Silva, Priscila H. Monteiro, and Tiago T. Resende 244
- Parasitismo de huevos de *Paraselenis flava* (Coleoptera: Chrysomelidae) en batata (*Ipomoea batatas*)
Sônia Maria N. M. Montes y Valmir A. Costa 249

Sección Médica / Medical

- Evaluación del perfil neurofarmacológico del aceite de *Ulumoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae)
Flor Ángela Tobón, Gloria Patricia Gutiérrez Z. y Marta Liliana Mejía G. 251
- Actividad de picadura de *Anopheles calderoni* (Diptera: Culicidae) en dos localidades del Valle del Cauca, Colombia
Diana Lucumi-Aragón, Ranulfo González O. y Cristhian Salas-Quinchucua 256
- Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)
Sullamy D. G. Aciole, Carla F. Piccoli, Jonny E. Duque L., Emmanoel V. Costa, Mario A. Navarro-Silva, Francisco A. Marques, Beatriz H. L. N. Sales Maia, Maria Lúcia B. Pinheiro, and Maria T. Rebelo 262

Notas científicas / Scientific notes

- Efectos ovicida y larvicida del spinosad en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)
Ana L. Argueta, Javier Valle y Carlos F. Marina 269
- Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae)
Paula Andrea Giraldo H., Sandra Inés Uribe S. y Andrés López R. 273

Sección Básica / Basic

- Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae): ¿unicolonial o multicolonial? en el valle geográfico del río Cauca
Beatriz Salguero R., Inge Armbrrecht, Hernando Hurtado T. y Ángela María Arcila C. 279
- Within tree distribution of a discoid gall on *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae)
Germano Leão Demolin Leite, Aline Fonseca do Nascimento, Fabiene Maria de Jesus, Sérgio Monteze Alves, and Geraldo Wilson Fernandes 289
- Ensamblajes estacionales de artrópodos epigeos en un bosque de quebracho (*Schinopsis balansae*) en el Chaco Húmedo
Guillermo A. Montero, Nélida J. Carnevale y Gustavo Magra 294
- Seasonal size distribution of *Anacroneuria* (Plecoptera: Perlidae) in an andean tropical river
Hugo Bohórquez, Gladys Reinoso, and Giovany Guevara 305
- Recursos ecológicos utilizados por las especies de *Xylocopa* (Apidae: Xylocopini) en el área urbana
Talles Marques Chaves-Alves, Camila Nonato Junqueira, Laice Souza Rabelo, Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira y Solange Cristina Augusto 313
- Variación genética de poblaciones de *Drosophila mercatorum* (Diptera: Drosophilidae) en ecosistemas semiáridos
Ana Patricia Estrada F. y Rodrigo Prieto S. 318
- Tricorythodes caunapi*: a new species from the rain forest of the colombian pacific (Ephemeroptera: Leptohyphidae)
Lucimar G. Dias, Tito Bacca, and Paulo S. F. Ferreira 327
- Lygaeoidea (Hemiptera: Heteroptera) de Parques Nacionales Naturales (PNN) con nuevos registros para Colombia
Laura Alexandra Rengifo-Correa y Ranulfo González Obando 331
- Morphological characterisation of five brazilian species of *Fidicinoides* (Hemiptera: Cicadidae)
Rodrigo S. Santos and Nilza M. Martinelli 341
- Varipes* (Ephemeroptera: Baetidae) en Venezuela: descripción de nueva especie
Maria Mercedes Castillo y Belkys Pérez 346
- Notas científicas / Scientific notes**
- Hemiptera acuáticos asociados a los estuarios de la costa pacífica colombiana
Dora N. Padilla-Gil y Osvaldo Arcos P. 350
- Predation behavior of the *Myrmeleon brasiliensis* (Neuroptera: Myrmeleontidae) larval instars
Lucimara Modesto Nonato and Tatiane do Nascimento Lima 354
- Staphylinidae y Nitidulidae (Coleoptera) asociados a inflorescencias de *Etlingera elatior* (Zingiberaceae)
Margarita M. López-García, Diana M. Méndez-Rojas y Rocío García Cárdenas 357



Sociedad Colombiana de Entomología

Apartado Aéreo 11366 Bogotá, D. C., Colombia • Tarifa postal reducida para libros y revistas No. 476 de 4-72, vence Dic. 31 / 2011