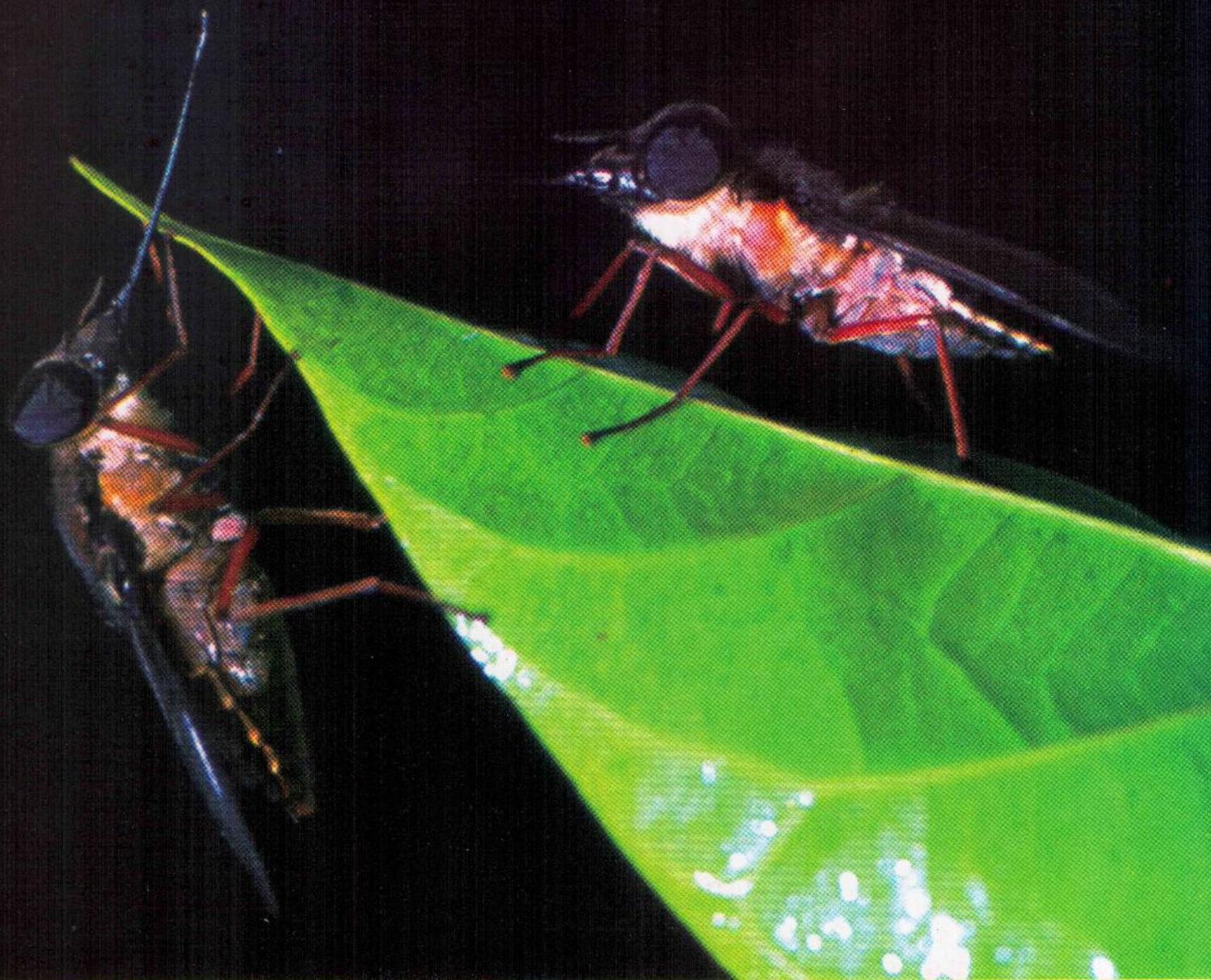


ISSN-0120-0488

# REVISTA COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA

Volumen 33 • Número 2 • Julio - Diciembre 2007

Tarifa Postal Reducida No. 239 - Vence Dic. 31 / 2007



Publicación oficial de la Sociedad Colombiana de Entomología

## Sección Agrícola

## Análisis y aplicaciones de la tipificación molecular del genoma mitocondrial de *Beauveria bassiana*

Analysis and applications of the molecular typification of the mitochondrial genome of *Beauveria bassiana*

DANIEL URIBE\*<sup>1,2</sup> y GEORGE KHACHATOURIANS<sup>1</sup>

**Resumen:** *Beauveria bassiana* es uno de los hongos entomopatógenos más ampliamente usados a nivel mundial para el control de plagas en el sector agrícola. Su importancia desde el punto de vista comercial ha planteado la necesidad de desarrollar estrategias de caracterización molecular, con el objeto de realizar seguimiento de las cepas en campo y eventualmente lograr la protección de aquellas comercialmente importantes. El genoma mitocondrial es una herramienta que se presta para la caracterización taxonómica, la realización de estudios filogenéticos y la identificación de cepas a nivel molecular, ya que es una molécula haploide, de rápida evolución, y con similitud funcional en diferentes niveles taxonómicos. En este trabajo se evaluó la diversidad de DNA mitocondrial en 20 cepas del hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Esta caracterización se realizó mediante el uso de la técnica de RFLP empleando el DNA total de la cepa de referencia GK2016 digerido con la enzima de restricción *Hpa* II como sonda. Se encontró una gran diversidad representada por la presencia de 10 mito-tipos dentro de la muestra estudiada. No se encontró relación específica entre patrones de mito-tipificación y el origen geográfico o de hospedero. Así mismo se realizó un análisis filogenético de diferentes especies de hongos filamentosos incluyendo algunos entomopatógenos empleando el gen que codifica para el fragmento 16s srRNA de origen mitocondrial. El análisis de estos resultados y nuestra interpretación de las implicaciones en la investigación de *B. bassiana* serán discutidos.

**Palabras clave:** Hongos entomopatógenos. Mitocondria. RFLP. Caracterización molecular.

**Abstract:** *Beauveria bassiana* is one of the entomopathogenic fungi most widely used world wide for the control of insect pests in the agricultural sector. Its importance from the commercial point of view has lead to the necessity to develop strategies of molecular characterization, with the aim of following the fate of strains in the field and eventually protecting those that are most commercially important. The mitochondrial genome is a tool that is appropriate for taxonomic characterization, the development of phylogenetic studies and the characterization of strains at the molecular level because it is a haploid molecule, fast evolving and with functional similarity at different taxonomic levels. In this work the mitochondrial DNA diversity of 20 strains of the entomopathogenic fungi *B. bassiana* were evaluated. This characterization was done by using the RFLP technique with the total mitochondrial DNA of the standard strain GK2016 digested with the restriction enzyme *Hpa* II as a probe. A great diversity was found, represented by the presence of 10 mito-types within the sample studied. No specific relationship was found between the patterns of mito-typification and either the geographic origin or the host. Similarly a phylogenetic analysis was conducted on several filamentous fungi species including some entomopathogenic fungi using the mitochondrial gene 16s srRNA. The analysis of these results and our interpretation of the implications for research on *B. bassiana* are discussed.

**Key words:** Entomopathogenic fungi. Mitochondria. RFLP. Molecular characterization.

### Introducción

Las moléculas de ADN mitocondrial (ADN mt) son genomas relativamente pequeños que coevolucionan a su propia tasa evolutiva en relación con genoma nuclear de los organismos en los cuales ellos están alojados. Particularmente en animales y hongos dichos genomas evolucionan más rápidamente que su contraparte de ADN nuclear (Kouvelis *et al.* 2004). El ADN mt es ampliamente empleado para la determinación de relaciones taxonómicas y filogenéticas entre los grupos de organismos eucarióticos que poseen dicho organelo. Las razones para su popularidad reside en características intrínsecas de esta molécula tales como su reducido tamaño, la alta tasa evolutiva, la falta de bases metiladas, el alto contenido de residuos adenina-timina (AT) y el hecho de ser una molécula haploide donde la mayoría de los alelos poseen la misma función e inclusive poseen regiones universalmente conservadas (Burns *et al.* 1991). Dentro del genoma

mitocondrial las secuencias de ARN ribosomal (ARNr) han sido empleadas como herramienta molecular para identificar relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos (Hillis *et al.* 1996).

El genoma mitocondrial en hongos filamentosos es usualmente una molécula circular de ADN, de tamaño variable que oscila entre 18,9 kpb en *Torulopsis glabatra* y 176 Kpb en *Agaricus bitorquis* (Quel) (Taylor 1986). A pesar de las diferencias en tamaños, todos los genomas mitocondriales pertenecientes a hongos examinados hasta la fecha poseen un número similar de genes, incluyendo una serie de genes de ARNr, 23-26 ARN de transferencia (ARNt) y varios genes codificantes de proteínas (Khachatourians y Uribe 2004). La diferencia en tamaño en relación con los genomas más grandes está determinada principalmente por intrones y regiones ricas en A-T (Cummings *et al.* 1990).

En los hongos entomopatógenos (HE) el genoma mitocondrial de los organismos donde dicha molécula ha sido

\*<sup>2</sup> Autor para Correspondencia: Ph. D., Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Biotecnología, A.A. 14-490, Bogotá, D.C. Colombia. [duribe@unal.edu.co](mailto:duribe@unal.edu.co)

<sup>1</sup> Ph. D., BioInsecticide Research Laboratory, Department of Applied Microbiology and Food Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK S7N 5A8, Canada. [khachatouria@skyway.usask.ca](mailto:khachatouria@skyway.usask.ca)

estudiada es relativamente pequeño (Khachatourians y Uribe 2004). Los tamaños oscilan entre 24,5 kpb en *Lecanicillium muscarium* (Petch) (Sinónimo *Verticillium lecanii*) (Kouvelis *et al.* 2004) y 32 kpb en *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) (Mavridou y Typas 1998), pasando por 28,5 kpb en *Beauveria bassiana* (Bálsamo) (Pfeifer *et al.* 1993). Su reducido tamaño sugiere moléculas con pocas secuencias intergenéticas redundantes, así como poca frecuencia de secuencias tipo intrones y por ende poca variabilidad genética a nivel intraespecífico (Khachatourians y Uribe 2004; Kouvelis *et al.* 2004). Sin embargo, a pesar del reducido tamaño de los genomas mitocondriales en los HE, Mavridou y Typas (1998) demostraron un alto grado de variabilidad genética asociada al genoma mitocondrial de *M. anisopliae*. En su trabajo estos investigadores encontraron 16 patrones de RFLP mitocondrial, luego de analizar 25 cepas de *M. anisopliae* obtenidas de 15 países, demostrando así un alto grado de variabilidad genética asociada al genoma mitocondrial de este HE. Así mismo, Kouvelis *et al.* (1999) identificaron una alta variabilidad genética presente en el genoma del HE *L. muscarium* al encontrar 17 mitotipos diferentes luego de analizar 51 cepas.

*Beauveria bassiana* es uno de los hongos entomopatógenos más ampliamente usados a nivel mundial en el control de insectos plaga en la industria agrícola y forestal (Inglis *et al.* 2001). La razón para esta preferencia reside en su amplio rango de acción correspondiente a cerca de 750 especies de insectos, el alto grado de conocimiento a nivel molecular de la interacción hospedero-patógeno y el desarrollo del sistema de producción de este hongo (Feng *et al.* 1994; Inglis *et al.* 2001; Khachatourians *et al.* 2002). El éxito comercial de *B. bassiana* ha llevado a la necesidad de desarrollar sistemas de tipificación molecular, no únicamente con el objeto de proteger algunas cepas de interés comercial, sino para lograr el seguimiento de las mismas en campo con el objeto de entender su capacidad de residualidad, así como la estructura poblacional del género a nivel molecular (Gaitán *et al.* 2002; Padmavathi *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003). Diferentes aproximaciones se han llevado a cabo para la detección de polimorfismos genéticos en *B. bassiana*, entre las técnicas más sobresalientes se pueden mencionar la de RFLP (Kosir *et al.* 1991; Maurer *et al.* 1997; Coates *et al.* 2001), polimorfismos asociados a la conformación de cadena sencilla (Hegedus y Khachatourians 1996), análisis telomérico (Couteaudier y Viaud 1997; Padmavathi *et al.* 2003) e inclusive combinación de técnicas como PCR anidado del gen de la Pr1, marcadores de microsatélites y análisis de 28s rADN (Wang *et al.* 2003). Estos análisis han proporcionado una mejor comprensión de la taxonomía y la tipificación molecular de la especie, sin embargo, estas aproximaciones no incluyen el análisis de ADN mt, el cual, como bien se mencionó antes, es una molécula altamente informativa para este tipo de análisis.

El DNA mitocondrial de *B. bassiana* ha sido caracterizado con respecto a los rasgos físico-químicos más relevantes, tales como densidad boyante, temperatura de fusión, contenido de G+C, mapa genómico y secuencia de aproximadamente 60% del genoma (Pfeifer y Khachatourians 1989; Hegedus *et al.* 1991; Pfeifer *et al.* 1993; Hegedus *et al.* 1998). El análisis de polimorfismos del DNA mt de *B. bassiana*, fue abordado por primera vez por Hegedus y Khachatourians (1993). En dicho estudio fueron empleadas 15 cepas principalmente de norte América, mostrando únicamente dos genotipos mitocondriales, lo cual sugirió un genoma altamente conservado en relación con

otros HE como *M. anisopliae* y *L. muscarium* (Mavridou y Typas 1998; Kouvelis *et al.* 1999).

En este estudio se pretende evaluar nuevamente el polimorfismo de ADN mt de *B. bassiana*. Para tal fin se empleó la técnica de RFLP en 18 aislamientos de la especie pertenecientes a cuatro continentes. Digestiones simples y dobles del ADN total de cada cepa se confrontaron contra el ADN mt total de la cepa GK2016 empleada como sonda. Así mismo, se presenta un análisis filogenético de la especie empleando secuencias de 16sRNA del ADN mt, con lo cual se busca establecer relaciones de los hongos entomopatógenos con otro grupo de hongos filamentosos.

## Materiales y Métodos

**Hongos entomopatógenos.** Veinticinco aislamientos identificados como *B. bassiana*, *B. amorpha* (Hohn), *B. nivea* (Syn *Tolypoladium inflatum* (W. Gams), *B. cylindrospora* (Syn. *Tolypocladium cylindrosporum* (W. Gams), *Beauveria* spp, *P. farinosus* (Holmsk) y *M. anisopliae* fueron estudiados; sus insectos hospederos y orígenes geográficos están descritos en la Tabla 1. Los hongos fueron propagados en medio Sabouraud-Dextrosa incubados por 72 horas a 27°C y 150 rpm, y almacenados en glicerol al 12,5% de acuerdo al procedimiento de Pfeifer y Khachatourians (1989).

**Sondas de ADNmt.** Las sondas de ADN mt usadas en este estudio fueron el fragmento BbmtE2 descrito por Hegedus y Khachatourians (1993), el cual contiene el gen NAD1 y el extremo 5' del gen ATP6. Este fragmento fue obtenido a partir de ADN mt de la cepa de *B. bassiana* GK2016 (Hegedus y Khachatourians 1993; Pfeifer *et al.* 1993). Así mismo el ADN mt completo de la misma cepa fue aislado usando la técnica de gradiente de CsCl-bis-benzimida descrita por Pfeifer y Khachatourians (1989). Una vez obtenido el genoma mitocondrial éste fue digerido con la enzima de restricción *Hpa* II para posteriormente ser marcado y empleado como sonda.

**Preparación del ADN mt.** El análisis de RFLP para estudiar los polimorfismos del DNA mt de *B. bassiana*, se realizó empleando ADN total de cada una de las cepas a analizar. Dicho ADN fue aislado siguiendo la técnica de micelio liofilizado descrita por Pfeifer y Khachatourians (1989). Las técnicas de aislamiento de plásmidos, digestión enzimática de ADN, hibridación, transferencia y revelado, así como la elaboración de soluciones tampón fueron realizados de acuerdo con los protocolos estándar descritos por Sambrook y Russell (2001).

A continuación se describen brevemente los procedimientos asociados a la preparación DNA mt, para llevar a cabo los análisis de polimorfismos. Entre siete y diez microgramos de ADN genómico total aislado de cada aislamiento fúngico fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoR* I. Adicionalmente, el ADN fue sometido a digestión doble empleando las enzimas *EcoR* I- *Hind* III y *EcoR* I – *Bgl* II cuando pBbmtE2 y ADN mt total respectivamente, fueron usados como sonda. El ADN fue separado electroforéticamente en geles de agarosa-TBE (0,09 M Tris-HCl, 0,09 M ácido bórico, 0,02 M EDTA) al 0,8% (peso/vol). Posteriormente el ADN fue transferido a membranas de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) por el método de transferencia por capilaridad (Sambrook y Russell 2001).

**Análisis de polimorfismos mitocondriales por RFLP.** Las membranas de nylon con el ADN total fueron hibridizadas a 52°C con sondas no radioactivas marcadas con digoxigenina por la técnica de incorporación de nucleótidos modificados por iniciadores aleatorios (“random primers”), de acuerdo al manual de instrucciones del productor (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim 1999). Las condiciones de astringencia durante el procedimiento de lavado consistieron en dos lavados durante 30 min. cada uno 0,5x SSC (20X SSC es 175,3 g de cloruro de sodio y 88,2 g de citrato de sodio por litro) y 0,5% de sodio dodecil sulfato a 52°C luego de dos lavados previamente realizados a 2xSSC, 0,1% SDS a 25°C en agitación constante, siguiendo las indicaciones del productor del kit de marcación y detección.

La capacidad de las bandas de ADN para hibridizar con las sondas mitocondriales fueron registradas con caracteres binarios donde 1 = presencia y 0 = ausencia de hibridización. Las relaciones filogenéticas entre los polimorfismos mitocondriales obtenidos fueron estimadas usando el método de la parsimonia de Wagner luego de 1000 reorganizaciones usando la opción “bootstrap” con el programa PHYLIP (Felsenstein 1989).

**Análisis filogenético empleando secuencias de ADN mt 16sRNA.** Un árbol filogenético basado en las secuencias génicas mitocondriales de 16sRNA provenientes de trece hongos filamentosos fue construido usando 743 nucleótidos no ambiguamente alineados. Estas secuencias fueron sometidas al análisis de “neighborhood-joining” usando el programa CLUSTAL W (Higgins *et al.* 1994), luego de 1.000 pasos de reorganizaciones usando la opción “bootstrap”.

## Resultados

**Análisis de genotipos mitocondriales empleando la sonda BbmtE2.** Se realizaron tres aproximaciones para caracterizar los patrones de RFLP obtenidos al analizar el ADN mt de *B. bassiana*. La primera consistió en el aislamiento del ADN total de 18 cepas de la especie. El ADN de estas cepas fue digerido con la enzima de restricción *EcoR* I y confrontado con la sonda de ADN mt BbmtE2. Se encontraron cinco genotipos mitocondriales (mito-tipos) (Tabla 1) con diferencias entre una y dos bandas entre sí. Los mito-tipos A y B, descritos previamente por Hegedus y Khachatourians (1993) prevalecieron dentro de la población analizada. Seis de los 18 aislamientos de *B. bassiana* mostraron genotipo A, mientras que ocho aislamientos mostraron genotipo B cuando son digeridos con *EcoR* I. Estos mito-tipos se caracterizan por presentar una banda de 4,6 Kb y 4,1 Kb respectivamente. Dos aislamientos presentaron el mito-tipo C el cual consiste en dos bandas de 4,4 y 2,1 Kb respectivamente. Finalmente, un aislamiento representa los mito-tipos D y E con una banda de 5,4 Kb y dos bandas de 4,4 kb y 0,8 Kb respectivamente (Tabla 1).

La segunda aproximación, que consistió en la digestión doble del ADN total con las enzimas *EcoR* I y *Hind* III y confrontado contra la sonda BbmtE2, básicamente confirmó los resultados descritos arriba al mantener los cinco mito-tipos con la digestión sencilla (*EcoR* I) para cada aislamiento. La única excepción fue la cepa DAOM 144746, la cual, luego de la digestión sencilla, fue identificada dentro del mito-tipo A (con una banda de 4,6 Kb), pero la doble digestión con *EcoR* I y *Hind* III mostró únicamente dos bandas de 3,1 y 0,6 Kb,

como las cepas caracterizadas como mito-tipo B, en lugar de las tres bandas obtenidas para los aislamientos del mito-tipo A (resultados no mostrados). Este resultado sugiere que la cepa DAOM 144746 posee un sitio de corte extra para la enzima de restricción *Hind* III, produciendo bandas de tamaño molecular más pequeño que no lograron ser detectadas en la membrana de hibridización. Las diferencias en el genoma mitocondrial de esta cepa fueron confirmadas más adelante cuando el ADN total fue doblemente digerido con las enzimas de restricción *EcoR* I - *Bgl* II y confrontada contra el ADN mt total de la cepa GK2016 como sonda (Tabla 2). En conclusión, la estrategia de doble digestión ayudó a mejorar el nivel de resolución de la sonda BbmtE2, evidenciando seis mito-tipos en lugar de cinco dentro de la población estudiada. Sin embargo esta estrategia posee menos capacidad de resolución cuando es comparada con la utilización del ADN mt total como sonda.

Las otras especies de *Beauveria* usadas en este estudio fueron *B. amorpha*, *B. nivea*, *B. cylindrospora* y *Beauveria* spp. Las primeras tres especies fueron fácilmente diferenciadas de las cepas de *B. bassiana* al ser confrontadas con la sonda BbmtE2 luego de la digestión simple y doble del ADN total (Tabla 1). Este resultado confirma que el análisis de RFLP mitocondrial es una herramienta confiable para diferenciar cepas a nivel de especie como fue reportado por Hegedus y Khachatourians (1993). Teniendo en cuenta esa consideración, nuestros resultados sugieren que los aislamientos de *Beauveria* spp. ARSEF 32 y ARSEF 3289 pertenecen a *B. bassiana* ya que ambos aislamientos poseen el mitotipo B al ser sometidos a digestión simple y doble y confrontados contra la sonda BbmtE2. Adicionalmente, un análisis filogenético empleando el DNA mt total como sonda (resultados no mostrados) agrupó estas dos cepas con el grupo principal de 15 cepas de *B. bassiana*.

Otras dos especies de HE, *Paecilomyces farinosus* (Holmsk) y *Metarhizium anisopliae* fueron también incluidas. Estos dos géneros presentaron claramente patrones de hibridización diferentes en comparación con los aislamientos de *Beauveria* (Tablas 1-2; Fig. 1). Estos resultados confirman nuevamente que este sistema de tipificación molecular puede ser usado para diferenciar entre al menos algunos géneros principales de HE. Sin embargo, la cepa de *P. farinosus* ATCC 1360 presentó una banda de 4,6 Kb, similar a los aislamientos del mito-tipo A de los aislamientos de *B. bassiana*, cuando el ADN total fue digerido con la enzima de restricción *EcoR* I. A pesar de estas similitudes, cuando el ADN total fue sometido a digestión doble, con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Hind* III, únicamente una banda de 3,8 Kb fue encontrada, en lugar de dos o tres bandas como en los mito-tipos A y B de los aislamientos de *B. bassiana* (Tabla 1). Estos resultados sugieren que el fragmento complementario con la sonda de BbmtE2 en *P. farinosus* no posee sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *Hind* III hacia el segmento central de este fragmento. Sin embargo, si debe poseer un par de estas secuencias hacia uno o ambos extremos del segmento produciendo fragmentos más pequeños que no pudieron ser detectados en la membrana de nylon.

**Análisis de genotipos mitocondriales empleando ADN mt total como sonda.** La última aproximación para identificar mito-tipos diferentes en cepas de *B. bassiana* consistió en la hibridización de ADN total digerido con las enzimas de restricción *EcoR* I - *Bgl* II, con el ADN mt total de la cepa GK2016 empleado como sonda. El ADN mt fue previamente

**Tabla 1.** Cepas de hongos entomopatogénicos empleados en este estudio con su origen geográfico, hospedero y sus respectivos mito-tipos luego de un corte sencillo (*Eco*-RI) y con doble clivaje (*Eco*R I – *Hind* III) y confrontado con la sonda mitocondrial de *B. bassiana* BbmtE2.

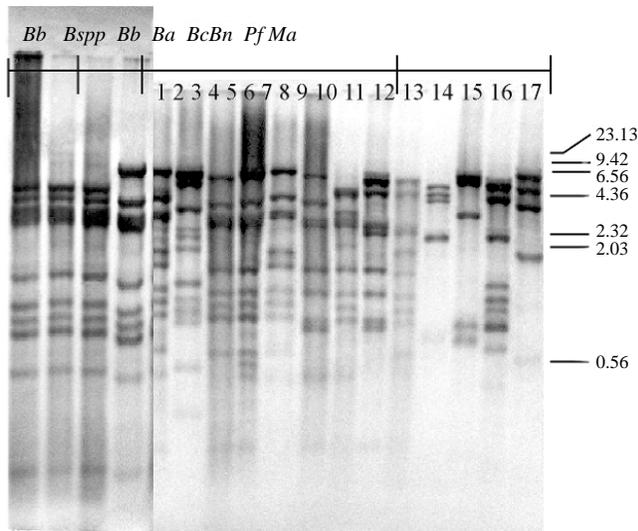
Especie de HE	Cepa	Origen geográfico	Hospedero	Mito-tipos		
				<i>Eco</i> R I- <i>Eco</i> R I	<i>Hind</i> III	
<i>B. bassiana</i>	GK2016	Canadá	ND	4.6 (A) <sup>a</sup>	3.1; 0.8; 0.6 (A)	
	DAOM 195005	Canadá	Lepidoptera	4.6 (A)	3.1; 0.8; 0.6 (A)	
	ARSEF 3286	Francia	Lepidoptera	4.6 (A)	3.1; 0.8; 0.6 (A)	
	ARSEF 3113	USA	Lepidoptera	4.4;2.1 ( C)	3.1; (0.8) <sup>b</sup> ; 0.6; 0.3 ( C)	
	ARSEF 959	Brazil	Lepidoptera	5.4 (D)	4.0 (D)	
	ARSEF 1512	Francia	Lepidoptera	4.4;2.1 ( C)	3.1; (0.8) <sup>b</sup> ; 0.6; 0.3 ( C)	
	ARSEF 5640	Etiopia	Orthoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)	
	ARSEF 5642	Etiopia	Orthoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)	
	ARSEF 5643	Etiopia	Orthoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)	
	ARSEF 3622	USA	Orthoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)	
	ARSEF 3866	Grecia	Orthoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)	
	ARSEF 5273	Grecia	Orthoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)	
	ARSEF 4150	Australia	Orthoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)	
	ARSEF 356	Australia	Orthoptera	4.4; 0.8 (E)	ND	
	DAOM 210569	Canadá	Coleoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)	
	ATCC 44860	USA	Soil	4.6 (A)	3.1; 0.8; 0.6 (A)	
	DAOM 144746	Canadá	Soil	4.6 (A)	3.1; 0.6 (B)	
	USSR 2274	USSR	NA	4.6 (A)	3.1; 0.8; 0.6 (A)	
	<i>Beauveria</i> sp.	ARSEF 3289	México	Lepidoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)
		ARSEF 32	USA	Orthoptera	4.1 (B)	3.1; 0.6 (B)
<i>B. amorpha</i>	ARSEF 6376	USA	Orthoptera	4.6 (A)	3.9 (E)	
<i>B. cylindrospora</i>	ATCC 56519	República Checa	Soil	7.8;0.6 (F)	1.3; 1.1; 0.5 (F)	
<i>B. nivea</i>	ATCC 18981	ND	NA	3.4; 0.8 (G)	1.4; 0.8; 0.5; (0.3) (G)	
<i>P. farinosus</i>	ATCC 1360	ND	NA	4.6 (A)	3.8 (H)	
<i>M. anisopliae</i>	<i>M.a</i> 549	ND	NA	20;0.7 (I)	6.7; (0.3) (I)	

<sup>a</sup> El mito-tipo obtenido luego del resultado de cada corte de restricción está en paréntesis y en mayúscula. <sup>b</sup> Números en paréntesis representan bandas débiles. ND: No Disponible.

**Tabla 2.** Genotipos mitocondriales de cepas de hongos entomopatogénicos luego de ser digeridos con las enzimas de restricción *Eco*R I y *Bgl* II y confrontadas con el ADN mt total de la cepa de referencia de *B. bassiana* GK2016.

Especies de hongos	GM <sup>a</sup>	Tamaños (en Kb) de los fragmentos moleculares de ADN mitocondrial	Cepas
<i>B. bassiana</i>	I	7.1;4.6;3.9;3.4;2.9;1.8;1.3;1.2;1.0;0.7	GK2016; USSR 2274; DAOM 195005; ARSEF 3286
	II	4.1;3.8;3.4;2.9;2.7;1.8;1.3;1.2;1.0;0.7	ARSEF 5640; ARSEF 5642; ARSEF 5643; DAOM 210569; ARSEF 3622
	III	7.1;3.6;2.9;2.7;1.8;1.3;1.2;1.0;0.7	ARSEF 3866; ARSEF 5273
	IV	4.6;3.4;2.9;2.7;(2.3) <sup>b</sup> ;1.8;1.3;1.2;1.0;0.5	ATCC 44860
	V	7.1;3.8;2.9;2.7;1.8;1.3;1.0;0.9;0.5	ARSEF 4150
	VI	7.5;3.9;3.4;(2.3);(2.5);2.1;1.8;1.3;1.2;1.0;0.7; (0.5)	ARSEF 3113; ARSEF 1512
	VII	7.1;5.2;3.4;2.5;2.4;2.2;1.4;1.2;1.0;0.9;0.6; (0.3)	ARSEF 959
	VIII	7.1;4.6;2.7;2.5;1.8;1.3;1.0;0.9	DAOM 144746
	IX	7.1;3.8;3.4;2.9;1.8;1.3;1.2;1.0;0.7;0.6;0.5	ARSEF 356
<i>Beauveria</i> spp.	II	4.1;3.8;3.4;2.9;2.7;1.8;1.3;1.2;1.0;0.7	ARSEF 32
	X	4.1;3.8;3.4;2.9;2.7;1.8;1.3;1.2;1.0;0.5	ARSEF 3289
<i>B. amorpha</i>	XI	7.1;4.6;2.7;2.6;2.2;1.8;1.3;1.2;1.0;0.8;(0.6)	ARSEF 6376
<i>B. cylindrospora</i>	XII	5.8;4.6;3.9;2.4;(0.8);(0.7)	ATCC 56519
<i>B. nivea</i>	XIII	7.3;7.1;3.4;(2.3);0.9;0.8	ATCC 18981
<i>P. farinosus</i>	XIV	7.1;4.1;2.4;(1.8);1.6;1.3;1.2;0.9;0.7;(0.4)	ATCC 1360
<i>M. anisopliae</i>	XV	7.4;5.8;3.8;2.1;0.6	<i>M. a</i> 549

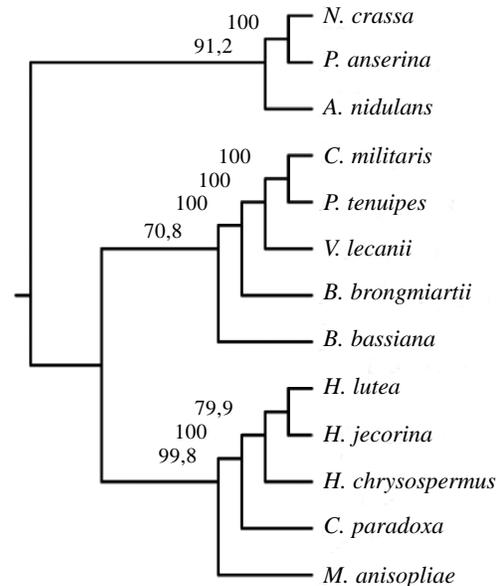
<sup>a</sup> Genotipos mitocondriales. <sup>b</sup> Números en paréntesis representan bandas débiles.



**Figura 1.** RFLP de ADN total digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* - *BglII* y confrontadas contra el ADN mt total de la cepa de referencia GK2016 digerido con la enzima *HpaII* como sonda. Líneas uno a 25 corresponden a los aislamientos: ARSEF 5640; ARSEF 5642; ARSEF 5643; ARSEF 5273; ARSEF 3286; USSR 2274; ARSEF 3622; DAOM 210569; DAOM 195005; GK 2016; ARSEF 32; ARSEF 3289; ARSEF 3113; ARSEF 959; ARSEF 3866; ARSEF 356; ARSEF 1512; ARSEF 4150; ATCC 44860; DAOM 144746; ARSEF 6376; ATCC 56519; ATCC 18981; ATCC 1360 y *M.a.* 549. El tamaño (en Kb) de fragmentos de ADN son indicados en la derecha. Las abreviaciones arriba son: *Bb*: *B. bassiana*; *Ba*: *B. amorpha*; *Bc*: *B. cylindrospora*; *Bn*: *B. nivea*; *B.spp*: *Beauveria* spp; *Pf*: *P. farinosus* y *Ma*: *M. anisopliae*.

digerido con la enzima *HpaII* y marcado con digocigenina. En este caso, nueve patrones de hibridización diferentes fueron obtenidos con las 18 cepas de *B. bassiana* o diez patrones cuando los 20 aislamientos, incluyendo los dos aislamientos de *Beauveria* spp., son considerados. Si este es el caso, cuatro aislamientos fueron agrupados como mito-tipo I, seis como II, dos como mito-tipos III y VI y los otros seis (IV, V, VII-X) fueron mito-tipos representados por una sola cepa (Tabla 2). Una característica muy importante en este caso fue la identificación de secuencias variables y conservadas dentro de el ADN mt de *B. bassiana*. Por ejemplo, todas las cepas de *B. bassiana*, *Beauveria* spp., *B. nivea* y *P. farinosus* presentaron la banda de 1Kb. Adicionalmente, una cepa de *B. bassiana* (ARSEF 959) no mostró las bandas de 1,3 y 1,8 Kb y dos cepas (ARSEF 4150 y DAOM 144746) no mostraron la banda de 1,2 Kb. Estos resultados sugieren que las regiones que contienen estos sitios de restricción particulares son altamente conservados en el genoma mitocondrial de *B. bassiana*.

**Polimorfismos mitocondriales de *B. bassiana* y su relación con otros hongos filamentosos.** En los hongos entomopatógenos se han hecho algunos esfuerzos para obtener secuencias completas de ADN mt. De hecho en *B. bassiana* alrededor del 60% del genoma ha sido secuenciado (Pfeifer *et al.* 1993; Hegedus *et al.* 1991) y para *L. muscarium* la secuencia completa del genoma ha sido reportada (Kouvelis *et al.* 2004). Sin embargo, la única secuencia del ADN mt disponible para otros HE diferentes a estos dos es la equivalente al gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (srRNA). Es bien sabido que esta secuencia ofrece ventajas muy particulares como herramienta para el análisis filogenético a nivel de especie y grupos taxonómicos



**Figura 2.** Árbol filogenético basado en la secuencia parcial del gene 16s srARN de diferentes hongos filamentosos. Un total de 743 nucleótidos no ambiguamente alineados fueron sujetos al análisis de "neighbourhood-joining" usando el programa CLUSTAL W. Los valores del "bootstrapp" para 100 pasos de re-evaluación son mostrados en los nodos. Las secuencias provienen de la base de datos del "Gene Bank" del NCBI de los Estados Unidos con los siguientes números de accesiones: *A. nidulans* (V00653.1), *P. anserina* (X55026.1), *N. crassa* (Z34001.1), *B. bassiana* (S55623.1;S55619S5), *B. brongniartii* (AB027359), *P. tenuipes* (AB027358.1), *L. muscarium* (*L. muscarium*) (AF487277.1), *C. militaris* (AB027357.1), *C. paradoxa* (AB027345.1), *M. anisopliae* (AB027361), *H. lutea* (AB027362.1), *H. jecorina* (AF447590), *H. chrysospermus* (AB027363.1).

superiores (Burns *et al.* 1991). Teniendo en cuenta esta información, se realizó un análisis filogenético (Fig. 2), incluyendo diferentes HE pertenecientes al grupo de hongos deuteromicetes (*B. bassiana*, *B. brongniartii* (Petch), *L. muscarium*, *Paecilomyces tenuipes* (Samson) y *M. anisopliae*) y ascomicetos (*Cordyceps militaris* (LinK) y *C. paradoxa* (Kobayasi)). Otros ascomicetos fueron considerados incluyendo los hongos mico parásitos *Hypocrea lutea* (Tode - Petch), *H. jecorina* (Syn. *Trichoderma reesei*) y *Hypomyces chrysospermus* (Tulasne). Las secuencias de *Neurospora crassa* (Shear & Dodge), *Podospora anserina* (Ces - Rehm) y *Aspergillus nidulans* (Tieghem) fueron también incluidas como punto de referencia. Todos los HE, con la excepción de *C. paradoxa* y *M. anisopliae* hacen parte de un clado monofilético. Vale la pena anotar la alta significancia estadística de estos resultados según los valores de "bootstrap" en los nodos del árbol filogenético. Interesantemente, las dos especies de *Cordyceps* se ubicaron en grupos separados, e inclusive más estrechamente relacionadas con otros grupos anamórficos que con ellas mismas. Este resultado sugiere no únicamente un alto grado de variabilidad genética en el género *Cordyceps*, sino también el grado de similitud entre algunas especies de este género con algunas especies de hongos entomopatógenos deuteromicetes. Este hecho soporta estudios previos que reclaman el hecho de que algunas especies de HE conidiogénicos como *Metarrhizium taii*, *P. tenuipes*, y *B. bassiana* son la fase anamorfa de especies de hongos ascomicetos del genero *Cordyceps* (Zong-Qui *et al.* 1991; Huang *et al.* 2002).

## Discusión

Debido a las características del ADN mt, éste ha sido usado en la tipificación de cepas y análisis de poblaciones de HE con diferentes niveles de éxito. Por ejemplo Bidochka *et al.* (2001) no encontraron diferencias en el análisis por RFLP de ADN mt total entre 83 aislamientos de *M. anisopliae* obtenidos de suelos agrícolas y forestales de la provincia de Ontario (Canadá). Por otra parte, Mavridou y Typas (1998) reportaron 16 patrones diferentes de ADN mt al analizar 25 aislamientos de *M. anisopliae* obtenidos de 15 países cuando el ADN mt total se usó como sonda. Estos resultados demuestran que para este tipo de análisis no es importante únicamente tener en cuenta las herramientas moleculares a utilizar, sino que el tamaño y la naturaleza de la población es también importante. Hegedus y Khachatourians (1993) analizaron el genoma mitocondrial de 15 aislamientos de *B. bassiana* usando diferentes porciones del genoma mitocondrial como sondas. Los resultados de dicho trabajo sugirieron un genoma altamente conservado con únicamente dos mito-tipos. Nosotros en este estudio usamos una población más variada de aislamientos en términos del origen geográfico. Así mismo se emplearon dos tipos de sondas, una porción de 4,6 kb del genoma mitocondrial reconocido anteriormente como relativamente polimórfica para la especie (Hegedus y Khachatourians 1993) y el ADN mt total. La aproximación presentada aquí demostró la presencia de un genoma mitocondrial altamente polimórfico con nueve mito-tipos dentro de las 18 cepas de *B. bassiana* analizadas.

El mapa de restricción de *B. bassiana* descrito por Pfeifer *et al.* (1993), es una herramienta adecuada para identificar la localización física no únicamente de las regiones variables sino también de las regiones conservadas dentro del ADN mt de *B. bassiana*. Por ejemplo, las bandas altamente conservadas de 1,0 y 1,3 Kb producidas después de digerir el ADN mt con *Bgl* II, están localizadas en el fragmento denominado XS1 en el genoma mitocondrial de la cepa GK2016 de *B. bassiana* (Pfeifer *et al.* 1993). Este fragmento contiene el fragmento 5' de los genes de la subunidad larga del ARN ribosomal (LrARN); sin embargo, el análisis de restricción de la secuencia de dicho fragmento indica que los tres cortes de la enzima *Bgl* II caen fuera del gen. La alta frecuencia de estas bandas en las cepas de *B. bassiana* sugieren que los sitios de restricción con *Bgl* II pertenecen a una sección muy conservada presente en este fragmento. Además, la banda de 1,8 Kb, que corresponde al fragmento E3B en el ADN mt de la cepa GK2016, es producido por dos cortes de la enzima *EcoR* I. Esta banda contiene la región correspondiente al extremo 3' de la subunidad 6 de la ATPasa y el extremo 5' del gen srARN (Pfeifer *et al.* 1993). Un análisis de alineamiento de secuencias de ADN de diferentes hongos filamentosos usando el programa BLAST 2.2.5 (Altschul *et al.* 1997) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de los Estados Unidos, mostró que las secuencias de ambos genes son altamente conservadas en este grupo de organismos. Sin embargo, los sitios de restricción de la enzima *EcoR* I al interior de estos dos genes son aparentemente específicos para el grupo filogenético que incluye las especies de *Beauveria* y otros HE relacionados sugiriendo la presencia de una marca molecular para este grupo de hongos (resultados no mostrados).

A pesar de la naturaleza altamente conservada de los genes de la subunidad 6 de la ATPasa y el srARN, nuestra evaluación del genoma mitocondrial total de *B. bassiana* mostró que hay alguna variabilidad a nivel de cepa dentro de la especie, que

permite el reconocimiento de diferentes patrones de RFLP con el ADN mt total como sonda. Usando esta estrategia, diez mito-tipos de las 20 cepas de *B. bassiana* analizadas (incluyendo las dos *Beauveria* spp.), fueron identificadas y separadas de las otras cinco especies de hongos entomopatógenos incluidas en este estudio. Nosotros especulamos que la fuente de esta variabilidad es probablemente las secuencias intergénicas, ya que secuencias no codificantes tipo intrones no están dentro de las secuencias reportadas de los pequeños genomas mitocondriales de HE (Grossman y Hudspeth 1985; Khachatourians y Uribe 2004; Pfeifer *et al.* 1993; Kouvelis *et al.* 2004). La alta variabilidad geonómica mitocondria encontrada en este estudio en *B. bassiana* y en *M. anisopliae* (Mavridou y Typas 1998) y en *L. muscarium* (Kouvelis *et al.* 1999), indican que los genomas mitocondriales están expuestos a mecanismos ambientales de variación de secuencias en la naturaleza (i.e. radiación UV) que puede producir eventos mutacionales aislados ya que no existe ninguna indicación de intercambios de genomas mitocondriales entre estos hongos (Kawano *et al.* 1995; Viaud *et al.* 1998). Adicionalmente errores en la replicación, eventos de recombinación intermolecular y la presencia de un sistema de reparación de ADN mt muy simple, en el cual inclusive dímeros de pirimidina no son reparados (Kang y Hamasaki 2002), deben ser algunas de las razones para perpetuar tal variabilidad dentro de los genomas mitocondriales de hongos filamentosos.

Estudios filogenéticos en hongos filamentosos no entomopatógenos han permitido establecer correlaciones entre patrones de ADN mt y características que no están asociadas con las funciones mitocondriales (Gordon y Okasoto 1992; Egger *et al.* 1991; Jeng *et al.* 1991). Sin embargo, en HE parece ser que este no es el caso. Diferentes estudios empleando el genoma mitocondrial han conducido a la conclusión que no existe correlación al menos entre especificidad, origen geográfico, hábitat y polimorfismos de ADN mt (Hegedus y Khachatourians 1993; Mavridou y Typas 1998; Kouvelis *et al.* 1999; Bidochka *et al.* 2001). Nuestros datos confirman y extienden esta conclusión. Inclusive partiendo del modesto número de cepas de este estudio, nosotros encontramos dos mito-tipos principales (I y II) en *B. bassiana*. Las cepas del mito-tipo I fueron colectadas de regiones tan separadas entre sí como Rusia, Francia y Canadá; mientras aquellas pertenecientes al mito-tipo II pertenecen a regiones de Canadá, Etiopía y USA. Esto sugiere que la distribución geográfica no es un determinante primario para la selección de estos genotipos mitocondriales. En relación con los hospederos, dos grupos principales son identificables, las cepas aisladas originalmente de lepidópteros y ortópteros. Es importante mencionar que el análisis filogenético en este caso muestra unos agrupamientos interesantes tales como mito-tipos III, V y IX, conformados por cepas aisladas únicamente de ortópteros. Mito-tipo I y VI están igualmente asociados y sus cepas fueron originalmente aisladas de lepidópteros o provienen de hospederos desconocidos. Sin embargo, el mito-tipo II que posee cepas aisladas de ortópteros y coleópteros está agrupado con los mito-tipos IV y X, los cuales poseen cepas colectadas del suelo y lepidópteros respectivamente. Todos estos resultados sugieren que no existe realmente una relación entre genotipos mitocondriales y origen geográfico u hospederos. La distribución mundial de los mitotipos I y II en *B. bassiana* deben sugerir una reproducción clonal y una dispersión exitosa de estas esporas independientemente de que el crecimiento natural de esta especie en la naturaleza sea primordialmente

entomopatogénica o saprofítica (St. Leger *et al.* 1992; Bidochka *et al.* 2002). Lo que es claro es que hay una gran variabilidad dentro del genoma mitocondrial de esta especie, la cual está representada en este estudio por los nuevos siete mito-tipos aquí descritos. Sería muy interesante entender los eventos naturales que conducen a tal variabilidad bien sean dados por recombinación intra-molecular o mutaciones puntuales.

El análisis de agrupamientos del bandeo del ADN mt después de ser cortado con *EcoR* I y *Bgl* II y confrontado con el ADN mt total como sonda (Fig. 1, Tabla 2) mostró que *B. amorpha*, *B. nivea* e incluso *P. farinosus*, no fueron claramente resueltos de la diversidad del genoma mitocondrial de *B. bassiana*. Este resultado puede ser interpretado como que estas son especies altamente relacionadas compartiendo un genoma mitocondrial ancestral o que *B. amorpha* y *B. nivea* están relacionadas con *B. bassiana* como sub-especies. Vale la pena mencionar que esta similitud no es del todo sorprendente ya que todos los HE discutidos aquí son miembros de la familia Clavicipitacea. Más análisis a nivel del genoma nuclear y mitocondrial son necesarios para soportar una u otra hipótesis.

La metodología presentada aquí mostró un mayor grado de variabilidad en el genoma mitocondrial de *B. bassiana* que la variabilidad antes reportada, indicando además que deben existir aun más mito-tipos en la naturaleza que no han sido descritos todavía. El poder de discriminación de la técnica de RFLP mitocondrial (10 mito-tipos luego del análisis de 20 cepas) fue más grande que las técnicas previamente reportadas para analizar el polimorfismo genómico de *B. bassiana*. Por ejemplo el análisis usando ITS PCR-RFLP, mostró 24 haplotipos de 96 aislamientos de *B. bassiana* analizados (Coates *et al.* 2001) y seis haplotipos de 95 cepas (Gaitán *et al.* 2002). Por otra parte la utilización de marcadores iso-enzimáticos presentaron 39 haplo-tipos luego de analizar 138 cepas de *B. bassiana* (St. Leger *et al.* 1992) y 11 haplo-tipos dentro de 45 aislamientos analizados (Poprawski *et al.* 1988). Grupos de compatibilidad vegetativa (Couteaudier y Viaud 1997) y el análisis con RAPDS (Gaitán *et al.* 2002), han sido empleadas también como técnicas de alta resolución para identificar polimorfismos en *B. bassiana*. Catorce grupos obtenidos del análisis de 25 cepas de *B. bassiana* fueron reportados por Couteaudier y Viaud (1997). Mientras que Gaitán *et al.* (2002) reportaron que no encontraron ninguna cepa con un patrón similar al ser analizadas con cinco iniciadores dentro del protocolo de RAPDS. Sin embargo, la necesidad de aislar mutantes auxotróficos para el análisis de los grupos de compatibilidad vegetativa hace de éste un procedimiento muy largo y tecnológicamente inadecuado para ser empleado a nivel industrial. Similarmente, la falta de reproducibilidad inherente al procedimiento de RAPDS (Dietrich *et al.* 1999) hace esta técnica no viable para la identificación y protección de cepas de interés comercial para la industria. Finalmente, vale la pena mencionar que la utilización de marcadores de polimorfismo empleando secuencias teloméricas parece tener un gran potencial para la tipificación de *B. bassiana* como bien lo demostraron Viaud *et al.* (1996) y Padmavathi *et al.* (2003) al obtener nueve y 16 haplo-tipos luego del análisis de nueve y 17 cepas de *B. bassiana* respectivamente.

Vale la pena mencionar que la utilización de técnicas diseñadas para la determinación de los patrones polimórficos que pueda presentar una especie tan importante en el control biológico de plagas como es *Beauveria bassiana*, es muy importante en el contexto de la entomología aplicada, por dos razones fundamentalmente: En primer lugar este tipo de

técnicas nos permiten proteger una cepa particular que tenga un interés comercial, ya que se podría determinar la huella molecular única de cada cepa permitiendo su identificación y posterior protección. Por otra parte, la creciente inquietud de las agencias reguladoras de los registros para la venta y comercialización de productos comerciales, basados en agentes de control biológico en general y hongos entomopatógenos en particular, hace cada vez más necesarios los estudios relacionados con efectos adversos de estos agentes en el ecosistema. Dichos estudios necesitan metodologías que nos permitan rastrear las cepas que estamos empleando en campo para poder monitorear tales efectos, lo cual es posible realizar mediante la identificación de patrones polimórficos específicos para cada cepa evaluada. La determinación de patrones únicos, nos permitirá confirmar la permanencia de una cepa en campo por un periodo de tiempo específico, o el aislamiento o no de una cepa de hongo entomopatógeno de interés de hospederos no blanco, solo por citar un par de ejemplos.

Diferencias en el ADN mt entre especie de *Metarhizium* y otras especies de HE fueron previamente mencionadas en el trabajo de Hegedus y Khachatourians (1993), al indicar que sondas de ADN mt de *B. bassiana* hibridizaron fácilmente con aislamientos de *Beauveria*, *Lecanicillium* y *Paecylomyces* pero no con *Metarhizium*. El análisis filogenético entre diferentes hongos filamentosos empleando la secuencia del gen mitocondrial 16s srARN agrupó a *M. anisopliae* y *C. paradoxa* con algunos hongos micoparásitos (Fig. 2). Es de esperar que especies de hongos compartiendo la estrategia de entomopatogenicidad dentro de su ciclo de vida estén más estrechamente relacionadas entre si que con hongos micoparásitos. Dado que este estudio mostró que éste no es el caso, nos atrevemos a sugerir que la estrategia de parasitismo de insectos proviene de por lo menos dos raíces ancestrales en hongos filamentosos. Sin embargo, un análisis incluyendo un rango más amplio de grupos taxonómicos y genes de origen nuclear debe ser llevado a cabo, con el objeto de obtener una conclusión más robusta en este sentido.

## Conclusiones

Contrario a reportes previos (Hegedus y Khachatourians 1993), este estudio demostró que el ADN mt de *B. bassiana* es altamente variable. Por lo tanto, esta nueva valoración de la variabilidad del genoma mitocondrial de *B. bassiana* nos permite concluir que la metodología presentada aquí posee una alta capacidad de resolución para llevar a cabo una tipificación genómica en *Beauveria*. Su utilización en conjunción con aproximaciones similares desde el punto de vista tecnológico (e. g. marcadores teloméricos) deben servir para diferenciar entre la mayoría sino entre todas las cepas de las diferentes especies del genero *Beauveria*. Dicho sistema debe ser del interés de productores comerciales para proteger derechos de propiedad de cepas de importancia comercial. Adicionalmente, el alto nivel de polimorfismo detectado en cepas de *B. bassiana* también sugiere que la mito-tipificación, en conjunto con el análisis de secuencias como el gen 16s srARN es una herramienta adecuada al momento de elucidar relaciones evolutivas dentro de los hongos entomopatógenos.

## Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento a la Facultad de Estudiantes Graduados así como al programa de becas del

Research and Agricultural Biotechnology Initiative de la Universidad de Saskatchewan por el apoyo financiero ofrecido a Daniel Uribe. Así mismo queremos agradecer muy especialmente al Dr. Richard H. Humber (Colección de Hongos Entomopatógenos de la USDA) por proporcionar todas las cepas ARSEF usadas en este estudio con la excepción de la cepa ARSEF 3113 que fue muy amablemente proporcionada por Dr. Leslie C. Lewis.

### Literatura Citada

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- BIDOCHKA, M. J.; MENZIES, F. V.; KAMP, A. M. 2002. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Archives in Microbiology* 178: 531-537.
- BIDOCHKA, M. J.; KAMP, A. M.; LAVENDER, T. M.; DEKONING, J.; CROOS, J. N. A. DE. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1335-1342.
- BURNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- COATES, B. S.; HELLMICH, R. L.; LEWIS, L. C. 2001. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer *PCR-RFLP*. *Mycological Research* 105: 40-50.
- COUTEAUDIER, Y.; VIAUD, M. 1997. New insights into population structure of *Beauveria bassiana* with regard to vegetative compatibility groups and telomeric restriction fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 175-182.
- CUMMINGS, D. J.; MCNALLY, K. L.; DOMENICO, J. M.; MATSUURA, E. T. 1990. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospira anserina*. *Current Genetics* 17: 375-402.
- DIETRICH, W. F.; WEBER, J. L.; NICKERSON, D. A.; KWOK, P. Y. 1999. Identification and analysis of DNA polymorphisms, pp. 135-154. En: Birren, B.; Green, E.C.; Hieter, P.; Klapholz, S.; Myers, R. M.; Rietman, H.; Roskams, J. (eds.). *Genome analysis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. 494 p.
- EGGER, K. N.; DANIELSON, R. M.; FORTIN, J. A. 1991. Taxonomy and population structure of E-strain mycorrhizal fungi inferred from ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms. *Mycological Research* 95: 866-872.
- FELSENSTEIN, J. 1989. PHYLIP- Phylogeny Interference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- FENG, M. G.; POPRAWSKI, T. J.; KHACHATOURIANS, G. G. 1994. Production formulation application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control worldwide. *Biocontrol Sciences and Technology* 4: 3-34.
- GAITÁN, A.; VALDERRAMA, A. M.; SALDARRIAGA, G.; VÉLEZ, P.; BUSTILLO, A. 2002. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. *Mycological Research* 106: 1307-1314.
- GROSSMAN, L. I.; HUDSPETH, M. E. S. 1985. Fungal mitochondrial plasmids, pp. 65-103. En: Bennett, J. W.; Lasure, L. L. (eds.). *Gene Manipulations in Fungi*. Academic Press, New York.
- GORDON, T. R.; OKASOTO, D. 1992. Variation in mitochondrial DNA among vegetatively compatible isolates of *Fusarium oxysporum*. *Experimental Mycology* 16: 245-250.
- HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. 1993. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Metarhizium*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4283-4288.
- HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. 1996. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 289-299.
- HEGEDUS, D. D.; PFEIFER, T. A.; MACPHERSON, J. M.; KHACHATOURIANS, G. G. 1991. Cloning and analysis of five mitochondrial tRNA-encoding genes from the fungus *Beauveria bassiana*. *Gene* 109: 149-154.
- HEGEDUS, D. D.; T. A. PFEIFER; D. S. MULYK; G. G. KHACHATOURIANS. 1998. Characterization and structure of the mitochondrial srRNA gene of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Genome* 41: 471-476.
- HIGGINGS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J. D.; HIGGINGS, D. G.; GIBSON, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22: 4673-4680.
- HILLIS, D. M.; MABLE, B. K.; LARSON, A.; DAVIS, S. K.; ZIMMER, E. A. 1996. *Nucleic acids IV: Sequencing and cloning*, pp. 321-381. En: Hillis D. M; Moritz, C.; Mable, B. K. (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Massachusetts, USA.
- HUANG, B.; LI, CH.; LI, Z.; FAN, M.; LI, Z. 2002. Molecular identification of the teleomorph of *Beauveria bassiana*. *Mycotaxon* 71: 229-236.
- INGLIS, D. G.; GOETTEL, S. M.; BUTT, M. T.; STRASSER, H. 2001. Use of hypomycetous fungi for managing insect pests, pp. 23-69. En: Butt, T. M.; Jackson, C.; Magan N. (eds.). *Fungi as biocontrol agents*. CAB International. Wallingford.
- JENG, R. S.; DUCHESNE, L. C.; SABOURIN, M.; HUBBES, M. 1991. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms of aggressive and non/aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*. *Mycological Research* 95: 537-542.
- KANG, H.; HAMASAKI, D. 2002. Maintenance of mitochondrial integrity, repair and degradation. *Current Genetics* 41: 311-322.
- KAWANO, S.; TAKANO, H.; KUROIWA, T. 1995. Sexuality of mitochondria: fusion, recombination, and plasmids. *International Review of Cytology* 161: 49-110.
- KHACHATOURIANS, G. G.; URIBE, D. 2004. Genomics of entomopathogenic fungi, pp. 353-377. En: Arora, D. K.; Khachatourians, G. G. (eds.). Elsevier Science. London. *Applied Mycology and Biotechnology* Vol 4. 434 p.
- KHACHATOURIANS, G. G.; VALENCIA, E.; MIRANPURI, G. S. 2002. *Beauveria bassiana* and other entomopathogenic fungi in the management of insect pests, pp. 239-275. En: Koul, O.; Dhaliwal, G.S. (eds.). *Microbial Biopesticides*. Vol. 2. Reading, United Kingdom: Harwood Academic Publishers.
- KOSIR, J. M.; MACPHERSON, J. M.; KHACHATOURIANS, G. G. 1991. Genomic analysis of virulent and less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms. *Canadian Journal of Microbiology* 37: 534-541.
- KOUVELIS, V. N.; GHIKAS D. V.; TYPAS, M. A. 2004. The analysis of the complete mitochondrial genome of *Lecanicillium muscarium* (synonym *Verticillium lecanii*) suggests a minimum common gene organization in mtDNAs of Sordariomycetes: phylogenetic implications. *Fungal Genetics and Biology* 41: 930-940.
- KOUVELIS, V. N.; ZARE, R.; BRIDGE, P. D.; TYPAS, M. A. 1999. Differentiation of mitochondrial subgroups in the *Verticillium lecanii* species complex. *Letters in Applied Microbiology* 28: 263-268.
- MAURER, P.; COUTEAUDIER, Y.; GIRARD, P. A.; BRIDGE, P. D.; RIBA, G. 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research* 101: 159-164.

- MAVRIDOU, A.; TYPAS, M. A. 1998. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. *Mycological Research* 102: 1233-1241.
- PADMAVATHI, J.; UMA DEVI, K.; RAO, U. M.; REDDY, N. N. R. 2003. Telomere fingerprinting for assessing chromosome number, isolate typing and recombination in the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Mycological Research* 107: 572-580.
- PFEIFER, T. A.; KHACHATOURIANS, G. G. 1989. Isolation and characterization of DNA from the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Experimental Mycology* 13: 392-402.
- PFEIFER, T. A.; HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. 1993. The mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Analysis of the ribosomal RNA region. *Canadian Journal of Microbiology* 39: 25-31.
- POPRAWSKI, T. J.; RIBA, G.; JONES, W. A.; AIOUN, A. 1988. Variation in isosterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from Sitona weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology* 17: 275-279.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL D. W. 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- ST. LEGER, R. J.; ALLEE, L. L.; MAY, B.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. 1992. World wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycological Research* 96: 1007-1015.
- TAYLOR, J. W. 1986. Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. *Experimental Mycology* 10: 259-269.
- VIAUD, M.; COUTEAUDIER, Y.; RIBA, G. 1998. Molecular analysis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 88-93.
- VIAUD, M.; COUTEAUDIER, Y.; LEVIS, C.; RIBA, G. 1996. Genomic organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint. *Fungal Genetics and Biology* 20: 175-183.
- WANG, C-S.; SHAH, F. A.; PATEL, N.; LI, Z-Z.; BUTT, T. M. 2003. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology* 5: 908-915.
- ZONG-QUI, L.; AI-YING, L.; JIE-LING, L. 1991. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta Mycologica Sinica* 10: 257-262.

Recibido: 20-nov-2006 • Aceptado: 23-ago-2007

## Perfiles proteicos de estados de desarrollo de *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae)

Protein profiles of *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) development stages

AMANDA HUERTA F.<sup>1\*</sup>, ITALO CHIFFELLE G.<sup>2</sup>, MARYI SERRANO G.<sup>1</sup>, TATIANA VÁSQUEZ T.<sup>1</sup>

**Resumen:** En 1998 se detectó en Chile al gorgojo del eucalipto, *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal, 1833) (Coleoptera: Curculionidae), uno de los principales defoliadores del género *Eucalyptus*, que causa pérdidas de crecimiento y económicas. Esto ha generado preocupación pues hay más de 525.000 ha plantadas con especies de eucaliptos. Con el objetivo de conocer la respuesta de las proteínas de estados de desarrollo de *G. scutellatus* a las tres especies de eucaliptos más importantes en el país, se obtuvieron y caracterizaron perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes, y se buscaron proteínas marcadoras por densitometría de geles. Las proteínas se hicieron más numerosas a medida que los insectos se desarrollan. Las bandas de proteínas se concentraron entre los 20 y 120 kDa, con excepción de los huevos, los que presentaron valores menores. La aparición de distintas bandas de proteínas en los extractos de larvas y adultos de *G. scutellatus* alimentados con distintas especies de eucaliptos reflejó también cambios en su metabolismo. Estos antecedentes son útiles para el manejo integrado de plagas debido a que la identificación de proteínas marcadoras posiblemente está asociada a patrones metabólicos relacionados con el consumo de las plantas hospederas. Los cambios en la dieta del insecto podrían incidir en las proteínas marcadoras, indicando una habilidad diferencial de *G. scutellatus* para usar las plantas hospederas.

**Palabras clave:** Gorgojo del eucalipto. *Eucalyptus*. Electroforesis.

**Abstract:** In 1998 the eucalyptus weevil, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae), a major defoliator of the genus *Eucalyptus*, which causes growth and economic losses, was detected in Chile. This has caused concern because more than 525,000 ha are planted with species of eucalypt. To understand the protein responses of development stages of *G. scutellatus* fed on the three species of eucalypt trees most important in the country, electrophoretic profiles were obtained and characterized on polyacrylamide gels under denaturizing conditions, and marker proteins were sought through gel densitometry. Proteins became more numerous with insect development. Protein bands were concentrated between 20 and 120 kDa, with the exception of eggs, which presented lower values. The appearance of distinct bands of proteins in the extracts from larvae and adults of *G. scutellatus* fed on different species of eucalypts reflected changes in their metabolism. These results are useful for integrated pest management, as the identification of marker proteins is possibly associated with metabolic patterns related to the consumption of host plants. Changes in insect diet may affect the marker proteins, indicating a differential ability of *G. scutellatus* to use host plants.

**Key words:** Eucalypt weevil. Eucalypt snout beetle. *Eucalyptus*. Electrophoresis.

### Introducción

El gorgojo del eucalipto, *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal, 1833) (Coleoptera: Curculionidae), es un insecto australiano específico del género *Eucalyptus* (Withers 2001) y uno de los principales agentes de daño para estas especies. Se ha distribuido prácticamente por todos los continentes y se ha constituido en una plaga en la mayoría de las plantaciones de eucaliptos de África, Europa (Mansilla 1992; Rabasse y Perrin 1979; Richardson y Meakins 1986; Cordero *et al.* 1999), California (Cowles y Downer 1995; Hanks *et al.* 2000) y Nueva Zelanda (Cadaña 1980). En Sudamérica, se ha detectado en Argentina, Brasil, Uruguay y Chile (Rosado 1993; Beéche 1999; Zanuncio *et al.* 1998).

Tanto las larvas como los adultos de *G. scutellatus* se alimentan del follaje del eucalipto. El daño causado por este insecto es muy característico, dejando huellas en las hojas afectadas (Elliott y De Little 1984). Su población puede crecer mucho en pocos años, si abundan árboles hospedantes, existe

un clima templado y no hay enemigos naturales (Tooke 1953). El alto potencial reproductivo del insecto, junto con su intensa capacidad de defoliación puede causar pérdidas de crecimiento o deformaciones del fuste (Santolamazza y Cordero 1998). Incluso, defoliaciones continuas pueden causar la muerte de los árboles (Elliott y De Little 1984).

En Chile central, *G. scutellatus* se detectó por primera vez en 1998 en las regiones 5ª y Metropolitana (Beéche 1999), y podría afectar el futuro de las 525.057 ha plantadas en el país con eucaliptos (INFOR 2006). En la actualidad esta plaga se ha desplazado hacia el norte (4ª Región) como hacia el sur (regiones 7ª y 8ª) (SAG 2005).

*G. scutellatus* ha tenido una marcada preferencia por varias especies de *Eucalyptus* (Cordero y Santolamazza 2000). En Chile, la especie principal es *E. globulus* ssp. *globulus* (Labill., 1800). Otras especies plantadas de cierta importancia son *E. viminalis* (Labill., 1806) y *E. camaldulensis* (Den., 1832), en zonas áridas, y *E. nitens* ((Deane y Maiden) Maiden, 1913) en áreas más frías (INFOR 2006). En la zona de San Felipe, 5ª

<sup>1\*</sup> Correspondencia: Dra. Amanda Huerta, Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana. Casilla 9206. Santiago-Chile. [ahuerta@uchile.cl](mailto:ahuerta@uchile.cl), [ahuertaf@gmail.com](mailto:ahuertaf@gmail.com)

<sup>2</sup> Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana. Casilla 1004. Santiago-Chile. [ichiffel@uchile.cl](mailto:ichiffel@uchile.cl)

Región, *G. scutellatus* presenta entre tres y cuatro generaciones (Estay *et al.* 2002). Según Klein y Waterhouse (2000), su importancia como plaga de los eucaliptos es superada sólo por el taladrador del eucalipto, *Phoracantha semipunctata* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Cerambycidae).

Las características morfológicas y bioquímicas de las plantas pueden causar alteraciones en el metabolismo de los insectos, y traducirse en cambios en la composición de sus proteínas (Metcalf y Luckmann 1992), de forma que el conocimiento de estas variaciones es importante cuando se desean utilizar estrategias de tipo genético en el Manejo Integrado de Plagas (MIP), pues puede revelar compuestos químicos que sirvan como instrumento para alterar su comportamiento.

Los genes permanecen básicamente sin cambio de un año a otro, pero las proteínas de las células varían según su tipo, edad, género, sanidad, y otras. La proteómica engloba tres actividades principales, la identificación de todas las proteínas sintetizadas por una célula, tejido u organismo, la determinación del modo en que interactúan, y el trazado de sus estructuras tridimensionales precisas (Ezzell 2002). Los resultados de las electroforesis de proteínas son caracteres fenotípicos que reflejan mucho mejor las diferencias genéticas entre especies o poblaciones que cuando se estudian los caracteres morfológicos. Por ello, la electroforesis en gel ha llegado a ser la herramienta más valiosa para los estudios taxonómicos, sistemáticos y evolutivos (Navas *et al.* 2002).

Esta investigación se desarrolló con el objetivo de abordar desde el punto de las proteínas la reacción de *G. scutellatus* frente a la alimentación con distintas especies de eucaliptos, mediante una caracterización de perfiles electroforéticos del insecto y la búsqueda posterior de proteínas marcadoras (PM) por densitometría de los geles, para indagar PM asociadas posiblemente a cambios fisiológicos del insecto, aportando con ello hacia su caracterización en el plano molecular y por ende hacia programas de MIP.

### Materiales y Métodos

El material biológico se recolectó en árboles juveniles de *E. globulus* fuertemente infestados por *G. scutellatus* en el Sector El Tártaro, Comuna de Putaendo, Provincia de San Felipe (5ª Región de Chile) (32°32'30"S, 70°43'16"W). Las plantas se adquirieron en el Vivero Antumapu de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile, y se trasplantaron a macetas de plástico de 18 cm de diámetro con un substrato compuesto de arena, tierra de hoja y turba, tratado con fungicida Captan 2g/L y fertilizado con urea.

**Perfiles electroforéticos de *G. scutellatus* alimentados con *E. globulus*.** En una fase inicial de campo se recolectaron en forma periódica a fines de verano ejemplares adultos, pupas, larvas y huevos de *G. scutellatus*. Los insectos se mantuvieron en laboratorio, alimentando a las larvas y adultos con hojas frescas de *E. globulus*, previamente lavadas con hipoclorito de sodio al 15% (Cordero y Santolamazza 2000). Los huevos y las pupas se ubicaron en placas Petri; las larvas y los adultos se mantuvieron en cajas plásticas cerradas de 20 x 15 cm. Las crías se hicieron en el Laboratorio de Entomología Forestal del Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

Se tomaron tres muestras de dos insectos por estado de desarrollo (huevo, larva, pupa y adulto) y se homogenizaron a

4°C en buffer (TRIS-HCl 50mM pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS 0,07%) con un inhibidor de proteasa FMS 0,1 mM. Esta homogenización se hizo forzando los insectos a pasar por un espacio estrecho entre un émbolo de teflón y un recipiente de vidrio (Fleischer *et al.* 1979) y se centrifugaron 10 min a 1.250 G. Este material se refrigeró inmediatamente y se almacenó a -20°C. Luego estas muestras se maceraron y se extrajeron las proteínas y determinó su concentración mediante el método de Bradford (1976). Los extractos de proteínas se utilizaron para determinar los perfiles electroforéticos mediante gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), utilizando la técnica de Laemmli (1970) y el protocolo de Bollag *et al.* (1996).

**Perfiles electroforéticos de *G. scutellatus* alimentados con tres especies de eucalipto.** En una segunda fase se caracterizaron electroforéticamente los perfiles de proteínas asociadas a *G. scutellatus* alimentados con tres especies de eucaliptos de importancia económica en Chile y que presentan algún grado de susceptibilidad a la plaga; estos son: *E. globulus*, *E. robusta* (Sm., 1793) y *E. camaldulensis*.

Para caracterizar electroforéticamente los perfiles de proteínas de los insectos alimentados con cada una de las especies de eucalipto, se hizo un ensayo en una jaula (1,8 x 1,5 x 1,8 m) instalada bajo condiciones naturales de clima Mediterráneo e irrigación periódica, donde se ubicaron plantas de un año (cerca de 1 m de altura) de cada especie, las que se infestaron con dos larvas por planta (5-8 mm de longitud). Las plantas se protegieron con una bolsa de tul, para evitar su escape, con una abertura longitudinal con velcro para facilitar las evaluaciones. Las larvas permanecieron en cada una de las plantas hasta que pasaron a pupa; las larvas que murieron por manipulación se reemplazaron por otras que se encontraron en la misma fase de desarrollo.

Al finalizar el ensayo con larvas se desarrolló una segunda etapa, en la que se pusieron durante un mes dos insectos adultos en las mismas plantas utilizadas en la primera parte del ensayo, para su alimentación sobre las mismas; los adultos que murieron antes del fin del ensayo se reemplazaron por otros en la misma fase de desarrollo.

Transcurrido un mes se tomaron muestras de larvas alimentadas con las diversas especies de eucalipto para hacer el análisis electroforético de proteínas. De igual forma se tomaron muestras de los adultos. Los insectos se mantuvieron 24 h en placas Petri sin alimentarse para vaciar su tubo digestivo y se homogenizaron, refrigeraron y almacenaron con los mismos procedimientos señalados anteriormente. Se maceraron varios insectos en cada muestra, cada uno de ellos alimentado con la misma especie de eucalipto. El diseño experimental para estos análisis electroforéticos tuvo dos factores de efecto fijo, el primero fue el nivel de desarrollo del insecto (larva o adulto) y el segundo, la especie de eucalipto; se realizaron tres repeticiones para cada nivel de desarrollo del insecto en cada una de las especies de plantas. A las muestras de insectos adultos y larvas se les extrajeron las proteínas y determinó su concentración mediante los mismos protocolos ya mencionados.

Posteriormente, se analizaron los perfiles electroforéticos de proteínas de los insectos alimentados con las especies de eucalipto, en busca de PM mediante la determinación de su posición y los cambios en su concentración y localización. La búsqueda de dichas PM se hizo mediante densitometría de geles, usando el Software BioCaptMW (versión 11.01,

Microsoft, Redmond, EE.UU.) Para evaluar si existían diferencias significativas entre los resultados se hicieron pruebas de  $\chi^2$  y análisis de variación según diseño bifactorial. Además se hizo un análisis de similitud entre las PM de *G. scutellatus*, mediante el algoritmo de UPGMA (Sneath y Sokal 1973), usando el índice de similitud 1-Pearson r, basado en la presencia o ausencia de PM en las muestras. Se usó el programa Statistica (1993).

## Resultados y Discusión

**Perfiles electroforéticos de *G. scutellatus* alimentados con *E. globulus*.** La composición proteica de los estados de desarrollo de *G. scutellatus* asociados a *E. globulus* se presenta en la Figura 1. Se observa una gran cantidad de bandas de proteínas en la zona comprendida entre 20 a 120 kDa, con excepción de los huevos, los que presentaron un número bajo y de pequeña intensidad de proteínas. Las proteínas se hicieron más numerosas a medida que los insectos se desarrollan. La composición proteica de las pupas fue similar a la de las larvas, probablemente porque se trató de pupas recién formadas. Sin embargo, los perfiles de las larvas y adultos tuvieron grandes diferencias.

**Perfiles electroforéticos de *G. scutellatus* alimentados con tres especies de eucalipto.** Las larvas de *G. scutellatus* están compuestas por un número mayor de proteínas marcadoras que los adultos, independientemente de la alimentación recibida, lo que indica que la composición proteica de los insectos varía con su estado de desarrollo (Fig. 2). El mayor número de PM en las larvas puede estar relacionado con los cambios en el insecto debido a su metamorfosis; sin embargo, el número de proteínas de las larvas en *E. globulus* fue casi el mismo que el de los adultos, haciendo pensar que el aumento de las bandas en las larvas alimentadas con *E. robusta* y *E. camaldulensis* está más relacionado con la alimentación que recibieron los insectos que con su metamorfosis.

La composición proteica de las larvas alimentadas con *E. globulus* no difirió de la de los adultos alimentados con esta misma especie ( $\chi^2$  calculado = 0,24, g. l. = 1,  $P = 0,05$ ). Por otra parte, la composición proteica de las larvas difirió de la

de los adultos cuando los insectos se alimentaron con *E. robusta* y *E. camaldulensis* ( $\chi^2$  calculado = 6,72, g. l. = 1,  $P = 0,05$ ), dado el mayor número de proteínas exclusivas de las larvas frente al de los adultos (Figura 2). Esto parece indicar que las larvas de *G. scutellatus* son más susceptibles a los cambios en su alimentación, y modifican en mayor grado su composición proteica por este factor.

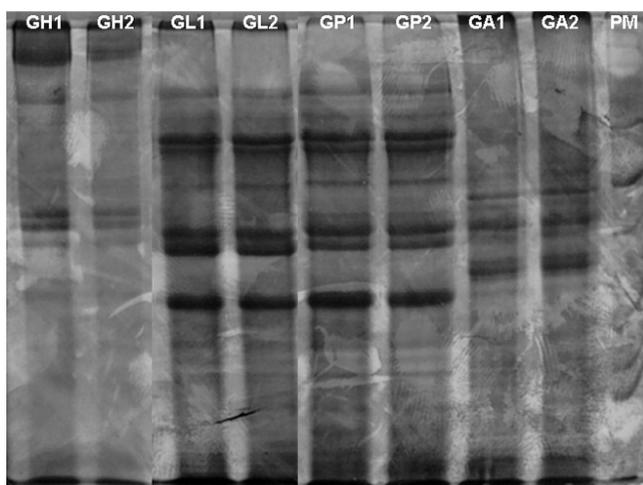
En la Figura 2 se presentan las bandas de las proteínas que tuvieron variaciones en función de la alimentación recibida, notándose que en los extractos de larvas hubo mayores cambios en proteínas que en los de adultos. Es importante resaltar que las bandas uno y dos se presentaron sólo en adultos y las bandas tres, cinco y seis sólo en larvas, independientemente de la alimentación, por lo que serían útiles tanto para identificar el estado de desarrollo de un insecto en función de su alimentación como para diseñar tácticas de tipo genético dentro del manejo integrado de plagas.

Como se mencionó, las larvas de *G. scutellatus* alimentadas con *E. robusta* y *E. camaldulensis* parecieron ser más susceptibles al cambio de alimentación que los adultos, ya que sólo en los extractos de larvas de estas dos especies se presentaron seis PM (proteínas siete, 21, 23, 29, 31 y 32) (Fig. 2), causando que la composición proteica de las larvas y adultos haya sido diferente. El análisis de conglomerados indicó que existen diferencias entre las PM de *G. scutellatus*. Las PM de las larvas alimentadas por *E. camaldulensis* y *E. robusta* son más cercanas y las más alejadas son las de *E. globulus*. Las PM de los adultos alimentados con las tres especies de eucalipto se agruparon en otro conglomerado (Fig. 3).

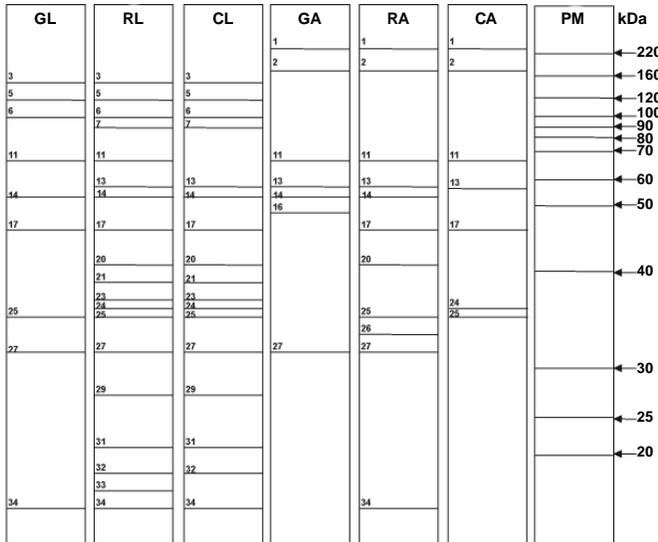
Por otra parte, según la cantidad de proteínas de las bandas se encontró que tanto el nivel de desarrollo del insecto (factor estado) como la alimentación recibida (factor especie) influyeron en el área de las PM ( $F = 8,599$ ; g. l. = 2;  $P < 0,05$ ). Las PM de las larvas presentaron un área mayor que las correspondientes a los adultos, lo que se debe a que las larvas tuvieron más cambios en su composición proteica. Respecto a las especies, las larvas alimentadas con *E. robusta* presentaron la mayor cantidad de proteínas, con una media diferente a la de las alimentadas con las otras dos especies de eucalipto bajo estudio; las diferencias de las larvas alimentadas con *E. robusta* se relacionan con la cantidad de proteínas que varió en las alimentadas sobre esta especie, especialmente en los extractos asociados a larvas. Hubo diferencias en las PM, en función tanto del estado de desarrollo (larva o adulto) como de la alimentación recibida por los insectos, y las mayores modificaciones ocurrieron producto de la alimentación con *E. robusta* ( $\chi^2$  calculado = 5,23, g. l. = 1,  $P = 0,05$ ;  $F = 8,0$ ; g. l. = 2;  $P < 0,05$ ).

Como se observa en la Figura 2, los adultos alimentados con *E. robusta* tuvieron los mayores cambios en composición proteica, mientras que los alimentados con *E. globulus* y *E. camaldulensis* presentaron una variabilidad mucho menor. De las proteínas que variaron, tres se presentaron sólo en *E. robusta* (proteínas 20, 26 y 34), una apareció solamente en *E. globulus* (16), y una fue exclusiva de *E. camaldulensis* (24); estas proteínas serían útiles en la identificación de adultos a nivel proteico, permitiendo discriminar qué tipo de alimentación han recibido. Las proteínas 26 y 33, exclusivas de *E. robusta*, podrían usarse para inferir los cambios en la composición química de las larvas y adultos de *G. scutellatus* causados por su alimentación sobre las plantas de esta especie.

La ausencia de las proteínas 14 (*E. camaldulensis*), 17 (*E. globulus*), 25 (*E. globulus*) y 27 (*E. camaldulensis*) en adultos



**Figura 1.** Extractos proteicos de los estados de desarrollo de *G. scutellatus* asociados a *E. globulus*. SDS-PAGE al 12,5%. GH = huevos, GL = larvas, GP = pupas y GA = adultos. Los números uno y dos son las repeticiones. PM = estándar de masa molar (kDa).



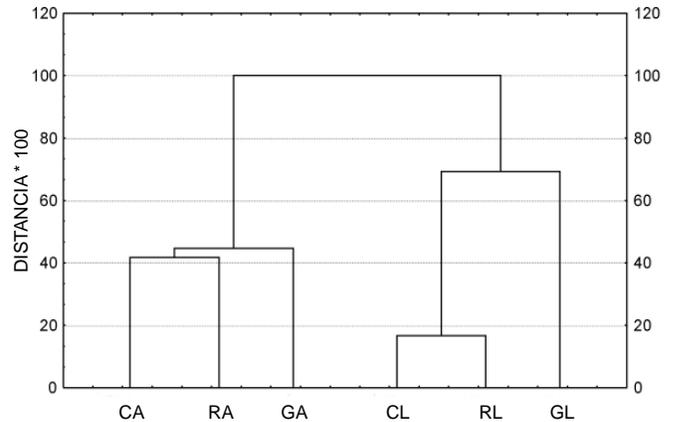
**Figura 2.** Representación idealizada de las proteínas marcadoras de acuerdo con el estado de desarrollo de *G. scutellatus* y la alimentación recibida. G = *E. globulus*, R = *E. robusta*, C = *E. camaldulensis*, L = larvas, A = adultos. PM = estándar de masa molar (kDa). Las líneas horizontales corresponden a bandas de proteínas, numeradas según su orden de aparición en el gel.

(Fig. 2) es también un indicador de los cambios bioquímicos del insecto a causa de su alimentación, y al igual que las proteínas que se presentan exclusivamente en un extracto, podrían usarse en su identificación.

La distribución proteica de los adultos en función de la alimentación recibida no fue diferente ( $\chi^2$  calculado = 5,23, g. l. = 2,  $P = 0,05$ ), lo que se debe a que el 37,5% de las proteínas difirió entre los extractos. Cuando la prueba se aplicó sólo a las PM, se encontraron diferencias entre los extractos ( $\chi^2$  calculado = 14,24, g. l. = 2,  $P = 0,05$ ), las que se relacionan con el número de proteínas que varió en los adultos alimentados con *E. robusta*, ya que los extractos provenientes de los insectos alimentados con las otras dos especies tuvieron la misma cantidad de PM.

Al observar la participación porcentual de las proteínas respecto al área relativa de los geles (Fig. 4), la proteína uno, proveniente de los extractos de larvas, presentó el área mayor (14,47%), seguida de las proteínas 23 (9,65%) y 30 (8,79%). Estas bandas se presentaron en todos los extractos, independientemente de la alimentación. Las bandas restantes tuvieron cantidades de proteínas inferiores a 5%. Otro hecho importante es que las PM de las larvas tuvieron áreas similares a las que no lo fueron, con porcentajes que oscilan desde 1,38% en la banda 11 hasta 4,19% en la 27. Esto indica que a pesar que no estuvieron presentes en todas las especies, la cantidad de proteínas en estas bandas no fue despreciable.

El área de las proteínas de las larvas difirió significativamente y la interacción entre las proteínas y las especies también fue significativa; sin embargo, no hubo diferencias en el área cuando el factor evaluado fue la especie objeto de alimento de las larvas ( $F = 12,53$ ; g. l. = 2;  $P < 0,05$ ). En los adultos, la banda 23 tuvo la mayor cantidad de proteínas (22,06%), seguida de la banda dos (8,74%), la 24 (7,24%) y la cuatro (7,15%). Respecto de las PM de los adultos, la que obtuvo el porcentaje mayor fue la banda 21 (5,73%). Las PM



**Figura 3.** Análisis de conglomerados de las proteínas marcadoras de *G. scutellatus* alimentados con las tres especies de eucaliptos, construido con el método UPGMA. G = *E. globulus*, R = *E. robusta*, C = *E. camaldulensis*, L = larvas, A = adultos.

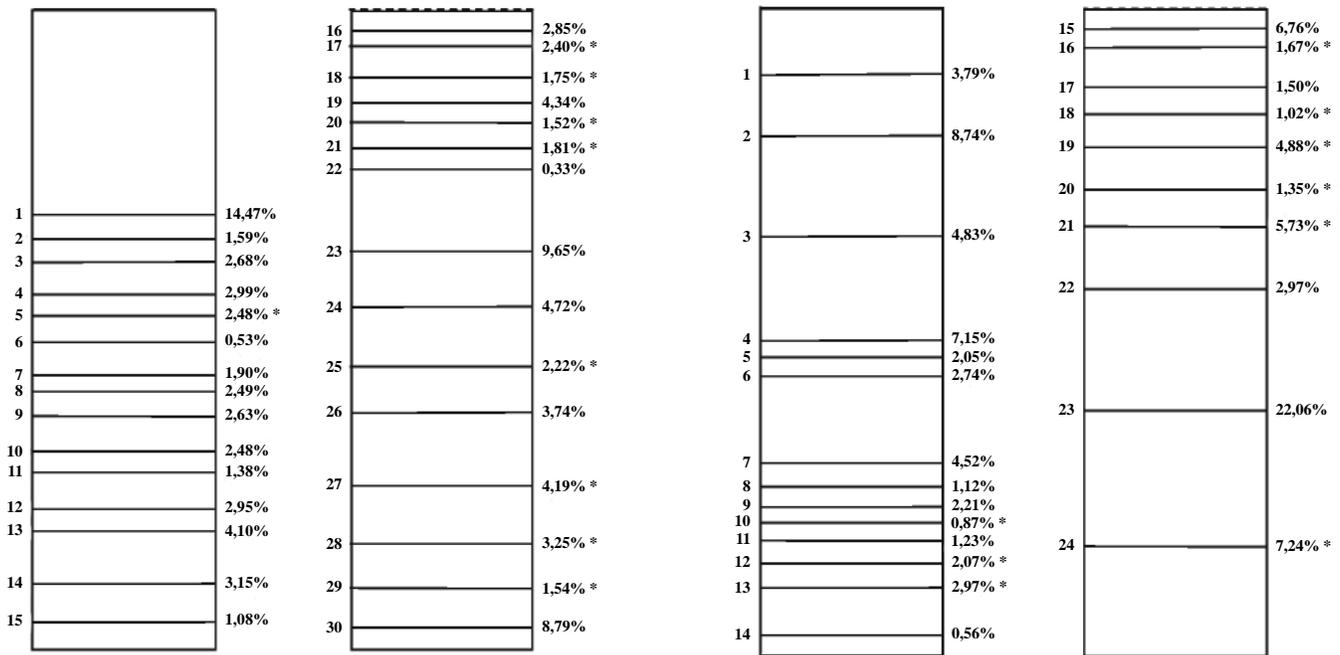
restantes tuvieron valores similares a las que no presentaron variaciones, lo que indica que su participación en los geles no fue despreciable.

Según el análisis de variación para los extractos de adultos hubo una diferencia significativa entre las proteínas ( $F = 28,35$ ; g. l. = 2;  $P < 0,05$ ), relacionada con su posición en el gel (masa molar), y una interacción entre las proteínas y las especies. Estos resultados son equivalentes a los obtenidos en los extractos proteicos de las larvas. Por otra parte, hubo diferencia en las PM de los adultos de *G. scutellatus* producto de su alimentación ( $F = 16,87$ ; g. l. = 2;  $P < 0,05$ ). Las diferencias en este factor se debieron a la mayor variación en la composición proteica de los adultos cuando se alimentaron con *E. robusta*, ya que las otras dos especies tuvieron el mismo número de PM.

La presencia o ausencia de bandas en los extractos proteicos de *G. scutellatus* puede deberse a la composición química de las hojas, lo que hace que el insecto reaccione ante la alimentación recibida (Dermott *et al.* 1996). En este sentido, la constitución de los aceites esenciales en las especies de *Eucalyptus* puede causar diferencias en la susceptibilidad al daño de un insecto en particular, las que pueden verse reflejadas en la composición química de los insectos (Floyd y Foley 2001). Kessler y Baldwin (2002) indican que la función de los metabolitos secundarios de las plantas es actuar específicamente contra la infestación de insectos, haciendo que se reduzca su daño. Por lo tanto, estos elementos podrían estar influyendo también en la composición proteica encontrada en los extractos.

## Conclusiones

Este estudio contribuye al Manejo Integrado de Plagas de este insecto, a través del conocimiento de la composición de las proteínas de *G. scutellatus* alimentados con diferentes especies de eucalipto, obteniendo proteínas marcadoras para las larvas y adultos. Estas proteínas están asociadas posiblemente con patrones metabólicos relacionados con el consumo de las plantas hospederas. Los cambios en la dieta del insecto podrían estar asociados con las proteínas marcadoras, indicando una habilidad diferente de *G. scutellatus* para poder usar las plantas hospederas.



**Figura 4.** Participación porcentual de las proteínas asociadas a larvas y adultos de *G. scutellatus* en función del área relativa, considerando las tres especies de eucaliptos estudiadas. Las líneas horizontales corresponden a bandas de proteínas, numeradas según su orden de aparición en el gel. Las bandas con asteriscos son las proteínas marcadoras.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto DID I-02/6-2 «Resistencia de distintas especies de *Eucalyptus* spp. frente al ataque del gorgojo del eucalipto (*Gonipterus scutellatus*, Coleoptera: Curculionidae)», financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Chile.

### Literatura Citada

- BEÉCHE, M. 1999. Programa de detección y control del gorgojo del eucalipto en Chile, *Gonipterus scutellatus* (Gyll.) (Coleoptera: Curculionidae). En: XXI Congreso Nacional de Entomología, Libro de Actas, 3-5 noviembre, Arica, Chile. pp.: 33-34.
- BOLLAG, D.; ROZYCKY, M.; EDELSTEIN, S. 1996. Protein Methods. Wiley-Liss, New York.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- CADAHÍA, D. 1980. Proximidad de dos nuevos enemigos de los eucaliptos en España. *Boletín del Servicio de Plagas* 6: 165-192.
- CORDERO, A.; SANTOLAMAZZA, S. 2000. The effects of three species of eucalyptus on growth and fecundity of the eucalypts snout beetle (*Gonipterus scutellatus*). *Forestry* 73: 21-29.
- CORDERO, A.; SANTOLAMAZZA, S.; ANDRÉS, J. 1999. Life cycle and biological control of the Eucalypts snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) in north-west Spain. *Agricultural and Forest Entomology* 1: 103-109.
- COWLES, R.; DOWNER, J. 1995. Eucalyptus snout beetle detected in California. *California Agriculture* 49: 38-40.
- DERMOTT, J.; MEILAN, R.; THORNBURG, R. 1996. Plant-Insect Interactions: The Hackberry Nipple Gall. *The Word Wide Web Journal of Biology* <http://www.epress.com/w3jbio/vol12/mcdermott/mcdermott.html> Fecha última revisión: 15 agosto 2006. Fecha último acceso: [29 agosto 2006].
- ELLIOTT, H.; DE LITTLE, D. 1984. Insect pests of trees and timber in Tasmania. Forestry Commission, Tasmania. 90 p.
- ESTAY, S.; ARAYA, J. E.; GUERRERO, M. 2002. Biología de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) en San Felipe, Chile. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 28: 391-397.
- EZZELL, C. 2002. Proteins rule. *Scientific American* 286: 26-33.
- FLEISCHER, S.; MCINTYRE, J. O.; VITAL, J. C. 1979. Large-scale preparation of rat liver mitochondria in high yield. *Methods in Enzymology* 55: 32-39.
- FLOYD, R.; FOLEY, J. 2001. Identifying pest resistant eucalyptus using near-infrared spectroscopy. RIRDC Publication 01/112, Canberra, Australia. 110 p.
- HANKS, L.; MILLAR, J.; PAINE, T.; CAMPBELL, C. 2000. Classical biological control of the Australian weevil *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) in California. *Environmental Entomology* 29: 369-375.
- INFOR (INSTITUTO FORESTAL). 2006. Estadísticas Forestales 2005. *Boletín Estadístico (Chile)* 111. Santiago, Chile, 165 p.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 299-328.
- KLEIN, C.; WATERHOUSE, D. 2000. The distribution and importance of arthropods associated with agriculture and forestry in Chile. *ACIAR Monograph* 68, Santiago, Chile, 231 p.
- LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- MANSILLA, J. 1992. Presencia sobre *Eucalyptus globulus* Labill de *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Col. Curculionidae) en Galicia. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 18: 547-554.
- METCALF, R.; LUCKMANN, W. 1992. Introducción al manejo de plagas de insectos. Editorial Limusa S.A., México, D.F., 710 p.
- NAVAS, A.; LÓPEZ, J.; ESPÁRRAGO, G.; CAMAFEITA, E.; ALBAR, J. 2002. Protein variability in *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Proteomic Research* B: 421-427.

- RABASSE, J.; PERRIN, H. 1979. Introduction en France du charançon de l'eucalyptus, *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Col. Curculionidae). Annales de Zoologie et Ecologie Animale 11: 337-345.
- RICHARDSON, K.; MEAKINS, R. 1986. Inter and intra-specific variation in the susceptibility of eucalypts to the snout beetle *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae). South African Forestry Journal 139: 21-31.
- ROSADO, G. H. 1993. Gonipterinae dos eucaliptos: Primeiro registro de *Gonipterus scutellatus* para o Estado de Sao Paulo, Brasil e algumas considerações sobre *G. gibberus* (Coleoptera, Curculionidae). Revista Brasileira de Zoologia 13: 77-90.
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO). 2005. Informe Anual 2004. Subdepartamento de Vigilancia y Control de Plagas Forestales y Exóticas Invasoras, Santiago, Chile. 116 p.
- SANTOLAMAZZA, S.; CORDERO, A. 1998. Sperm competition, cryptic female choice and prolonged mating in the *Eucalyptus* snout-beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera, Curculionidae). Etiología 6: 33-40.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, H. H. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practices of numerical classification. W.H. Freeman Ed., San Francisco. 573 p.
- STATISTICA. 1993. Statistica for Windows. Release 4.5 A. StatSoft, Inc.
- TOOKE, F. 1953. The eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. A study of its ecology and control by biological means. Entomology Memoirs, Department of Agriculture, Union of South Africa 3: 1-282.
- WITHERS, T. M. 2001. Colonization of eucalypts in New Zealand by Australian insects. Australian Ecology 26: 467-476.
- ZANUNCIO, J.; PORTO, G.; ZANUNCIO, T.; MOLINA-RUGAMA, A. 1998. Plagas en las plantaciones de rápido crecimiento en Brasil. Pp. 322-331. En: Corporación Nacional Forestal, Proceedings of International Forest Insect Workshop, Pucón, Chile, 471 p.

Recibido: 9-sep-2006 • Aceptado: 8-oct-2007

## Inhibidores de proteasas en papas resistentes y susceptibles a la mosca minadora *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae)

Protease inhibitors in potatoes resistant and susceptible to leaf the miner fly *Liriomyza huidobrensis*  
(Diptera: Agromyzidae)

JOSÉ OLIVERA<sup>1</sup>, MARÍA PALACIOS<sup>2</sup>, JORGE TENORIO<sup>3</sup>, ÁLVARO MARCELO<sup>4</sup>, ALÍ GOLMIRZAI<sup>5</sup>

**Resumen:** Se estudiaron las diferencias bioquímicas entre cuatro clones de papa resistentes (220LM87B, 662LM86B, 136LM86B y cultivar María Tambeña) y uno susceptible (cultivar Revolución) a la mosca minadora *Liriomyza huidobrensis* mediante comparación del grado de inhibición de la actividad proteolítica de la tripsina sintética y de los extractos de larvas de la mosca por acción de las proteínas totales extraídas de hojas dañadas de los clones. La actividad proteolítica, en unidades relativas, por efecto de los clones 662LM86B, 136LM86B, 220LM87B, María Tambeña, y Revolución sobre la actividad de la tripsina fue 1,7; 2,5; 1,8; 1,3 y 2,4 y sobre la actividad de los extractos de larvas fue 0,24; 0,4; 0,6; 0,1 y 0,5 respectivamente. Por otro lado, la inhibición de la actividad proteolítica de la tripsina por las proteínas de los cultivares María Tambeña y Revolución fue del 93% y 77% respectivamente. Finalmente, usando la técnica de zimografía se identificó una banda de inhibidores de proteasas de 105 KDa y otra de 63 KDa; el grado de intensidad de esas bandas fue mayor en los clones resistentes. La banda de 105 kDa mostró una intensidad de hasta 4,2 veces en el cultivar María Tambeña con respecto a Revolución. Los resultados demuestran diferencias en la inhibición de la actividad proteolítica y en la presencia de la banda de 105 kDa entre los clones resistentes y susceptibles a la mosca minadora lo cual sugiere a los inhibidores de proteasas como factores importantes en la resistencia de estos clones a la mosca minadora.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum*. Defensa vegetal. Inhibidores de proteasas. Actividad proteolítica.

**Abstract:** Abstract Biochemical differences were studied among five potato clones: four resistant (220LM87B, 662LM86B, 136LM86B and cultivar María Tambeña) and one susceptible (cultivar Revolución) to attack of the leafminer fly *Liriomyza huidobrensis* (Diptera, Agromyzidae) through a comparison of the degree of inhibition of the proteolytic activity of synthetic trypsin and extracts of leafminer larvae by action of total proteins extracted from the leaves of the different potato clones before damage. The proteolytic activity, in relative units, of the clones 662LM86B, 136LM86B, 220LM87B, María Tambeña, and Revolution on trypsin activity were 1.7, 2.5, 1.8, 1.3, and 2.4, and on larval extracts were 0.24, 0.4, 0.6, 0.1 and 0.5, respectively. In contrast, when inhibition of the proteolytic activity of trypsin from proteins of the cultivars María Tambeña and Revolución was quantified, there was an inhibition of 93% and 77%, respectively. Finally, using zymography, two bands of protease inhibitors were identified, one 105 kDa and the other 63 kDa; the degree of intensity of these bands was greater in the resistant clones than the susceptible. The 105 kDa band showed an intensity up to 4.2 times higher in the cultivar María Tambeña than the cultivar Revolución. The results demonstrate differences in the proteolytic activity and the presence of the 105 kDa band between the clones resistant and susceptible to the leafminer fly, which suggests that protease inhibitors are important factors in the resistance of these clones to the leafminer fly.

**Key words:** *Solanum tuberosum*. Plant defense. Protease inhibitor. Proteolytic activity.

### Introducción

En la costa central de Perú, la mosca minadora *Liriomyza huidobrensis* Blanchard, 1926 es plaga clave del cultivo de la papa (Herrera 1963; Chávez y Raman 1987; Lizarraga 1990; Palacios y Raman 1993; Cisneros 1995). Al igual que en otras partes del mundo, como Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Guatemala, México, Panamá, Israel, Indonesia y Egipto donde está reportada (CIP 1998), la mosca minadora se ha constituido en problema central como consecuencia del uso intensivo de plaguicidas para controlar otras plagas en este cultivo, por lo que ha desarrollado niveles de resistencia significativos a los insecticidas más comúnmente usados (CIP 1998). La plaga daña exclusivamente el follaje de las plantas: las hembras adultas pican las hojas para alimentarse y para depositar sus

huevo, las larvas durante su desarrollo realizan minas serpenteantes en los foliolos, afectando de esta manera la capacidad fotosintética y el rendimiento (Palacios y Raman 1993). El daño en plantas jóvenes puede ocasionar mortalidad temprana (Morales *et al.* 1994). En el Valle de Cañete, la principal zona de producción de papa en la Costa Central del Perú, se han registrado pérdidas del rendimiento entre el 40 y 50 % cuando no se utilizaron métodos de control (Ewell *et al.* 1990; Palacios y Raman 1993).

Entre los factores que favorecen el incremento de las poblaciones de la mosca minadora en el Perú destacan el uso de variedades susceptibles y el excesivo uso de insecticidas (Palacios y Raman 1993). En la búsqueda de alternativas para el manejo de plagas en papa, el Centro Internacional de la Papa (CIP) desarrolló un programa de mejoramiento para

<sup>1</sup> Biólogo, M. Sc. Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN), Apto 1546 Lima-Perú. E-mail: joliverag@unmsm.edu.pe

<sup>2</sup> Bióloga, M. Sc. Consultora Asociada, Agroconsult Internacional. E. Mail: mariapalacioslazo@viabcp.com

<sup>3</sup> Biólogo, M. Sc. Centro Internacional de la Papa (CIP), Apto. 1558 Lima-Perú. E-mail: j.tenorio@cgiar.org

<sup>4</sup> Ph. D. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. E-mail: amarcelor@unmsm.edu.pe

<sup>5</sup> Ph. D. Dept. of horticulture Fayetteville Arkansas, 72701 USA. E-mail: ali\_golmirzaie@mtmsystems.com

obtener materiales resistentes a las principales plagas del cultivo: polilla de la papa (*Phthorimaea operculella* Zeller, 1873), mosca minadora (*Liriomyza huidobrensis* Blanchard, 1926) y gorgojo de los Andes (*Premnotrypes* spp) (Raman *et al.* 1994). Para la selección de plantas resistentes a mosca minadora se desarrolló un método de tamizado en campo, el cual, permitió identificar doce clones con altos niveles de resistencia a esta plaga y buenas características agronómicas (Tenorio *et al.* 1993). Posteriormente estos clones se evaluaron bajo condiciones de infestación controlada en laboratorio e invernadero, concluyéndose que el principal mecanismo de resistencia era el de antibiosis (Tenorio *et al.* 1993). Los clones 386768.10 (282LM86B) (actualmente es el cultivar “María Tambeña”), 220LM87B, 386766.43 (136LM86B) y 386767.21 (662LM86B) destacaron por su mayor nivel de resistencia (Tenorio *et al.* 1995).

Para defenderse de múltiples agresores, las plantas presentan complejas estrategias, como el uso generalizado de sustancias químicas (Fraenkel 1959). Estas sustancias pueden encontrarse en forma constitutiva en los tejidos, como por ejemplo, los glucósidos de cianógeno, terpenoides, alcaloides y sustancias fenólicas. Otras solo aparecen como respuesta a un estímulo primario por lo que son conocidas como sustancias inducidas, como por ejemplo las fitoalexinas y proteínas de defensa (Chrispeels y Sadava 1994). Entre las proteínas de defensa se mencionan a los inhibidores de proteasas, proteínas relacionadas con la patogénesis y lectinas (Bowles 1990; Dixon y Harrison 1994; Smirnov 1998). El factor biótico más común en la aparición de sustancias inducidas es el estrés por herida, este es el caso del daño producido por las larvas y los adultos de la mosca minadora sobre las plantas de papa al causar en las hojas innumerables heridas externas e internas. Se arguye que el estrés por herida desencadena en la planta la activación coordinada de sus genes, no solo para la defensa de la planta sino también para la regeneración del tejido dañado (Sánchez-Serrano *et al.* 1993). En plantas de papa y de tomate, se ha observado que el daño en el follaje por herida induce en unas horas la acumulación de una serie de proteínas colectivamente denominadas Proteínas de Respuesta Sistémica a la Herida (PRSHs) (Bergey *et al.* 1996). Trabajos con plantas previamente heridas y utilizadas después como alimento para insectos han determinado alteraciones del comportamiento en estos insectos (Hodge *et al.* 1999). Cabe señalar que desde hace mucho tiempo los inhibidores de proteasas, dado que afectan la viabilidad de los insectos, son considerados factores importantes de resistencia (Broadway *et al.* 1986; Ryan 1990; Dymock *et al.* 1992; Barker *et al.* 1995). Además, se han aislado genes de diferentes fuentes biológicas con la intención de introducirlos en plantas para conferirles resistencia (Wolfson y Murdock 1995).

La inducción de las proteínas inhibidoras de proteasas por efecto de la herida ha sido estudiada más profundamente (Ryan 1990) y se ha propuesto que, en la ruta de señalización para producir estos componentes, la herida activa una fosfolipólisis específica en la membrana plasmática, liberando al citoplasma los ácidos linoleico y linolénico, poniendo en marcha la ruta del ácido jasmónico que ha de conducir a la activación y síntesis de dichos inhibidores (Farmer y Ryan 1992). En estudios donde se han medido los niveles de inhibidores de proteasas en el tejido de plantas resistentes a insectos, se ha encontrado una correlación entre la resistencia, la muerte o disuasión de los insectos y la presencia de los inhibidores de proteasas (Broadway *et al.* 1986; Ryan 1990). Se considera que el

mecanismo de acción de estas proteínas inhibidoras de proteasas sobre los insectos se inicia en el intestino, con la activación de un sistema de retroalimentación que provoca la hipersecreción de enzimas digestivas y la disminución consecuente del apetito, produciéndose en el tiempo una pérdida de aminoácidos esenciales que ocasionan finalmente una deficiencia proteica (Broadway *et al.* 1986). Se ha observado que el nivel y la rapidez con que pueden presentarse los productos inducidos en las plantas, parecen marcar una diferencia característica en la resistencia de las mismas (Bowles 1990). Es decir, cuando se comparan cultivares resistentes y susceptibles, se observa en los resistentes la rápida acumulación de diferentes moléculas relacionadas con la defensa (Bowles 1990).

La finalidad entonces del presente estudio fue identificar diferencias en el nivel de inhibición de la actividad proteolítica e inhibidores de proteasas entre los clones de papa 220LM87B, 662LM86B, 136LM86B, la variedad María Tambeña y la variedad Revolución.

### Materiales y Métodos

**Material vegetal.** Los clones de papa resistentes a mosca minadora utilizados fueron 220LM87B, 136LM86B, 662LM86B, y 282LM87B (actualmente el cultivar María Tambeña). El clon susceptible a la plaga fue el cultivar Revolución. Todos ellos se desarrollaron en condiciones de invernadero entre los meses de abril y julio, con un intervalo de temperatura de 16-22°C. Los tubérculos se sembraron en macetas de plástico de 21 cm de diámetro con una mezcla de 1:1:2 de arena, tierra y musgo.

### Extracción de proteínas solubles

**De las hojas de papa.** Antes de la extracción, plantas de 20 días de edad se dañaron con un estilete hiriendo de tres a cuatro hojas de la parte inferior media y superior del follaje de la planta (daño mecánico). 24 horas después, se colectaron, se fijaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se guardaron a -20°C en bolsas de plástico. En el laboratorio, estas hojas se pesaron y luego se molieron con nitrógeno líquido en un mortero, obteniéndose así un polvo el cual fue homogenizado con búffer fosfato (25 mM fosfato de sodio, pH 5,0, conteniendo 5% glicerol, 10 mM metabisulfito de sodio, y 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) en una proporción 1:7 (p/v). El homogenizado se centrifugó a 16,000 r.p.m. por 20 minutos y el sobrenadante se trató con acetona fría (1:1 v/v) para precipitar las proteínas. Todo el tratamiento se realizó en baño de hielo. El precipitado de proteínas se separó por centrifugación y se secó bajo presión reducida (Speed Vac).

**De las larvas de mosca minadora.** Se utilizaron larvas de mosca minadora del tercer estadio que miden en promedio 2,5 mm obtenidas de hojas de lechuga infestadas en campo. Las larvas se extrajeron cuidadosamente con un estilete y se almacenaron a -20°C en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. Para la extracción de proteínas solubles se maceraron grupos de 20 larvas con 250  $\mu$ l de búffer Tris (50 mM, pH 7 a 4°C) en baño de hielo, luego el homogenizado se centrifugó a 4,000 r.p.m. por 2 min y el sobrenadante se usó inmediatamente en las pruebas enzimáticas. La concentración de las proteínas se midió utilizando albúmina bovino (BSA) como proteína estándar siguiendo el método de Bradford (1976).

## Ensayos Enzimáticos

**Actividad proteolítica.** Para determinar la actividad proteolítica de la tripsina sintética y de los extractos de larva se siguió el método enzimático de Fry *et al.* (1994) que utiliza gelatina como sustrato de proteasas. Para esto se mezclaron 0,25 ml de gelatina al 1% (diluido en 50 mM de Tris-HCl, pH 8) y 0,25 ml de una solución enzimática: tripsina (20 mg/ml) o extracto de larvas (20 larvas con 250 ml de 50 mM Tris-Cl, pH 7,0 – 4 a 5 ug/ul). Posteriormente la mezcla se incubó a 30°C en tres tiempos: tres, cuatro y cinco horas. Al cabo del tiempo la reacción se detuvo con 0,75 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 r.p.m. por 5 min. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a la misma velocidad. La lectura en el espectrofotómetro se realizó a 280 nm y se utilizó como blanco la solución de gelatina combinado con tripsina, o con extracto de larva, respectivamente, pero incubados por separado y mezclados justo antes de la fijación con TCA. Una unidad de actividad proteolítica (U) se definió como el incremento de la absorbancia en 0,01 a 280 nm (Fry *et al.* 1994). Estos valores fueron considerados como el 100% de actividad proteolítica para los ensayos de inhibición.

**Inhibición de la actividad proteolítica.** Para los ensayos de inhibición de la actividad proteolítica de tripsina y de los extractos de larva, por efecto de las proteínas solubles de hojas de papa de los diferentes clones, se utilizó el método de Fry *et al.* (1994) descrito anteriormente. Previo al ensayo las soluciones enzimáticas se preincubaron con los extractos de proteínas de las hojas de papa (1 mg/ml diluidos en 25 mM de fosfato de sodio a pH 5) por 15 min a temperatura ambiente. En el caso de la mezcla de tripsina (20 ug/ml) con las proteínas de hojas de papa, ésta tuvo una proporción de 1:5 (v/v) y en el caso de los extractos de larva y proteínas de hoja, la proporción fue de 1:1 (v/v). Una unidad de actividad relativa (UR) se definió como el incremento de la absorbancia en 0,01 a 280 nm de la mezcla de enzima y proteínas de hoja sobre el incremento de la absorbancia en 0,01 a 280 nm de enzima sola.

Finalmente para comparar la inhibición proteolítica de la tripsina entre los cultivares M. Tambeña y Revolución se realizó un ensayo utilizando el sustrato sintético TAME (*Na-p-tosil-L-arginina-metil-ester*) para la determinación de proteínas semejantes a tripsina según un método descrito en el Manual Whortington (1988) utilizando una concentración final de 4 ug/ml de tripsina y 10 mM de TAME. Para el cálculo de las

unidades de actividad de tripsina se usó la fórmula  $U_{mg^{-1}} = (5,55)(rA_{247/min})(mg^{-1} \text{ tripsina})$  (Wortington 1988).

**Geles de poliácridamida (Zimografía).** Para detectar inhibidores de proteasas se prepararon geles de poliácridamida (PAGE) al 8% copolimerizado con gelatina (1 mg/ml) (Hanspal *et al.* 1983). Se utilizó una unidad de electroforesis vertical (MINIPROTEAN II, Bio-rad) con espaciadores de 0,75 mm. Se pesaron 6 mg de proteínas de hojas por muestra las cuales se diluyeron en búffer muestra de electroforesis 2X (0,125 M tris-Cl, pH 6,8, conteniendo 20% glicerol, 4% de SDS (Lauryl sulfato), 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,002% de azul de bromofenol). Para el revelado los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R-250 (0,01%) disuelto en ácido acético:metanol:TCA:agua (24:24:2:10), y se destiñeron con metanol:ácido acético:agua (2:10:2). Simultáneamente se corrieron estándares de proteínas SDS-PAGE (Fosforilasa b, 97.400; Albúmina bovino, 66.000; Albúmina de huevo, 45.000; Anhidrasa Carbónica, 29.000, alfa-Lactoalbumina, 14.200), en otro gel con las mismas condiciones.

**Análisis de geles y cálculos.** Los geles se fijaron en membranas de celofán utilizando el búffer de decoloración de electroforesis como solución de fijación. Luego, se colocaron bajo un densitómetro (Hoefer) que estuvo conectado a una computadora PC IBM compatible desde el cual se registraron las bandas, y se analizaron mediante el programa GS365W.EXE (Hoefer Software). Las imágenes con bandas claras en fondo oscuro se invirtieron. Por otro lado, los datos obtenidos por los ensayos enzimáticos, a partir de tres repeticiones cada uno, se linearizaron mediante rectas de regresión con el programa Excel (Microsoft Inc.).

## Resultados y Discusión

En este trabajo se asumió que las plantas responden de forma similar al ataque del insecto y al daño mecánico produciendo diferentes vías para iniciar la defensa (Farmer y Ryan 1992). Por lo tanto, se presume que algunos genes inducidos por herida, producen sustancias como los inhibidores de proteasas, que actúan en la defensa del hospedero contra el ataque del insecto.

**Actividad proteolítica de la tripsina y de los extractos de larvas.** La actividad proteolítica de la tripsina sobre gelatina fue de 1,8 unidades (U) y de los extractos de larva fue de 0,5

**Tabla 1.** Efecto de las proteínas de los clones en la actividad proteolítica de tripsina y extractos de larvas de mosca minadora. Método de Fry *et al.* (1994).

Clones	Tripsina		Extracto de mosca minadora		Reducción de la actividad proteolítica %
	U	UR <sup>†</sup>	U	UR <sup>‡</sup>	
M. Tambeña	2.35	1.30	0.05	0.10	90
662LM86B	3.20	1.70	0.12	0.24	76
220LM86B	3.30	1.83	0.33	0.66	34
136LM86B	4.50	2.50	0.20	0.40	60
Revolución	4.40	2.44	0.25	0.50	50

<sup>†</sup> UR = Unidades de actividad relativa obtenidas al comparar las unidades de la actividad proteolítica por efecto de cada clon con el valor de 1,8 unidades (actividad de la tripsina sobre la gelatina que es considerado el 100% de actividad). <sup>‡</sup> UR = Unidades de actividad relativa obtenidas al comparar las unidades de la actividad proteolítica por efecto de cada clon con el valor de 0,5 unidades (actividad de los extractos de larva sobre la gelatina que es considerado el 100%).

U. Cuando la tripsina se incubó con los diferentes extractos de papa, la actividad proteolítica aumentó en todos los casos produciéndose el mayor aumento con el extracto de 136LM86B (4,5 U) y menor con M. Tambeña (2,35 U) (Tabla 1). Este aumento de la actividad enzimática se interpretó como un sinergismo proteolítico, es decir, los valores son superiores al valor de la actividad proteolítica de la tripsina actuando sola (1,8 U). La mezcla de proteínas obtenidas de hojas indudablemente contiene muchas enzimas con actividad endopeptidasas sobre la gelatina, que es un sustrato muy utilizado para aislar proteasas de diferentes fuentes vegetales (Santaurius y Ryan 1977; Santarius y Belitz 1978) dado que los sustratos sintéticos son menos sensibles. Se puede notar que los clones resistentes presentan mayor actividad proteolítica. Giri *et al.* (1998) por ejemplo, encuentra diferencias entre dos cultivares de garbanzo resistentes y susceptibles a *Fusarium oxysporum* Schltdl. midiendo las unidades de actividad proteasa. En la interacción con los patógenos es conocida la respuesta hipersensible en la cual se inducen tempranamente y con rapidez varias enzimas hidrolíticas (Dixon y Harrison 1994). Dado que las larvas de la mosca minadora producen túneles dentro de las hojas, y por tanto las heridas que ocasiona pueden llegar a ser severas, la mayor síntesis de endopeptidasas podría estar dirigida a curar rápidamente las heridas producidas (Bowles 1990) o producir proteínas tóxicas como los inhibidores de proteínas (Bergey *et al.* 1996; Reymond *et al.* 2000).

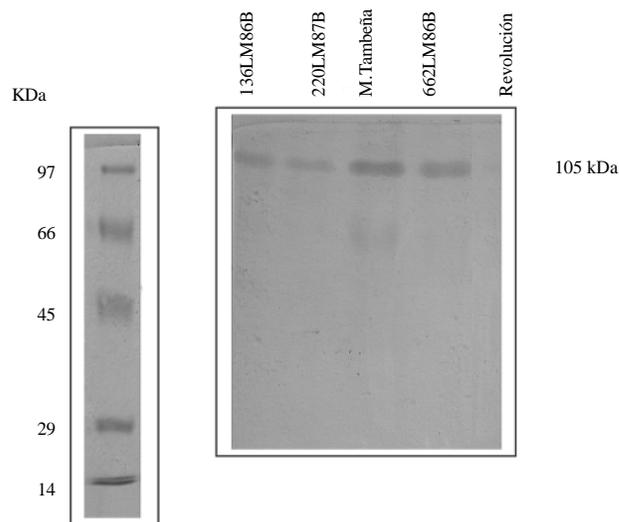
**Inhibición de la actividad proteolítica de tripsina y extractos de larvas.** Al calcular la inhibición de la actividad enzimática de tripsina expresados en unidades relativas, en el cual los valores más cercanos a cero son considerados como de menor actividad proteolítica o de mayor inhibición proteolítica, se observó que María Tambeña y el clon 662LM86B tienen mayor inhibición con respecto al cultivar Revolución (1,3 UR y 1,7 UR respectivamente), mientras que el clon 136LM86B fue similar con el cultivar Revolución (Tabla 1). Dado que el sinergismo proteolítico de las hojas y la tripsina producen niveles elevados de absorbencia en forma diferente con los resultados de los extractos de larvas, se prefirió utilizar las unidades relativas para hacer una comparación del porcentaje de inhibición o reducción de la actividad proteolítica (Tabla 1). De esta forma es M. Tambeña la que presenta la mayor inhibición. Los inhibidores de proteasas inducidos por herida y por ataque de insectos que más se han estudiado son de la familia serina proteinasa (Ryan 1990; Bowles 1990; Sanchez-Serrano 1993). En este trabajo las hojas de papa fueron previamente dañadas con estilete y luego fijados con nitrógeno líquido para extraer las proteínas. Se conoce que por este efecto se sintetizan una serie de proteínas denominadas colectivamente proteínas de respuesta sistémica a la herida (Bergey *et al.* 1996) entre las cuales están los inhibidores de serina proteinasas. Actualmente se sabe que esta inducción puede ser modulada sistémicamente por un péptido de 18 aminoácidos llamado sistemina (Ryan 1998; Shaller 1999). Al parecer, M Tambeña contiene muchos de esos inhibidores que contrarrestan la actividad de tripsina (una serina preteinasas).

La inhibición proteolítica de María Tambeña y Revolución se corroboró en el ensayo realizado con TAME. El ensayo de tripsina y TAME presenta una actividad de 363,88 unidades por miligramo, pero cuando la tripsina se combina con las proteínas de hojas de M. Tambeña y Revolución esta actividad disminuyó en 93% y 77% respectivamente (Tabla 2). En

términos generales los clones resistentes presentan mayor inhibición de la actividad proteolítica de los extractos de larvas de mosca minadora y de tripsina en comparación con el cultivar susceptible Revolución. Siendo M. Tambeña la que produce las mayores inhibiciones.

**Inhibidores de proteasas mediante zimografía.** Los geles de electroforesis para ver actividad de proteínas con base en su función (zimografía) son técnicas ampliamente utilizadas para estudiar extractos crudos de diverso origen, como los inhibidores de proteasas (Hansal 1983; Michaud 1993). Estos métodos se basan en la capacidad de la proteína de perder su actividad cuando se expone a alta concentración de SDS pero lo recupera una vez que el detergente es removido de la solución. En nuestro caso usamos el método de Hanspal (1983) donde se encontró una banda de aproximadamente 105 KDa que se expresa en diferentes intensidades entre los clones resistentes, siendo de menor intensidad en el material susceptible Revolución (Fig. 1). Otra banda menos definida, de aproximadamente 63 KDa se muestra también en estos geles (Fig. 2). El grado de intensidad de la banda de 105 KDa que es la de mayor tinción, se midió por densitometría registrándose en cada uno de los genotipos picos mayores que en Revolución. En M Tambeña el nivel de expresión es de 4.2 a uno en comparación con Revolución (Fig. 3). Es interesante que la intensidad de la banda de 105 kDa este correlacionada con los clones de papa resistentes a la mosca minadora. A pesar que también Revolución presenta la banda de este inhibidor, no alcanza la mayor producción presentada en los clones resistentes. Estos resultados nos inducen a considerar que la identificación de la naturaleza molecular de la banda de 105 KDa para el desarrollo de marcadores bioquímicos de resistencia podría utilizarse para facilitar la identificación de materiales que expresen esta cualidad.

Se asume que las plantas perciben la depredación el insecto en forma similar a como perciben la herida, y por tanto utilizan las mismas señales de traducción en cascada, o vías similares para iniciar la respuesta de la defensa (Farmer y Ryan 1992; Hodge *et al.* 1999), por tanto, se presume que algunos genes



**Figura 1.** Bandas de inhibidores de proteasas de los diferentes clones revelados por zimografía (tinción con Comassie blue). La banda de 105 KDa se expresa con mayor intensidad en los clones resistentes en comparación con el cultivar susceptible Revolución.

**Tabla 2.** Porcentaje de inhibición relativa de la actividad proteolítica de tripsina en TAME utilizando proteínas de hojas de los clones María Tambeña y Revolución.

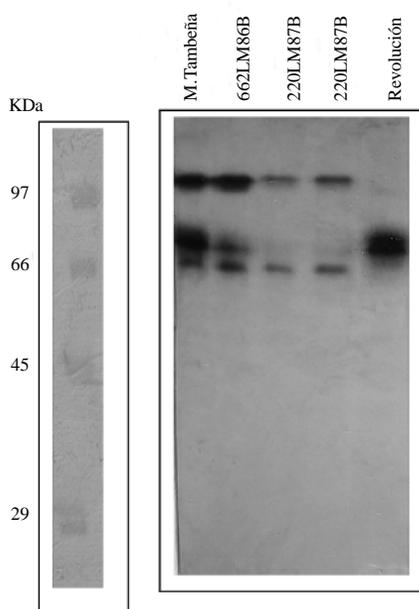
	Tripsina <sup>†</sup>	Tripsina más hojas	
		M. Tambeña	Revolución
Umg-1 tripsina*	363,88	25,00	83,33
Porcentaje relativo de inhibición de tripsina	000,00	93,13	77,09

\* Se usó la siguiente fórmula para los cálculos de unidades totales de actividad de tripsina:  $Umg^{-1} = (5.55) (\Delta A_{247/min}) (mg^{-1} \text{ tripsina})$  Unidades de actividad relativa obtenida al comparar las unidades de la actividad proteolítica por efecto de cada clon con el valor de 1,8 unidades (actividad de la tripsina sobre la gelatina que es considerado el 100% de actividad). † Se usaron 12 ug de tripsina en la solución total.

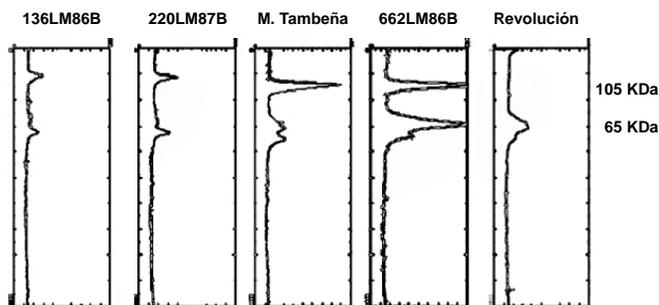
inducibles por herida, como los que codifican inhibidores de serina proteinasas, probablemente funcionan en la defensa vegetal contra la depredación del insecto. Este resultado junto con la observación del incremento de mayores proteasas detectadas en los materiales resistentes, en especial M. tambeña, podrían revelarnos el origen de la resistencia. Sin embargo, no hay antecedentes que los insectos puedan inducir inhibidores de proteasas debido a la depredación (Ryan 1990). Pero si hay reportes de enzimas como bromelaina (Boller 1986), leucina aminopeptidasa (Pautot *et al.* 1993), proteinasas semejantes a subtilisina (Jorda *et al.* 1999), carboxipeptidasa (Schaller y Ryan 1996) y cisteína proteinasa (Linthorst *et al.* 1993) que se acumulan en respuesta al ataque de un insecto, del mismo modo que produce una herida. La inducción de inhibidores de proteasas y el conjunto de proteasas si es reportado como una respuesta al daño mecánico en plantas (Farmer 1992; Reymond 2000).

### Conclusiones

Tomando en conjunto los resultados se puede postular que los clones de papa resistentes a la mosca minadora, en especial el



**Figura 2.** Bandas de inhibidores de proteasas revelados por zimografía (tinción con Fast blue). Las bandas, estimados en 63 y 105 KDa, muestran diferentes intensidades entre los clones resistentes y susceptibles.



**Figura 3.** Densitometría a partir de los geles de zimografía. Se observa mayor intensidad de la banda de 105 KDa (picos) en los clones resistentes con respecto a Revolución.

cultivar María Tambeña y el clon 662LM86B sintetizan o activan en corto tiempo los niveles de sus proteínas frente al daño provocado por el ataque de la mosca minadora en sus hojas, entre los cuales están los inhibidores de proteasas. Esta inducción diferencia en términos generales los clones resistentes del susceptible al ataque de mosca minadora y podría ser el factor principal de la resistencia.

### Literatura Citada

- BARKER, A. M.; WRATTEN, S.D.; EDWARDS, P. J. 1995. Wound-induced changes in tomato leaves and their effects on the feeding patterns of larval Lepidoptera. *Oecologia* 101: 251-257.
- BERGEY, D. R.; HOWE, G. A.; RYAN, C. A. 1996. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proceedings National Academy of Sciences (USA)*. 93: 12053-12058.
- BOLLER, T. 1986. Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organism. Vol. 2, M.J. Dalling, ed (Boca Raton, FL; CRC Press), pp 67-95. En: *Plant Proteolytic Enzymes*.
- BOWLES, D. J. 1990. Defense-Related Proteins in Higher Plants. *Annual Review of Biochemistry* 59: 873-907.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. 1986. Plant Proteinase Inhibitors: A defense against herbivorous insects?. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 41: 33-38.
- CIP. 1998. Biotechnology-Assisted breeding to reduce pesticide use in potatoes. 1993-1997 (GLO-91-016). Final Report. International Potato Center and United Nations Development Program Division of Global and Interregional Projects. Lima, Perú. 48 p.
- CISNEROS, F. H. 1995. Control de Plagas Agrícolas. AGLIS Electronics. Lima, Perú. 313 p.
- CHAVEZ, G. L.; RAMAN, K. V. 1987. Evaluation of trapping and trap types to reduce damage to potatoes by the leafminer, *Liriomyza huidobrensis* (Diptera, Agromyzidae). *Insect Science and its Application* 6: 265-270.
- CHRISPEELS, M. J.; SADAVA, D.E. 1994. Plants, genes and agriculture. Jones and Bartlett Publishers Inc. Boston, USA. 562 p.
- DIXON, R. A.; HARRISON, M. J. 1994. Early Events in the Activation of Plant Defense Responses. *Annual Review of Phytopathology* 32: 479-501.
- DYMOCK, J. J.; LAING, W. A.; SHAW, B. D.; GATEHOUSE, A. M. R.; CHRISTELLER, J. T. 1992. Behavioral and physiological responses of grass grub larvae (*Costelytra zealandica*) feeding on protease inhibitors. *New Zealand Journal of Zoology* 19: 123-131.

- EWELL, P. T.; FANO, H.; RAMAN, K. V.; ALCAZAR, J.; PALACIOS, M.; CARHUAMACA, J. 1990. Farmer Management of Potato Insect Pest in Peru. Food Systems Research Series No. 6. International Potato Center (CIP). Lima, Perú. 77 p.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid active the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell* 4: 129-134.
- FRAENKEL, G. 1959. The raison d'être of secondary plant substances. *Science* 129: 1466-1470.
- FRY, S. M.; HUANG, J. S.; MILHOLLAND, R. D. 1994. Isolation and preliminary characterization of extracellular protease produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. *Phytopathology* 84: 357-363.
- HANSPAL, J. S.; BUSHHELL, G. R.; GHOSH, P. 1983. Detection of Protease Inhibitors Using Substrate-Containing Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 132: 288-293.
- HERRERA, A. J. 1963. Problemas insectiles del cultivo de la papa en el Valle de Cañete. *Revista Peruana de Entomología* 6 (1): 1-9.
- HODGE, S.; WRATTEN, S.; SMIYH, J.; THOMAS, M.; FRAMPTON, C. 1999. The role of leaf wounding and epigeal predator on caterpillar damage to tomato plants. *Annals of Applied Biology* 134: 137-141.
- JORDA, L.; COEGO, A.; CONEJERO, V.; VERA, P. 1999. A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *Journal of Biological Chemistry* 274: 2360-2365.
- LINTHORST, H. J. M., VAN DER DOES, C. BREDERODE, F. T.; BOL, J. F. 1993. Circadian expression and induction by wounding of tobacco genes for cysteine proteinase. *Plant Molecular Biology* 21: 685-694.
- LIZARRAGA, A. D. 1990. Biología de la Mosca Minadora *Liriomyza huidobrensis*, Blanchard (Diptera, Agromyzidae). *Revista Latinoamericana de la Papa* 3: 30-40.
- METHA, R. A.; WARMBART, R. D. MATTO, A. K. 1996. Tomato fruit carboxypeptidase: Properties, induction upon wounding, and immunocytochemical localization. *Plant Physiology* 110: 883-892.
- MICHAUD, D.; FAYE, L.; YELLE, S. 1993. Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. *Electrophoresis* 14: 94-98.
- MORALES, R. A.; ATENCIO, F. A.; LARA, J. A.; MUÑOZ, J. A. 1994. La mosquita minadora (*Liriomyza* spp.) en Panamá. Volcan, Chiriquí (Panamá). Programa Regional Cooperativo de Papa (PRECODEPA) Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). Monografía No. 1. Panamá. 21 p.
- PALACIOS, M.; RAMAN, K. V. 1993. Control integrado de la mosca minadora *Liriomyza huidobrensis* Blanchard. *Memorias. Taller de manejo Integrado de Plagas*. p. 48-55. Balcarce.
- PAUTOT, V.; HOLZER, F. M. REISCH, B., WAILLING, L. L. 1993. Leucine aminopeptidase: An inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 9906-9910.
- RAMAN, K. V.; GOLMIRZAIE, A. M.; PALACIOS, M.; TENORIO, J. 1994. Inheritance of Resistance to Insects and Mites. pp. 447-463. En: Brashaw, J. E. and Mackay G. R. (eds.). *Potato Genetics*. CAB International. Wallingford, UK. 552 p.
- REYMOND, P.; WEBER, H., DAMOND, M.; FARMER, E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The plant Cell* 12: 707-719.
- RYAN, C. A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449.
- SANCHEZ-SERRANO, J. J.; ANATI, S.; DAMMANN, C.; ENETH, M.; HERBERS, K.; HILDMAN, T.; LORORTH, R.; PRATT, S.; WILLNITZRE, L. 1993. Proteinase Inhibitors in the potato response to wounding, pp. 157-173. En: Chet, I. (ed.). *Biotechnology in plant disease control*. Wiley-Liss. New York, USA.
- SANTARIUS K.; RYAN, C. 1977. Radial diffusion as a sensitive method for screening endopeptidase activity in plant extracts. *Analytical Biochemistry* 77: 1-9.
- SANTARIUS K.; BELITZ, H. D. 1978. Proteinase activity in potato plants. *Planta* 141: 145-153.
- SCHALLER, A. RYAN, C. A. 1996. Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartate protease, a systemic wound response protein. *Plant Molecular Biology* 31: 1073-1077.
- SMIRNOFF, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Current Opinions in Biotechnology* 9: 214-219
- TENORIO, J.; PALACIOS, M.; GOLMIRZAIE, A. M.; CISNEROS, F.; ORTIZ, O. 1993. Evaluación preliminar de clones resistentes a *Liriomyza huidobrensis* en el Valle del Tambo, Arequipa. *Resúmenes. XXXV Convención Nacional de Entomología*, p.18. Arequipa, Perú.
- TENORIO, J.; PALACIOS, M.; CAÑEDO, V.; GOLMIRZAIE, A. M.; VELARDE, H. 1995. "María Tambaña-INIA" una variedad resistente a mosca minadora *Liriomyza huidobrensis*. *Resúmenes. XXXVIII Convención Nacional de Entomología*, p.15. Chíncha, Perú.
- WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L. 1995. Potential use of protease inhibitor for host plant resistance: A test case. *Environmental Entomology* 24: 52-57.
- WORTHINGTON, C. C. 1988. *Manual Worthington*. Worthington Biochemical Corporation. New Jersey, USA. 346 p.

Recibido: 13-jun-2006 • Aceptado: 9-ago-2007

## Resistencia de especies de *Manihot* a *Mononychellus tanajoa* (Acariformes), *Aleurotrachelus socialis* y *Phenacoccus herreni* (Hemiptera)

Resistance of *Manihot* species to *Mononychellus tanajoa* (Acariformes),  
*Aleurotrachelus socialis*, and *Phenacoccus herreni* (Hemiptera)

MARITZA BURBANO M.<sup>1</sup>, ARTURO CARABALÍ M.<sup>2</sup>, JAMES MONTOYA L.<sup>3</sup>, ANTHONY C. BELLOTTI<sup>4</sup>

**Resumen:** Las especies silvestres del género *Manihot* ofrecen una fuente potencial de genes de resistencia para el control de la mayoría de insectos plaga de yuca (*Manihot esculenta*). Recientemente, esta característica ha sido aprovechada para el desarrollo de variedades resistentes a plagas y enfermedades a través de cruces inter-específicos con especies silvestres de *Manihot*. Con el objetivo de buscar nuevas fuentes de resistencia en especies de *Manihot*, se evaluaron y compararon dos especies silvestres brasileñas, *Manihot flabellifolia* y *M. peruviana*, frente a genotipos comerciales de *M. esculenta*, para determinar su potencial de resistencia a tres de las principales plagas de yuca en las Américas, África y Asia: el ácaro *Mononychellus tanajoa*, el piojo harinoso (*Phenacoccus herreni*) y la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*). La investigación se realizó en CIAT, Palmira, bajo condiciones controladas (25±5 °C, 60±10 HR, 12L/D) utilizando una metodología de tamizados y bioensayos asistida por escalas de infestación y daño. Los resultados mostraron que los genotipos de *M. flabellifolia* (444-002) y *M. peruviana* (417-003 y 417-005) exhibieron altos niveles de resistencia frente a *M. tanajoa* y *A. socialis*, mientras, el genotipo de *M. flabellifolia* (444-002) y *M. peruviana* (417-003) presentaron niveles intermedios de resistencia a *P. herreni*. Se discute la importancia de estas fuentes de resistencia a la luz de los programas de conservación de la diversidad y de la resistencia de planta hospedera como un componente del manejo integrado de plagas.

**Palabras clave:** Yuca. Mosca blanca. Resistencia planta hospedera.

**Abstract:** Wild species of the genus *Manihot* offer a valuable and potential source of resistance genes for the control of the majority of insect pests of cassava (*Manihot esculenta*). Recently, this characteristic has been exploited to develop strains resistant to pests and diseases through inter-specific crosses with wild *Manihot* species. In order to find new sources of resistance in *Manihot* species, two wild Brazilian species, *M. flabellifolia* and *M. peruviana*, were evaluated and compared to commercial genotypes of *M. esculenta* to determine potential resistance against three of the major cassava pests in the Americas, Africa and Asia: the mite *Mononychellus tanajoa*, the mealybug (*Phenacoccus herreni*) and the whitefly (*Aleurotrachelus socialis*). The research was carried out at CIAT, Palmira, under controlled conditions (25±5 °C, 60±10 RH, 12L/D) using screening and bioassay methodologies assisted by controlling infestation and damage levels. The results showed that the genotypes *M. flabellifolia* (444-002) and *M. peruviana* (417-003 and 417-005) exhibited highest levels of resistance against *M. tanajoa* and *A. socialis*, while the genotypes *M. flabellifolia* (444-002) and *M. peruviana* (417-003) showed middle levels of resistance against *P. herreni*. The importance of these sources of resistance is discussed in light of the diversity conservation and host plant resistance programs and a component of integrated pest management.

**Key words:** Cassava. Whitefly. Host plant resistance.

### Introducción

*Manihot* Miller, Euphorbiaceae, es un género nativo del Neotrópico que ocupa un amplio rango de hábitats, desde el sur de Arizona hasta Argentina (Rogers y Appan 1973). Sus especies son perennes y varían desde arbustos acaulescentes hasta árboles de 10 a 12 metros de altura. La mayoría presenta raíces tuberosas y algunas acumulan grandes cantidades de almidón, como la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), uno de los cultivos tropicales más importantes del mundo, la cual es producida, principalmente, por pequeños agricultores como fuente alimenticia e industrial (Cock 1985). *M. esculenta* es tolerante a la sequía y a suelos degradados, además de tener gran flexibilidad respecto a la plantación y la cosecha que le confieren alta adaptabilidad a una gran variedad de ecosistemas tropicales donde, es un elemento básico en la dieta de alrededor

de 500 millones de personas (FAO/FIDA 2000). Lamentablemente, las características agronómicas de este cultivo favorecen, la presencia de artrópodos plaga que causan grandes pérdidas como consecuencia de daños directos e indirectos (Bellotti *et al.* 1994). En la actualidad tres especies son los artrópodos que más afectan y limitan el aprovechamiento de este cultivo: el ácaro verde de la yuca (AVY), *Mononychellus tanajoa* (Bondar, 1938), especie que causa pérdidas en el rendimiento de raíces entre el 13-80% en las Américas y África (Skovgard *et al.* 1993; Bellotti *et al.* 1999); el piojo harinoso, *Phenacoccus herreni* (Cox-Williams, 1981), en altas poblaciones puede causar pérdidas en el rendimiento hasta del 80% en el norte de Sur América y Norte-Este del Brasil (Vargas y Bellotti 1981) y la mosca blanca, *Aleurotrachelus socialis* (Bondar, 1923), presente en Ecuador, Venezuela, Brasil y en Colombia, donde ocasiona pérdidas hasta del 79% (CIAT

<sup>1</sup> Estudiante de Biología Universidad del Valle. merry2309@yahoo.com

<sup>2</sup> Asistente de Investigación, Entomología de yuca, CIAT. a\_carabali@yahoo.com

<sup>3</sup> Profesor Departamento de Biología Universidad del valle. jamesmon@univalle.edu.co

<sup>4</sup> Líder Proyecto Entomología de yuca, CIAT, A.A. 6713, Cali, Colombia. a\_bellotti@cgiar.org (Autor para correspondencia).

1986). Para contrarrestar los daños ocasionados por estas plagas, se utilizan generalmente plaguicidas químicos (Smith 1989), pero su uso indiscriminado ha generado efectos negativos en los insectos benéficos, ha propiciado el desarrollo de resistencia a los insecticidas y, en general, ha producido altos niveles de contaminación ambiental (Smith 1989; Panda y Khush 1995). Adicionalmente, su empleo es una opción costosa para el pequeño productor (Arias y Guerrero 2000). Ante estos hechos, se hace necesaria la búsqueda de alternativas de manejo que permitan mantener las poblaciones plagas por debajo del nivel de daño económico. El manejo integrado de plagas (MIP), combina resistencia vegetal a plagas con métodos de control, biológico, cultural y químico. La resistencia de planta hospedera (RPH) es la base del Manejo Integrado de Plagas (MIP), por su compatibilidad con otros métodos de control, bajo costo y compatibilidad con el ambiente (Bellotti *et al.* 1993).

Las especies silvestres de *Manihot* son conocidas “fuentes” de genes de resistencia a prácticamente todas las plagas y enfermedades de yuca, como también, al deterioro fisiológico post-cosecha (PPD). No obstante su valor, han sido poco utilizadas en el mejoramiento de yuca, con el agravante que dichas especies están amenazadas por extinción, debido a cambios del medio y destrucción de sus hábitats naturales (CIAT 2004).

Con el objetivo de buscar nuevas fuentes de resistencia, en este estudio se evaluaron y compararon dos especies silvestres brasileras (*M. flabellifolia* y *M. peruviana*) frente a genotipos comerciales de *Manihot esculenta*, para determinar sus potenciales de resistencia a tres plagas claves de yuca en las Américas, África y Asia: el ácaro *Mononychellus tanajoa*, el piojo harinoso *Phenacoccus herreni* y la mosca blanca *Aleurotrachellus socialis*.

### Materiales y Métodos

**Plantas y Artrópodos.** En el programa de entomología de yuca (CIAT) se propagaron 20 plantas de los genotipos CMC-40, MECU-72 de *M. esculenta* Crantz; MFLA 444-002 de *M. flabellifolia* y MPER 417-0003, MPER 417-005 de *M. peruviana* (Mueller) y se transplantaron posteriormente a bolsas plásticas y materas. Cinco plantas de cada genotipo, de 40 días de edad, se introdujeron individualmente en jaulas de tul y madera de 0,5 m x 0,5 m x 1m.

Los especímenes de mosca blanca, *A. socialis*, y del piojo harinoso, *P. herreni*, se recolectaron de colonias independientes establecidas en CIAT. La colonia de ácaros *M. tanajoa* fue reestablecida siguiendo la metodología propuesta por Lenis *et al.* (1993).

**Evaluación de resistencia.** Para la identificación de los niveles de resistencia presentes en genotipos y especies silvestres de *Manihot* se utilizaron infestaciones artificiales de especímenes de cada una de las plagas. Las evaluaciones se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo (25±5 °C, 60±10 HR, 12L/D).

La infestación con el acaro *M. tanajoa* se realizó sobre cinco plantas de cinco genotipos, *M. esculenta* (CMC-40; MECU-72), *M. flabellifolia* (MFLA 444-002) y *M. peruviana* (MPER 417-003; 417-005), las cuales se introdujeron individualmente en jaulas de tul y madera de (0.5m x 0.5m x 1m), cada una con tres repeticiones y dispuestas al azar. La infestación se realizó sobre las hojas superiores de cada

genotipo y especie silvestre a evaluar, colocando dos lóbulos de hojas infestadas con 200 ácaros por cinco días. Al finalizar este periodo las hojas viejas se retiraron. Las evaluaciones de infestación y daño se realizaron 10 días después de la infestación y se continuaron cada cinco días durante cuatro semanas.

La infestación de genotipos y especies silvestres con piojo harinoso (*P. herreni*) se realizó utilizando huevos dispuestos en ovisacos provenientes de la colonia de *P. herreni*. Para una mejor colonización los ovisacos se colocaron sobre la axila de la hoja con la ayuda de un punzón. Los huevos del piojo harinoso contienen una sustancia pegajosa que facilita su adherencia a las plantas. La primera evaluación se realizó a los 10 días y se continuaron las evaluaciones cada 10 días durante dos meses. Así mismo, la infestación se realizó en jaulas individuales con cinco plantas de cinco genotipos, cada una con tres repeticiones y dispuestas al azar.

La infestación con *Aleurotrachellus socialis* en cada genotipo y especie silvestre se realizó con 200 adultos de *A. socialis* recién emergidos. Hojas de *M. esculenta*, con aproximadamente 500 pupas (se distinguen por tener los ojos rojos), se tomaron de la colonia de mosca blanca y colocadas en una caja-jaula de madera de 30 cm x 30 cm x 30 cm, forrada con tul negro en tres de sus caras y en la superior con vidrio. Las hojas permanecieron en la caja durante 12 horas, después de las cuales se retiraron los adultos emergidos y con la ayuda de un aspirador manual de pipeta se colocaron en las hojas más jóvenes de las plantas a evaluar. Las evaluaciones se realizaron cinco días después de la primera infestación y cada 10 días durante dos meses.

**Evaluación de infestación y daño.** Las evaluaciones para las tres especies se realizaron por observación directa. Este tipo de evaluación puede ser adaptable a muchas asociaciones insecto-planta, a la vez que permite examinar un gran número de plantas en corto tiempo. Este procedimiento se basa en escalas que califican el grado de infestación y, por otra parte, el grado de daño que ha sufrido la planta. La escala de infestación, define cualitativamente la cantidad aproximada de insectos que se encuentran en la planta en un momento dado y en qué parte de ésta se concentran. La escala de daño permite definir o categorizar en alto, intermedio o susceptible el nivel de resistencia manifestado por el deterioro de las plantas. Esta escala está generalmente comprendida entre uno y seis.

Para ácaros y piojos harinosos también se realizó una división de la planta en tres estratos, alto (cogollo y hojas nuevas), medio (hojas medias) y bajo (hojas viejas) y se observó la distribución de los diferentes estados de la plaga en las diferentes partes de la planta, estos datos se consignaron teniendo en cuenta las escalas de daño y grados de infestación.

Para evaluar el grado de infestación y daño para las plantas infestadas con moscas blancas se siguió el método desarrollado por Arias (1995), mediante el cual se estima un porcentaje del número de formas adultas, huevos, ninfas y pupas presente en cada uno de las tres repeticiones de los genotipos evaluados en los tres estratos de la planta. De cada parte se examina una hoja al azar en cada muestreo por observación directa. De estas tres observaciones, posteriormente, se calcula un promedio que corresponde al dato obtenido para cada muestreo.

En general, para la evaluación del daño y población que ocasionan las especies *M. tanajoa*, *P. herreni* y *A. socialis* sobre los genotipos de *M. esculenta* y especies silvestres de *Manihot* fueron empleadas las escalas de población y daño definidas

por Bellotti y Kawano (1983) para ácaros, Castillo (1985) para piojos harinosos y Arias (1995) para *A. socialis*, las cuales usan rangos de uno a seis, donde uno indica ausencia de población y no daño; mientras seis indica muy alta población plaga y daño severo (Tablas 1, 2 y 3).

**Análisis estadístico.** Los valores promedios de daño e infestación, se sometieron a un análisis de normalidad (Kolmorov-Smirnov) y de homogeneidad de varianzas (Levene). En aquellos casos en que los datos no fueron homogéneos se realizó transformación de raíz cuadrada y se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía para determinar si existían diferencias significativas para cada variable. Cuando se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

### Resultados y Discusión

***Mononychellus tanajoa*.** El análisis comparativo mostró que existen diferencias significativas en el nivel de infestación y daño de *M. tanajoa* entre los genotipos evaluados ( $F_{11,132} = 29,86$ ,  $F_{11,132} = 66,72$ ;  $P < 0.05$ ). En el análisis de la variable infestación, el genotipo de *M. flabellifolia* (444-002) difiere de los genotipos de *M. esculenta*, pero no difiere de uno de los dos genotipos de *M. peruviana* MPER 417-005 (Tukey  $P < 0.05$ ). No se presentaron diferencias significativas entre los

dos genotipos de *M. peruviana*, pero estos si difirieron al ser comparados con los de *M. esculenta*. Dentro de los genotipos de *M. esculenta* estudiados no se presentaron diferencias significativas.

La infestación de *M. tanajoa* para los genotipos de *M. esculenta* (CMC-40 y MECU-72) fue alta (cinco y seis), mostrando mucha susceptibilidad a la infestación por el ácaro (Fig. 1). Los tres genotipos silvestres MFLA (444-002) de *M. flabellifolia* y MPER (417-0003, MPER 417-005 de *M. peruviana*) presentaron valores de infestación entre uno y tres lo cual sugiere que son hospederos de menor preferencia por este ácaro, siendo *M. flabellifolia* (MFLA 444-002) el hospedero menos conveniente.

Por otro lado, se presentaron diferencias significativas para la variable daño debidas en gran parte al genotipo de *M. flabellifolia* (MFLA 444-002) el cual difiere de todos los genotipos de *M. esculenta* (CMC-40, MECU-72), pero fue similar a los de *M. peruviana* (MPER 417-003 y MPER 417-005) (Tukey  $P < 0.05$ ). Estos últimos no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero si, cuando fueron comparados con los de *M. esculenta*. Así mismo, entre los genotipos de *M. esculenta* no se presentaron diferencias significativas.

Los resultados mostraron que todos los genotipos de *M. esculenta* fueron altamente susceptibles ya que presentaron valores entre cinco y seis en la escala de daño, mientras que el genotipo MFLA 444-002 presentó el más bajo nivel de daño

**Tabla 1.** Escalas infestación para todos los estados biológicos de *M. tanajoa* en yuca (Modificada de Bellotti y Kawano 1983).

Escala de población (huevos, ninfas y adultos)	
1 =	No ácaros
2 =	Ácaros en el cogollo
3 =	Algunos ácaros en el cogollo y Hojas medias
4 =	Muchos ácaros en cogollo
5 =	Cogollo y hojas medias Totalmente infestadas de ácaros
6 =	Totalidad de hojas severamente infestadas de ácaros, también el tallo
Escala de daño	
1 =	Sin daño
2 =	Algunas puntuaciones blanco-amarillentas base hojas del cogollo
3 =	Puntuaciones amarillas moderadas en todas las hojas
4 =	Puntuaciones abundantes hojas medias, ligera deformación del cogollo
5 =	Severa deformación hojas del cogollo, apariencia blanquecina y defoliación. Tallo con puntuaciones amarillas
6 =	Cogollos reducidos o muertos, desecación y defoliación de hojas superiores. Severas puntuaciones amarillas en tallo

**Tabla 2.** Escalas de infestación para todos los estados biológicos de *P. herreni* en yuca (Modificada de Castillo 1985).

Escala de Población	
1	Sin piojo
2	Ninfas en hojas apicales y unas pocas en hojas basales
3	Ninfas y adultos en hojas apicales
4	Ninfas, adultos y ovisacos en hojas apicales y tallo hacia el cogollo
5	Todos los estados en hojas apicales y medias. Ninfas y ovisacos en el tallo
6	Presencia de ninfas, adultos, y ovisacos en toda la planta
Escala de daño	
1	Ningún daño
2	Pequeñas ondulaciones en márgenes de hojas apicales y basales
3	Leve encrespamiento y puede haber amarillamiento de hojas apicales
4	Encrespamiento y amarillamiento de hojas apicales. Pueden estar agrupadas (repollo). Meristemo apical no restringido
5	Necrosis y muerte de hojas apicales. Meristemo apical puede estar restringido. Tallo doblado hacia el cogollo
6	Desecamiento de hojas y defoliación. Tallo muerto o fuertemente doblado

**Tabla 3.** Escala de síntomas de daño (arriba) e infestación (abajo) ocasionado por *A. socialis* en yuca (Arias 1995).

Grado daño	Síntoma de la planta
1	No daño
2	Ligera flacidez de las hojas del cogollo; todavía verdes.
3	Iniciación de encrespamiento del borde de las hojas hacia arriba y abajo.
4	Encrespamiento de las hojas, moteado verde-amarillento en el cogollo y hojas medias. Exudado azucarado.
5	Fumagina, algunas hojas secas y tallos delgados. Volcamiento y rebrotes.
6	Planta muerta.

Grado	Población (%): Huevos, ninfas, pupas y adultos
1	0 estados de mosca blanca
2	1-200 individuos por hoja de yuca
3	201-500 por hoja
4	501-2000 por hoja
5	2001-4000 por hoja
6	> 4000 por hoja

(2.33), seguido de los genotipos de *M. peruviana* MPER 417-003 y MPER 417-005 con valores de tres, sugiriendo menor susceptibilidad de estos tres genotipos con respecto a los niveles de daño (Fig. 2).

Los resultados en la variable infestación fueron consistentes con el daño de *M. tanajoa*. Sin embargo, aunque los datos para la variable daño en los genotipos silvestres los clasificaron como resistentes, los promedios de infestación dejan ver que más que resistencia lo que hay son niveles de tolerancia.

***Phenacoccus herreni*.** Hubo diferencias significativas entre los genotipos evaluados para *P. herreni* en cuanto al nivel de infestación y daño ( $F_{11,204} = 8,24$  y  $F_{11,204} = 2,83$ ;  $P < 0,005$ ). Para la variable infestación se encontró que MPER 417-003 tiene diferencias significativas con todos los genotipos evaluados a excepción de MFLA 444-002 (Tukey  $P < 0,05$ ). Nuevamente existen diferencias entre los dos genotipos de *M. peruviana* estudiados.

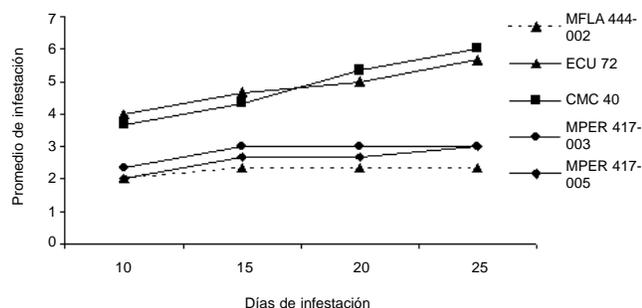
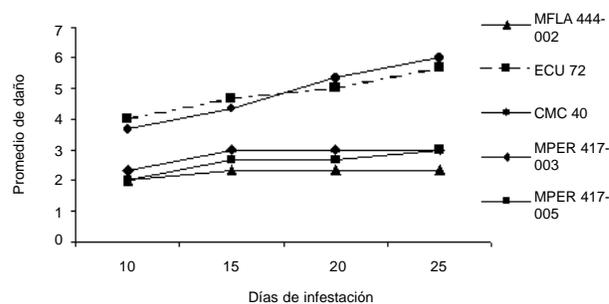
Los resultados de la variable infestación para *P. herreni* conformaron dos grupos (Fig. 3). Un grupo conformado por los genotipos MPER 417-003, MFLA 444-002 con bajos niveles de infestación (dos y tres) lo cual los clasifica como resistentes. En el otro grupo, los genotipos presentaron altos grados de infestación (susceptibles). En contraste con el otro genotipo de *M. peruviana*, el genotipo MPER 417-005, presentó un alto nivel de infestación (> 3) que lo identifica como susceptible.

La variable daño para los distintos genotipos de *Manihot* infestados con *P. herreni*, permiten concluir que al igual que

para ácaros, todos los genotipos de *M. esculenta* son hospederos convenientes para el piojo harinoso (altamente susceptibles), mientras que el genotipo MPER 417-003 presentó los más bajos niveles de daño, sugiriendo ser un hospedero no conveniente (resistentes) para *P. herreni* (Fig. 4). No obstante, es importante destacar que MPER 417-005, a pesar de ser un genotipo de la misma especie que el anteriormente mencionado (*M. peruviana*), exhibió niveles relativamente altos de daño, indicando que pueden existir variaciones intra e ínter específicas. Estos resultados sugieren, evaluar un mayor número de genotipos de cada especie.

El genotipo MFLA 444-002 para esta plaga presentó un grado intermedio de daño (3,66). La diferencia expresada entre el grado de daño y el de infestación cataloga a este genotipo como altamente susceptible, pues muestra que con poca infestación el daño es considerable. En síntesis, los resultados para el piojo harinoso *P. herreni*, mostraron que los genotipos MFLA 444-002 y MPER 417-003 presentan moderados niveles de daño, pero altos niveles de infestación. Estos valores sugieren altos niveles de tolerancia y se recomiendan posteriores evaluaciones.

***Aleurotrachellus socialis*.** El análisis comparativo mostró que existen diferencias significativas entre los genotipos con respecto a las variables, infestación y daño ( $F_{7,136} = 12,3$ ,  $F_{7,136} = 19,54$ ;  $P < 0,005$ ). Para la variable infestación no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos silvestres, pero sí al ser comparados con el genotipo MECU-72 y CMC-40 (Tukey  $P < 0,05$ ).

**Figura 1.** Promedios de infestación para genotipos de *Manihot* sp. infestados con *Mononychellus tanajoa* en 25 días de muestreo.**Figura 2.** Promedios de daño para genotipos de *Manihot* sp. infestados con *Mononychellus tanajoa* en 25 días de muestreo.

Las diferencias en los valores de infestación formaron para esta variable tres grupos (Fig. 5). Uno conformado por los tres genotipos silvestres MPER 417-003, MPER 417-005 y MFLA 444-002, con un promedio de infestación en la escala de uno que corresponde a un nivel alto de resistencia. Un segundo grupo correspondiente a MECU-72 con un promedio de infestación (tres y cuatro) que lo califica en un nivel medio de resistencia y, finalmente, un tercero conformado por CMC-40 con un alto nivel de susceptibilidad.

Los datos el grado de infestación para *A. socialis*, sugiere que para la mosca blanca los genotipos silvestres presentan niveles de resistencia. MECU-72 presentó niveles de tolerancia, pues poseen resistencia al nivel de daño pero un nivel medio para infestación y un porcentaje relativamente alto de colonización de *A. socialis*. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Bellotti y Vargas (1986), los cuales proponen a MECU-72 como un genotipo tolerante a *A. socialis*. El genotipo CMC-40 presentó altos niveles de susceptibilidad. Este resultado concuerda con lo esperado para CMC-40, genotipo sobre el cual se encuentra la colonia de *A. socialis* establecida en CIAT.

El análisis de postanova para la variable daño mostró que entre los tres genotipos silvestres (MFLA 444-002, MPER 417-003 y MPER 417-005), no se presentan diferencias significativas, pero sí entre ellos y los genotipos de *M. esculenta*. Así mismo, MFLA 444-002 difirió significativamente de CMC-40. Los dos genotipos de *M. peruviana* fueron similares entre sí, pero si difieren de CMC-40. El genotipo MECU-72 no difirió de ninguno de los genotipos silvestres, pero sí de CMC 40 (Tukey  $P < 0.05$ ).

Los valores de daño para los distintos genotipos de *M. esculenta* y especies de *Manihot* infestados con *A. socialis* conformaron dos grupos para esta variable (Fig. 6). Uno

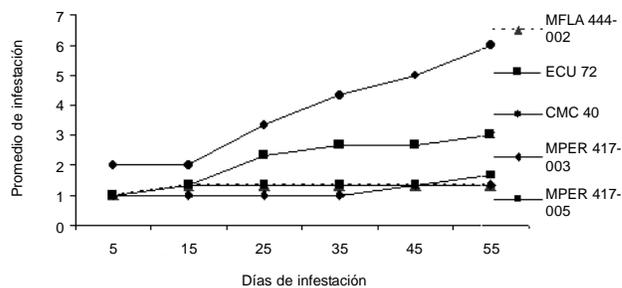


Figura 5. Promedios de infestación para genotipos de *Manihot* sp. infestados con *Aleurotrachelus socialis* en 55 días de muestreo.

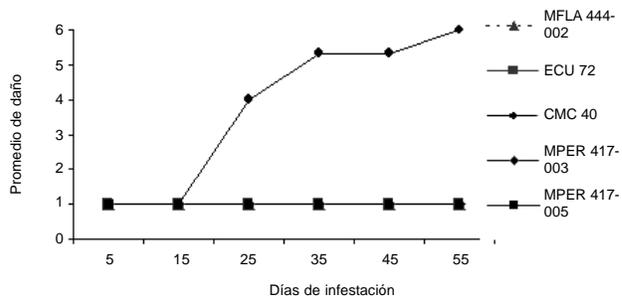


Figura 6. Promedios de daño para genotipos de *Manihot* sp. infestados con *Aleurotrachelus socialis* en 55 días de muestreo.

formado por las especies silvestres (MPER 417-003, MPER 417-005 y MFLA 444-002) y ECU 72 con un daño en escala (< 2) que corresponde a niveles importantes de resistencia a la mosca blanca. Un segundo grupo formado por el genotipo CMC 40 con valores de daño (cinco y seis) valor que lo clasifica como un hospedero altamente susceptible a *A. socialis*.

### Conclusiones

En términos generales, se presentaron diferencias entre los genotipos de *Manihot esculenta* y sus parientes silvestres evaluados en este estudio, con respecto a la resistencia a las tres plagas estudiadas. Estas diferencias podrían explicarse filogenéticamente por el concepto de acervos genéticos. Roa (1997) encontró que tanto por métodos de diferenciación morfológica como molecular, se evidencia una estrecha cercanía entre las poblaciones silvestres brasileiras de *M. esculenta* ssp. *flabellifolia*, *M. esculenta* ssp. *peruviana* y los cultivares de *M. esculenta*. Así mismo, propuso que estas dos especies poseen una mayor proporción de diversidad genética con respecto a las poblaciones de *M. esculenta*. Esta diversidad genética podría proveerle a las especies silvestres una mayor capacidad de defensa contra las plagas de cultivo lo cual sería consecuente con lo encontrado en el presente estudio.

Desde el punto de vista genético, la resistencia que se presenta en los genotipos de yuca y sus parientes silvestres es probablemente heredada multigenéticamente y de tipo horizontal o de campo. Investigaciones recientes indican que no hay inmunidad, excepto para *Spaceloma manihoticola*. Existe resistencia a la mayoría de los insectos y enfermedades a niveles bajos e intermedios (Bellotti y Kawano 1983) en los cultivares existentes.

El germoplasma es evaluado para determinar resistencia a diferentes plagas y para identificar y seleccionar poblaciones

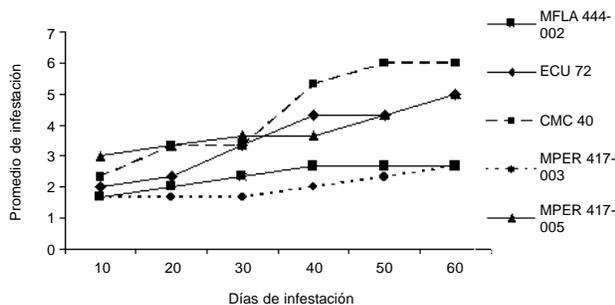


Figura 3. Promedios de infestación para genotipos de *Manihot* sp. infestados con *P. herreni* en 60 días de muestreo.

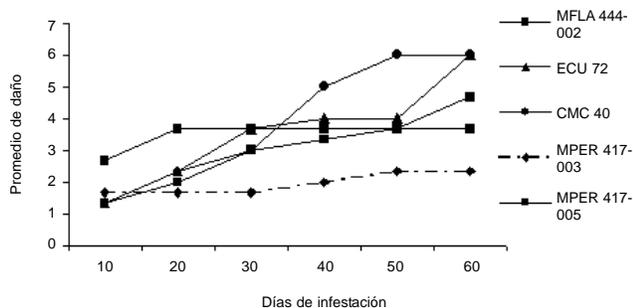


Figura 4. Promedios de daño para genotipos de *Manihot* sp. infestados con *P. herreni* en 60 días de muestreo.

resistentes. Posiblemente altos niveles de resistencia no pueden encontrarse en una sola variedad. Si diferentes genes de efecto aditivo están involucrados, cruces entre genotipos pueden incrementar el nivel de resistencia. Una vez que la resistencia ha sido identificada para diferentes plagas, los genotipos pueden ser cruzados, para un aumento de resistencia si es necesaria. Adicionalmente, los niveles de resistencia encontrados en las especies silvestres *M. flabellifolia* y *M. peruviana*, posibilitaran en un futuro cercano, con la ayuda de las herramientas moleculares, combinar genes de resistencia a *M. tanajoa*, *P. herreni* y *A. socialis* dentro de variedades comerciales.

### Literatura citada

- ARIAS, B. 1995. Estudio sobre el comportamiento de la "Mosca Blanca" *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) en diferentes clones de yuca *Manihot esculenta* Crantz. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Palmira-Colombia. 181 p.
- ARIAS, B.; GUERRERO, J. M. 2000. Control de plagas de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por resistencia varietal. Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN. Memorias XXVII Congreso Medellín - Colombia, Julio 26-28, pp. 243-259.
- BELLOTTI, A. C.; KAWANO, K. 1983. Mejoramiento para resistencia varietal en el cultivo de la yuca. En: Domínguez, C. Yuca: Investigación, producción y utilización. CIAT, Cali, Colombia. 171- 193 p.
- BELLOTTI, A. C.; VARGAS, O. 1986. Mosca Blanca del cultivo de yuca: Biología y Control. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Serie: 04SC-04.05. 34 p.
- BELLOTTI, A. C.; REYES, J. A.; VARELA, A. M. 1993. Observaciones de los piojos harinosos de la yuca en las Américas; su biología, ecología y enemigos naturales, pp. 313-337. En: Domínguez, C. Yuca: Investigación, producción y utilización. CIAT, Cali, Colombia.
- BELLOTTI, A. C.; BRAUN, A. R.; ARIAS, B.; CASTILLO, J. A.; GUERRERO, J. M. 1994. Origin and management of neotropical cassava arthropod pests. African Crop Science Journal 2(4): 407-417.
- BELLOTTI, A. C. SMITH, L.; LAPOINTE, S. L. 1999. Recent advances in cassava pest management. Annual Review of Entomology 44: 343-370.
- CASTILLO, J. A. 1985. Informe de las investigaciones realizadas por el CIAT entre 1976 y 1985 sobre *Phenacoccus gossypii* y *P. herreni* dos especies de piojos harinosos plagas en los cultivos de yuca, proyectos futuros. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia. 18 p.
- CIAT, 1986. Mosca blanca en el cultivo de la yuca: biología y control. Serie 045C-0405. Audiotutorial. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 34 p.
- CIAT, 2004. Annual report: Integrated pest and disease management in major agroecosystems. CIAT, Cali, Colombia. 12-95 p.
- COCK, J. H. 1985. Cassava; New potential for a neglected crop. Boulder: Westview Press, 191 p.
- FAO y FIDA. (Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola/ Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) 2000. La economía mundial de la yuca: hechos, tendencias y perspectivas. Italia 59 p.
- LENIS, J. I.; BRAUN, R.; MESA, N.; DUQUE, M. 1993. Uso de escalas para la estimación de poblaciones de ácaros *Tetranychidae* en cultivos de yuca. p 139-172. En: Braun, R. Bases fundamentales para investigación sobre los ácaros plagas y sus enemigos naturales en el Ecuador. CIAT, Cali-Colombia.
- PANDA, N.; KHUSH, G. S. 1995. Host plant resistance to insects. International Rice Research Institute, Philippines. 431 p.
- ROA, A. C. 1997. Estimación de la diversidad genética en *Manihot* sp. mediante marcadores moleculares. Tesis de magíster en Ciencias, Biología. Universidad del Valle, Cali, Colombia. 112 p.
- ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. 1973. *Manihot*, *Manihotoides* (Euphorbiaceae), Flora Neotropica, Monograph 13. New York, Hafner Press.
- SKOVGARD, H.; TOMKIEVWICZ, J.; NACHMAN, G.; MUNSTER -SWENDSEN, M. 1993. The effect of the cassava green mite *Mononychellus tanajoa* on the growth and yield of cassava *Manihot esculenta* in a seasonally dry area in Kenya. Experimental Applied Acarology 17: 41-58.
- SMITH, C. M. 1989. Plant resistance to insects: A fundamental approach. John Wiley and Sons, New York. 286 p.
- VARGAS, O.; BELLOTTI, A.C. 1981. Pérdidas en rendimiento causadas por moscas blancas en el cultivo de la yuca. *Revista Colombiana de Entomología* 7: 13-20.

Recibido: 16-ene-2006 • Aceptado: 7-ago-2007

## Efecto de un bioplaguicida sobre algunos parámetros poblacionales del depredador *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae)

Effect of a biopesticide on some population parameters of the predator  
*Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae)

RICARDO PÉREZ<sup>1</sup>, JAVIER GARCÍA-GONZÁLEZ<sup>2</sup>, ALBA MARINA COTES<sup>3</sup>

**Resumen:** En el diseño de programas de manejo integrado de plagas, un aspecto importante es determinar la compatibilidad entre los diferentes agentes de control, por ejemplo entre los hongos entomopatógenos y los insectos benéficos que se utilicen para el control de un mismo insecto plaga. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de un bioplaguicida con base en el hongo *Lecanicillium lecanii*, entomopatógeno de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*, sobre algunos parámetros de la población del depredador *Delphastus pusillus*. Mediante ensayos en laboratorio, se evaluó el efecto de la aplicación directa del bioplaguicida en la supervivencia del estado adulto del depredador. En un segundo experimento, se construyó la tabla del vida del depredador para dos tratamientos: 1. Control, una cohorte de individuos alimentados con presas sanas 2. Seguimiento de una cohorte alimentada con presas donde previamente se aplicó el bioplaguicida. En la prueba de aplicación directa, se determinó que el bioplaguicida a la concentración recomendada para el control de moscas blanca, ocasionó una mortalidad del 9,8% sobre los depredadores. En el experimento de la tabla de vida, los resultados mostraron que la cohorte de *D. pusillus* tratada con el bioplaguicida presentó una reducción significativa en la longevidad (49,0%) y en la fecundidad (91,4%), con respecto al control. Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación del bioplaguicida podría tener un efecto moderado a través de su acción directa y efectos indirectos negativos de importancia sobre las poblaciones de *D. pusillus*.

**Palabras clave:** Compatibilidad. Entomopatógeno. *Lecanicillium lecanii*. Tabla de vida. *Trialeurodes vaporariorum*.

**Abstract:** In the design of pest management programs, an important aspect is to determine the compatibility between different control agents, for instance, between entomopathogenic fungi and the beneficial insects used for control of the same insect pest. Therefore the aim of this study was to establish the effect of a biopesticide based on the fungus *Lecanicillium lecanii*, an entomopathogen of the whitefly *Trialeurodes vaporariorum*, on some population parameters of the predator *Delphastus pusillus*. Through laboratory assays, we evaluated the effect of direct application of the biopesticide on survival of the adult stage of the predator. In a second experiment, life tables were constructed for the predator under two treatments: 1. Control, cohort of individuals fed healthy prey. 2. Cohort fed prey previously exposed to the biopesticide. In the direct application assay, it was determined that the biopesticide at the concentration recommended for whitefly control caused a mortality of 9.8% on the predators. In the life table experiment, results showed that the cohort of *D. pusillus* treated with the bioinsecticide had a significant reduction in longevity (49.0%) and fecundity (91.4%), with respect to the control. The results obtained suggest that application of the biopesticide could have moderate direct effects and important indirect effects on populations of *D. pusillus*.

**Key words:** Compatibility. Entomopathogen. *Lecanicillium lecanii*. Life table. *Trialeurodes vaporariorum*.

### Introducción

La mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) (Hemiptera: Aleyrodidae), es una plaga de importancia económica debido a su amplia distribución geográfica, al daño que ocasiona y al gran número de cultivos que afecta. En Colombia, cultivos como el tomate, habichuela, fríjol y flores son gravemente afectados por esta plaga, fundamentalmente debido al daño mecánico y a la excreción de melazas (Byrne *et al.* 1990; Rodríguez *et al.* 1996).

Durante años, se ha empleado una amplia variedad de insecticidas para el control de *T. vaporariorum*, muchos de los cuales producen una marcada influencia negativa sobre los organismos benéficos que coexisten con la plaga. La gran capacidad para desarrollar resistencia a los plaguicidas

empleados para su control, así como problemas de contaminación ambiental, de seguridad y salud pública inherentes al uso inadecuado e indiscriminado de los agroquímicos, han conducido a la búsqueda y desarrollo de alternativas para el manejo de la plaga (Rodríguez y Cardona 2001; Torres *et al.* 2003).

En este contexto, el desarrollo y aplicación de agentes de control biológico, adquiere importancia relevante como alternativa ambiental segura para el manejo de la plaga, ya que son componentes naturales del ambiente y usualmente son más selectivos que los plaguicidas químicos. De los tres principales grupos de enemigos naturales de la mosca blanca, parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos, es en estos últimos donde quizá existen las mejores perspectivas para su uso con éxito en planes de manejo integrado. Esto debido a características específicas y a la tecnología desarrollada en

<sup>1</sup> Biólogo, Universidad Nacional de Colombia. ricardo\_perez\_alvarez@yahoo.com

<sup>2</sup> Autor para correspondencia: M. Sc. Entomología. Investigador Master Asistente, Área de Entomología, Programa de Investigación en Manejo Integrado de Plagas MIP. C. I., Tibaitatá. Corpoica. javiggonzalez@yahoo.com

<sup>3</sup> Ph. D. Investigador principal. Laboratorio de Control biológico. C. I., Tibaitatá. Corpoica. acotes@corpoica.org.co

métodos de producción masiva del inóculo, facilidad de la formulación y forma de aplicación similar a la de los insecticidas químicos, lo cual le da ventajas a la adopción por parte de los agricultores (López-Ávila 1994). En consecuencia, el desarrollo de bioplaguicidas con base en hongos entomopatógenos ha tenido una gran aceptación en los últimos años, con lo cual, ha habido un gran auge en su comercialización (Zambrano *et al.* 2002).

No obstante, la introducción de cualquier organismo en el ambiente es a menudo un paso irreversible por lo que debe hacerse con cautela, para evitar que se convierta en una plaga por sí misma, interfiera con el funcionamiento natural de otros agentes de control de plagas o cause problemas en las especies no blanco, incluyendo al hombre y otros organismos. De ahí que, el uso seguro de los hongos en el control biológico debe ser considerada a todos los niveles, ya sean efectos directos e indirectos (Hajek y Goettel 2000; García *et al.* 2004).

Por otra parte, ha sido ampliamente reconocido que el empleo de un solo agente de control biológico no puede proveer una regulación suficiente o satisfactoria sobre las poblaciones plaga (Roselyne 2005; Liu y Stansly 1999). Pero cuando dos o más especies con propiedades reconocidas en el control biológico son seleccionadas para interactuar juntas, las deficiencias o limitaciones de las especies individuales podrían ser compensadas por otros miembros del gremio de enemigos naturales. Sin embargo, el desarrollo de una estrategia de control biológico efectiva, en la cual varios agentes sean integrados, requiere de un profundo conocimiento de sus interacciones.

En tal sentido, en el programa de manejo integrado de plagas de Corpoica se desarrolló un bioplaguicida con base en el hongo *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* (Zimm.) (Zare y Gams 2001), para el control de *T. vaporariorum*. Dicho producto ha demostrado ser promisorio en la regulación de las poblaciones de mosca blanca, alcanzando niveles superiores al 70% en el control de la plaga (Jiménez 2002).

Así mismo, se han adelantado estudios con el depredador de moscas blancas *Delphastus pusillus* (Le Conte, 1852) (Coleoptera: Coccinellidae), con miras a su utilización dentro de una estrategia de manejo integrado de la plaga. Este enemigo natural se encuentra distribuido en la mayoría de las regiones agrícolas del país, consumiendo estados inmaduros de la mosca blanca (López-Ávila *et al.* 2001). Ciertas características de *D. pusillus* soportan su potencial como agente de control de *T. vaporariorum*: a) Altas tasas de consumo de presas (García-González 2003; Heinz y Parrella 1994; Hoelmer *et al.* 1993); b) Hembras altamente fecundas (Heinz *et al.* 1994; García-González *et al.* 2005); c) Compatibilidad con parasitoides y cultivares de plantas resistentes (Heinz y Parrella 1994; Heinz y Zalom 1996; Hoelmer *et al.* 1994) y, d) Alta adaptabilidad ecológica, frecuencia y abundancia en campo (López-Ávila *et al.* 2001).

A la fecha, se tiene conocimiento de la interacción que hay entre el bioplaguicida y la plaga y además se ha explorado la interacción entre *T. vaporariorum* y el depredador *D. pusillus*. Sin embargo, se desconoce la interacción entre el entomopatógeno y el depredador. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos directos e indirectos producidos por el bioplaguicida sobre los parámetros biológicos y demográficos de *D. pusillus*. Con este trabajo se intenta generar información que permita conducir a la utilización óptima y eficiente de estos enemigos naturales en el control de *T. vaporariorum*.

## Materiales y Métodos

El trabajo se llevó a cabo en el centro de investigación “Tibaitatá” de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica–, localizado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca). El mantenimiento de las colonias de los insectos *T. vaporariorum* y *D. pusillus* y la fase experimental se realizaron en los laboratorios e invernaderos del Programa de Manejo Integrado de Plagas de dicho centro.

**Colonias de insectos.** Una colonia de *T. vaporariorum* se mantuvo en condiciones de invernadero sobre plantas de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L., 1753) variedad ICA- Pijao sembradas en materas. En estas plantas se obtuvieron los diferentes estados de la mosca blanca, los cuales sirvieron de alimento al insecto depredador en el proceso de cría y en los experimentos propuestos.

La colonia de *D. pusillus* se inició con adultos colectados en cultivos de algodón (*Gossypium hirsutum* L., 1763) del municipio de Espinal (Tolima). Estos adultos se ubicaron por parejas en cajas de Petri que contenían papel-toalla humedecido y trozos de hojas de fríjol infestadas con estados inmaduros de la mosca blanca. Las hojas se renovaron periódicamente, con el fin de retirar las posibles posturas así como para proporcionarle alimento fresco a las parejas de adultos. Una vez emergidas las larvas del depredador, se separaron y se ubicaron en nuevas cajas de Petri hasta que alcanzaron el estado adulto. Con los adultos se continuó el ciclo de vida del depredador. La cría de *D. pusillus* se mantuvo a  $21 \pm 4^\circ\text{C}$ , 50-70% H. R. y un fotoperíodo de 14:10 h (luz: oscuridad).

**Bioplaguicida.** La producción del bioplaguicida se realizó en el laboratorio de control biológico de Corpoica según metodología estandarizada por Villamizar y Cotes (2006). El bioplaguicida consiste en un polvo mojable diseñado para reconstituirse en la emulsión resultante de la mezcla de una base autoemulsificable y agua. Dentro del polvo se encuentran los conidios del hongo entomopatógeno, que se aplica para el control de *T. vaporariorum* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml. Por su parte, la base autoemulsificable contiene una mezcla de aceite vegetal (80%), un agente emulgente (10%) y una mezcla de tensioactivos (10%), todos ellos comúnmente empleados en la industria cosmética y de alimentos. Para garantizar la estabilidad de la emulsión, la base autoemulsificable y el agua se combinan en relación 1:200 (v/v) respectivamente, independiente de la concentración del entomopatógeno. En su composición el bioplaguicida también incluye un protector solar que absorbe la luz UV y adherentes que le proporcionan protección en el momento de su aplicación en campo.

## Bioensayos

**Efecto del bioplaguicida en la supervivencia de adultos de *D. pusillus*.** Los insectos depredadores provenían de la colonia establecida en laboratorio, donde se seleccionaron individuos activos, sanos y de la misma edad para garantizar la homogeneidad del material biológico.

Inicialmente se tomaron foliolos de fríjol que se dispusieron individualmente en cajas de Petri de 10 cm de diámetro y sobre cada uno de éstos se ubicaron diez adultos de *D. pusillus*. Posteriormente, en cada caja de Petri se realizó la aplicación

del bioplaguicida con un microaspersor, a razón de 1 ml de producto por foliolo y a una presión de 4,22 kg/cm<sup>2</sup>. Una hora después de la aplicación, los insectos se transfirieron a una nueva caja de Petri donde se les suministraron foliolos infestados con ninfas de mosca blanca. Los insectos permanecieron bajo condiciones controladas (20 ± 5°C; 50-60% H. R., y 12 horas luz) donde se renovó periódicamente el alimento. Durante 12 días se registró diariamente la mortalidad de los insectos y los individuos muertos se ubicaron en cámaras húmedas con el propósito de hacer evidente la posible infección por el entomopatógeno.

Mediante un diseño completamente aleatorio se evaluaron cuatro tratamientos que consistieron en la aplicación del bioplaguicida a las concentraciones de 1x10<sup>7</sup> y 1x10<sup>8</sup> conidios/ml (una y diez veces la concentración aplicada en campo, respectivamente), la aplicación de la base autoemulsificable sin el ingrediente activo y un testigo donde se aplicó agua destilada. Cada tratamiento se realizó por triplicado empleando diez insectos por réplica.

**Efecto del bioplaguicida sobre los parámetros biológicos y demográficos de *D. pusillus*.** Se construyeron tablas de vida para dos cohortes del depredador, cada una de ellas de 30 adultos (15 hembras y 15 machos) provenientes de una tercera generación de la colonia establecida en laboratorio. Las parejas de depredadores se ubicaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro, que en su interior contenían una capa de agar-agua al 5% y sobre ella foliolos de fríjol infestados con ninfas de mosca blanca. Los foliolos se renovaron cada tres días con el fin de retirar las nuevas posturas y proporcionarle nuevo alimento al depredador. Cuando se observó la emergencia de las larvas, éstas se ubicaron en nuevas unidades de cría donde se les suministraron presas hasta que completaron su desarrollo. En los casos donde el macho murió antes que la hembra, éste fue sustituido por otro macho.

Se consideraron dos tratamientos: 1. Seguimiento de una cohorte de individuos alimentados con ninfas sanas, empleado como control y 2. Seguimiento de una cohorte alimentada con ninfas a las que previamente (24 h) se les aplicó el bioplaguicida a la concentración de 1x10<sup>7</sup> conidios/ml.

En cada uno de los tratamientos se realizó el seguimiento periódico de los adultos sometidos a experimentación, al igual que a la cohorte de huevos que resultaron de las posturas de las parejas de depredadores. En cada tratamiento se registraron las siguientes variables: tiempo de preoviposición (intervalo entre la emergencia del adulto y la colocación de la primera postura), período de oviposición (número de días entre la primera y la última postura), longevidad de la hembra y fecundidad. A partir de estos registros se estimaron los parámetros de la población: tasa neta reproductiva ( $R_0$ ), tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r$ ), tasa finita de crecimiento ( $\bar{\epsilon}$ ), tiempo generacional ( $T_g$ ) y tiempo de duplicación de la población inicial ( $D_t$ ).

**Análisis de la información.** En la prueba de aplicación directa, los porcentajes de mortalidad luego de 12 días de evaluación se corrigieron por medio de la fórmula de Abbott (Villamizar y Cotes 2003) y los datos generados se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

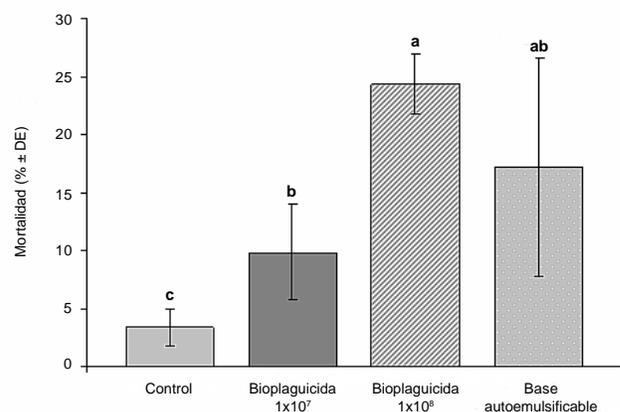
En el experimento de la tabla de vida, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para cada una de las variables, con el fin de comprobar la normalidad de los datos. Los promedios de los

períodos de preoviposición, oviposición y la longevidad se transformaron con  $\text{Log}_{10}(x)$  para posteriormente analizarlos con un análisis de varianza de una vía. Debido a que los datos de fecundidad (huevos/hembra/día y huevos/hembra) no se comportaron como una normal, la comparación se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Estos análisis estadísticos se realizaron empleando el Software SAS versión 8 (SAS Institute 1999). Por su parte, los parámetros  $R_0$ ,  $r$ ,  $\lambda$ ,  $T_g$  y  $D_t$  se estimaron siguiendo los procedimientos propuestos por Rossing (2004).

## Resultados

**Aplicación directa del bioplaguicida sobre adultos de *D. pusillus*.** El análisis de varianza para la variable mortalidad determinó diferencias significativas entre los tratamientos ( $F = 6,12$ ; g. l. = 3, 8;  $P = 0,0038$ ). Los resultados mostraron que la aplicación del bioplaguicida a las concentraciones de 1x10<sup>7</sup> y 1x10<sup>8</sup> conidios/ml ocasionó mortalidades del 9,8 y del 24,3% respectivamente, que fueron significativamente diferentes a la registrada en el control, el cual mostró una mortalidad del 3,3%. En el tratamiento donde se aplicó la base autoemulsificable sin ingrediente activo se registró una mortalidad del 17,2%, valor que no presentó diferencias significativas con los tratamientos donde se aplicó el bioplaguicida, pero sí con el control (Fig. 1). En todos los casos, los individuos muertos no presentaron signos del entomopatógeno. Al ser ubicados en cámaras húmedas, en los cadáveres de los insectos no se observó desarrollo micelial.

**Efecto del bioplaguicida sobre parámetros biológicos de *D. pusillus*.** Los valores de los períodos de preoviposición y oviposición para las hembras de la cohorte control fueron significativamente diferentes a los registrados en la cohorte tratada con el bioplaguicida (preoviposición:  $F = 22,86$ ; g. l. = 1, 15;  $P = 0,0002$ ; oviposición:  $F = 13,49$ ; g. l. = 1, 15;  $P = 0,0023$ ). La cohorte control presentó un período de preoviposición y oviposición de 13,2 ± 5,0 y 55,2 ± 39,4 días respectivamente, mientras que en la cohorte tratada se estimaron valores de 36,7 ± 8,8 y 33,5 ± 13,9 días para los períodos de preoviposición y oviposición respectivamente (Tabla 1).



**Figura 1.** Porcentaje de mortalidad (media ± desviación estándar) de adultos de *D. pusillus* sometidos a la aplicación directa de un bioplaguicida con base en *L. lecanii*. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes a un  $P < 0,05$  (Prueba LSD).

Del mismo modo, la longevidad de las hembras de *D. pusillus* en la cohorte control, se registró como significativamente diferente de la longevidad de las hembras de la cohorte tratada con el bioplaguicida ( $F = 6,13$ ;  $g. l. = 1, 28$ ;  $P = 0,0190$ ). Las hembras del tratamiento control presentaron una longevidad promedio de  $64,7 \pm 44,0$  días, frente a un promedio de  $33,0 \pm 30,5$  días para las hembras de la cohorte tratada (Tabla 1).

En lo referente a la supervivencia se encontraron diferencias marcadas entre las cohortes evaluadas. En el tratamiento donde se aplicó el bioplaguicida, se observó una fuerte disminución de la supervivencia durante los primeros 22 días de vida de las hembras, donde la proporción de individuos vivos pasó de 1,0 a 0,22. Después del día 22, la probabilidad de hembras vivas presentó disminuciones progresivas con 0,17 hembras vivas el día 63, 0,11 hembras vivas en el día 95, hasta ser cero el día 98 de vida de las hembras (Fig. 2A).

En el tratamiento control, la reducción en la supervivencia fue más moderada en comparación a las hembras de la cohorte tratada. En los primeros 36 días, la probabilidad de vida de la cohorte control se redujo de 1,0 a 0,73. Posteriormente, se observó otra disminución en la supervivencia de la cohorte al pasar a una probabilidad de vida de 0,47 en el día 40 de emergencia de las hembras. A partir de esta fecha, la probabilidad de vida siguió reduciéndose a 0,33 hembras vivas en el día 92, 0,20 hembras vivas en el día 114, hasta el día 131 donde todas las hembras de la cohorte murieron (Fig. 2B).

Con respecto a la fecundidad, la cohorte tratada presentó una producción total de huevos significativamente menor que el control ( $P = 0,0001$ ), con un promedio de  $18,5 \pm 38,0$  huevos/hembra, frente a un promedio de  $216,2 \pm 246,6$  huevos/hembra en la cohorte control. De la misma forma, la cantidad de huevos puestos/hembra/día presentó diferencias significativas siendo su valor más alto en el control con respecto al tratamiento bioplaguicida ( $P = 0,0003$ ). La cohorte tratada presentó un promedio de  $0,62 \pm 1,4$  huevos puestos/hembra/día, mientras que el tratamiento control presentó un promedio de  $3,95 \pm 2,7$  huevos puestos/hembra/día (Tabla 1).

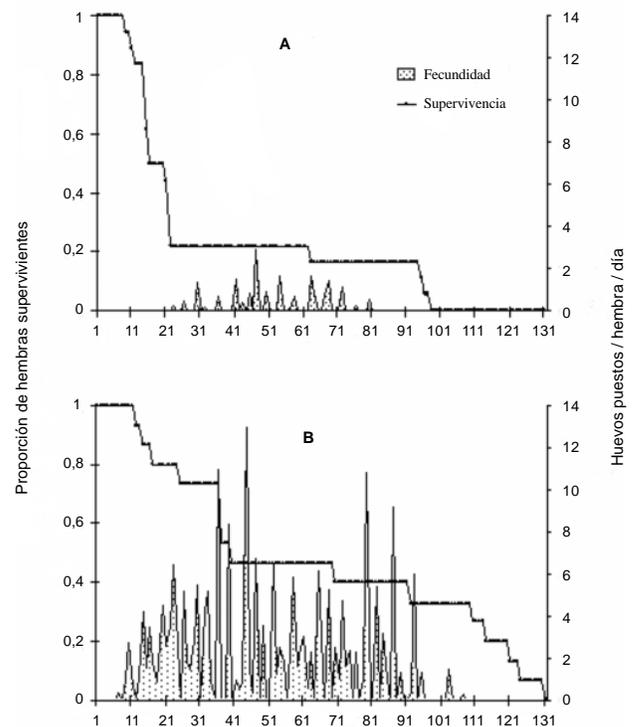
La oviposición hembra/día para la cohorte tratada mostró un pico de oviposición al día 47, con un promedio de 2,9 huevos/hembra/día (Fig. 2A). Para la cohorte control se registraron cuatro picos importantes de oviposición. Los dos primeros se presentaron en los días 36 y 44, con promedios de 10,9 y 12,9 huevos/hembra/día respectivamente. Los otros dos picos se observaron en los días 79 y 87, con promedios de 10,8 y de 9,2 huevos/hembra/día respectivamente (Fig. 2B).

**Efecto del bioplaguicida sobre parámetros demográficos de *D. pusillus*.** Los parámetros de la tabla de vida estimados para las dos poblaciones presentaron diferencias para las dos cohortes evaluadas. La tasa de reproducción neta ( $R_0$ ) para el

grupo control se estimó en 13,97 hembras hija/hembra y 3,34 hembras hija/hembra para la cohorte tratada. Estos valores indican que bajo condiciones normales, una hembra de *D. pusillus* es reemplazada aproximadamente por 14 hembras al cabo de una generación, pero cuando se aplica el bioplaguicida este valor se puede reducir aproximadamente a tres hembras.

De otro lado, la tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r_m$ ) para la población control se estimó en 0,0788 hembras/hembra/día y 0,0261 hembras/hembra/día para la cohorte tratada. Estos valores muestran que las dos poblaciones crecen, aunque la cohorte control lo hace con mayor celeridad. La tasa finita de multiplicación ( $\ddot{e}$ ) presentó valores similares en las dos poblaciones. La población control de *D. pusillus* se incrementó en 1,082 individuos por día, mientras que en la cohorte tratada correspondió a 1,026 individuos por día.

En cuanto al tiempo generacional ( $T_g$ ) y el tiempo de duplicación ( $D_t$ ), estos parámetros fueron mayores para la población expuesta a las ninfas infectadas por el bioplaguicida. El tiempo generacional en la cohorte control correspondió a 33,5 días, lo cual determina que desde que un huevo de *D.*



**Figura 2.** Supervivencia y fecundidad de las hembras de *D. pusillus* en las dos cohortes evaluadas. **A.** Cohorte tratada con el bioplaguicida **B.** Cohorte control.

**Tabla 1.** Duración de diferentes períodos, longevidad y fecundidad de las hembras de *D. pusillus* en las dos cohortes evaluadas.

Tratamiento	n	Duración de diferentes períodos (días)			No. de huevos por hembra	
		Pre-oviposición promedio $\pm$ DE <sup>a</sup>	Oviposición promedio $\pm$ DE	longevidad (días) promedio $\pm$ DE	por día promedio $\pm$ DE	total promedio $\pm$ DE
Control	15	13,2 $\pm$ 5,0**	55,2 $\pm$ 39,4**	64,7 $\pm$ 44,0*	3,95 $\pm$ 2,7**	216,2 $\pm$ 246,6**
Aplicación bioplaguicida	15	36,7 $\pm$ 8,8**	33,5 $\pm$ 13,9**	33,0 $\pm$ 30,5*	0,62 $\pm$ 1,4**	18,5 $\pm$ 38,0**

n = número de repeticiones. a = Desviación Estándar. \* Valores significativamente diferentes al nivel del 5%. \*\* Valores significativamente diferentes al 1%.

*pusillus* es puesto, se requiere de 33,5 días para que una hembra proveniente del mismo inicie su reproducción. Este valor es inferior al registrado para la cohorte tratada, donde se estimó un valor de 51,4 días. Por su parte, en el tratamiento control, *D. pusillus* requirió 8,8 días para duplicar su población, tiempo menor al estimado para el tratamiento donde se aplicó el bioplaguicida, que necesitó de 26,6 días para duplicar su población.

### Discusión y Conclusiones

Los resultados indican que la aplicación directa del bioplaguicida sobre el depredador *D. pusillus* produce un efecto moderado en su supervivencia. Sin embargo, en los insectos muertos no se evidenció la presencia del micelio típico o esporulación de *L. lecanii* cuando los individuos se ubicaron en cámaras húmedas.

No se puede desconocer que la mortalidad causada por *L. lecanii* sobre el huésped, lleva un componente bioquímico consistente en las toxinas (Claydon y Grove 1982). Éstas pueden producir la muerte del hospedero sin que se presenten síntomas evidentes de la acción del entomopatógeno (Kershaw *et al.* 1999). No obstante, la aplicación de toxinas de *L. lecanii* a la concentración efectiva contra mosca blanca, parecen ser completamente inofensivas para los adultos depredadores del género *Delphastus*. Así lo sugiere un estudio efectuado por Wang *et al.* (2005) quienes probaron el efecto de toxinas aisladas de *L. lecanii* sobre el depredador *Delphastus catalinae* (Horn, 1895) (Coleoptera: Coccinellidae). Dichos autores encontraron que las toxinas de *L. lecanii* aplicadas directamente sobre el integumento de los adultos depredadores, no afectan su supervivencia.

Una posible explicación a la mortalidad registrada, es que el efecto adverso sea originado por algunos de los excipientes de la formulación del bioplaguicida. El bioplaguicida está diseñado para reconstituirse en una base autoemulsificable que contiene una mezcla de aceites vegetales. En general, los aceites son preferidos para la formulación de los hongos empleados en el control de insectos (Moore y Caudwell 1997) debido a que facilitan la adhesión y dispersión de los conidios en el área blanco (Inglis *et al.* 2000; Wraight *et al.* 2001) mejorando la eficacia y rapidez del producto (Prior *et al.* 1988; Langewald *et al.* 1999). En virtud de estas propiedades, los aceites por sí mismos, se han registrado produciendo mortalidad sobre insectos, fundamentalmente a través de una acción física al bloquear el sistema respiratorio (espiráculos) y causando la asfixia de los individuos (Tavainier 2002). De acuerdo con ello, es posible que la aplicación del bioplaguicida genere taponamiento de los espiráculos de los adultos de *D. pusillus*, lo que se facilita por el tamaño del insecto (< 1,5mm de longitud).

Aunque dentro del análisis planteado se esperaba que la concentración del hongo entomopatógeno no tuviera un efecto en la supervivencia del depredador, se encontró que la aplicación del bioplaguicida a una mayor concentración del hongo (i.e.  $1 \times 10^8$  conidios/ml) sí ocasionó una mayor mortalidad. Este resultado no se podría explicar de forma certera, pero se plantea la posibilidad de que otros factores ajenos a la acción del bioplaguicida pudieran afectar al depredador, tales como diferencias en la presión de aplicación o en la densidad de cobertura (gotas / cm<sup>2</sup>) del bioplaguicida debido a una falla humana, o relacionado con la calibración del equipo empleado en la aplicación. Esto sugiere la necesidad

de realizar otras pruebas en laboratorio y campo para evaluar que otros factores pueden aumentar o disminuir la respuesta de los agentes involucrados en este estudio. Sin embargo, cabe resaltar que en todos los casos la muerte de los depredadores se presentó durante las primeras 24 h después de la aplicación y evidenciando una película formada por el bioplaguicida adherida al exoesqueleto de los individuos muertos. Estas observaciones también podrían ser un indicativo de que la muerte del depredador se produjo por una acción física del bioplaguicida, ya que se ha observado que *L. lecanii* requiere de un tiempo de entre tres a siete días para ejercer su acción (Wang *et al.* 2004).

Estos resultados podrían señalar que la aplicación directa del componente activo del bioplaguicida, es decir del hongo *L. lecanii*, no produce efectos adversos sobre el depredador. Lo anterior concuerda con estudios realizados por Osborne y Landa (1992), Steimberg y Prag (1994) y Wraight *et al.* (1998), quienes encontraron que los hongos entomopatógenos *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith 1957, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912 y *Aschersonia aleyrodis* Webber 1897, no ocasionaron efectos negativos sobre *D. pusillus*. Adicionalmente y en correspondencia con el planteamiento mencionado, Pachón y Cotes (1997) en el estudio realizado para evaluar el efecto de la cepa no formulada del bioplaguicida sobre el parasitoide de moscas blancas *Amitus fuscipennis* MacGown y Nebeker, 1978 (Hymenoptera: Platygasteridae), encontraron que el insecto benéfico no se vio afectado por la acción directa de *L. lecanii*.

Con respecto a los efectos del bioplaguicida sobre los parámetros biológicos y demográficos del depredador, los resultados de este estudio indican que la aplicación del bioplaguicida reduce la longevidad y el período de oviposición, incrementa el período de preoviposición, reduce drásticamente la fecundidad y en consecuencia afecta la tasa de crecimiento de la población de *D. pusillus*. Se plantean tres posibles hipótesis para explicar el efecto del bioplaguicida sobre los parámetros biológicos del depredador: (i) infección subletal del depredador a través del consumo de presas infectadas; (ii) disminución de la calidad y cantidad de presas consumidas; y (iii) percepción del depredador por la "calidad" del hábitat, la cual es determinada por la presencia de ninfas sanas.

El consumo de presas infectadas con *L. lecanii* podría haber ocasionado una infección subletal del depredador. En este sentido, se conoce que los hongos entomopatógenos normalmente invaden al insecto a través de la cutícula y no necesitan ser ingeridos para iniciar el proceso infectivo (Ferron 1978); sin embargo, existe evidencia que algunas especies de hongos entomopatógenos pueden infectar sus hospederos por el tracto alimenticio (Gabriel 1959; Proprawsky *et al.* 1998). Una vez adentro, el hongo entomopatógeno afecta a sus hospederos a través de una combinación de eventos que incluyen daño mecánico por el crecimiento de sus hifas, disminución de nutrientes y producción de toxinas. Alguno de estos procesos a un nivel subletal podría afectar negativamente el sistema reproductivo y supervivencia del hospedero. Así por ejemplo, el período de preoviposición para *D. pusillus* fue calculado en 13,2 días para la cohorte control. Durante este período, el primer grupo de huevos se está madurando dentro de las ovariolas de la hembra. Una infección fúngica iniciada en este momento y el resultante estrés fisiológico podrían interferir con el desarrollo de los huevos. A este respecto, algunos estudios han registrado hongos entomopatógenos de las especies *B. bassiana*, *Aspergillus ochraceus* Wilhelm,

1877 y *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883, como causantes de alteraciones en la fecundidad, y en los períodos de preoviposición y oviposición de sus hospederos (Hornbostel *et al.* 2004). Del mismo modo, Proprawsky *et al.* (1998) encontraron que el consumo de moscas blancas infectadas con *B. bassiana* tuvo un impacto negativo en la supervivencia del coccinélido depredador *Serangium parcesetosum* Sicard, 1929.

Los parámetros biológicos y demográficos del depredador también podrían ser alterados por la disminución en la cantidad y en la calidad de presas consumidas. El hongo entomopatógeno *L. lecanii* produce modificaciones físicas y fisiológicas sobre las ninfas de mosca blanca las cuales pueden interferir en el reconocimiento y detección de la presa por parte del depredador. Estudios preliminares mostraron que los adultos de *D. pusillus* presentaron una reducción en el consumo de presas entre el 38,2 y el 93,2% cuando se le suministraron presas infectadas con *L. lecanii*, respecto al consumo de presas sanas (R. Pérez, datos no publ.). De esta forma, una disminución en el consumo de presas por las hembras de *D. pusillus* se podría manifestar en la reducción de la fecundidad, puesto que una hembra grávida debe consumir más presas que ningún otro estado de desarrollo para sostener los niveles de oviposición (Sabelis 1985). Adicionalmente, las presas infectadas pueden ser nutricionalmente deficientes para el depredador o contener ciertos metabolitos secundarios producidos por el patógeno con propiedades tóxicas sobre el insecto benéfico. Así por ejemplo, Wang *et al.* (2005) demostraron que una concentración de 400 ppm de toxinas aisladas de cepas de *L. lecanii* redujo significativamente la capacidad de consumo, reproducción y longevidad de adultos de *D. catalinae*.

En cuanto a la percepción del depredador por la "calidad" del hábitat, García-González y López-Ávila (1998) observaron que la hembra de *D. pusillus* presenta diversos hábitos de oviposición que dependen de la cantidad y del estado de los individuos de la presa. Este comportamiento está relacionado con la disponibilidad de alimento para las larvas del depredador recién emergidas, las cuales salen en busca de presas. Si en el transcurso de 20 a 30 minutos no encuentran alimento, mueren. De esta forma, la hembra invertirá mayor esfuerzo reproductivo en áreas donde tiene una mayor probabilidad de que su descendencia sobreviva (García-González 2003). Es probable que las hembras de *D. pusillus* disminuyan la oviposición sobre los folíolos con ninfas infectadas, debido a la ausencia de reconocimiento de éstas como presas, ó al rechazo de las mismas. Evidencias similares son registradas por Meyling y Pell (2006), quienes encontraron que las hembras del depredador *Anthocoris nemorum* (L., 1761) (Heteroptera: Anthocoridae), disminuyen la oviposición en áreas tratadas con el entomopatógeno *B. bassiana*.

En función de los resultados, se podría decir que el bioplaguicida es un agente que potencialmente produce efectos perjudiciales sobre las poblaciones del depredador. No obstante, en condiciones de campo es de esperarse un menor impacto sobre el benéfico, lo cual puede ser explicado por varias razones. Primero, la mayor movilidad de los adultos del depredador en condiciones de campo podría reducir el riesgo derivado de la exposición directa al bioplaguicida, como ha sido demostrado para otros depredadores (Smith y Krischik 2000). Segundo, *D. pusillus* se alimenta principalmente del estado de huevo de la mosca blanca, mientras que el bioplaguicida infecta los estados ninfales de la plaga, por lo que se podría plantear liberaciones del insecto y aplicaciones

del hongo intercaladas en el tiempo (Fransen 1990; Liu y Stansly 1999; García-González 2003; Hoelmer *et al.* 1993). Tercero, estudios preliminares demostraron que *D. pusillus* presenta la habilidad de discriminar entre presas sanas e infectadas con *L. lecanii* (R. Pérez, datos no publ.), este comportamiento podría permitir la distribución de los coccinélidos en áreas no tratadas del cultivo, donde lograría encontrar mayor cantidad de presas sanas. Finalmente, las moscas blancas típicamente infestan cultivos de rápido crecimiento y prefieren las hojas jóvenes para ovipositar (Lenteren y Noldus 1990). La rápida aparición de nuevo follaje y de presas no tratadas podría facilitar la utilización del bioplaguicida junto con *D. pusillus*, en un programa para el control de la mosca blanca donde se involucren estos dos agentes biológicos.

### Agradecimientos

A la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN) por el apoyo otorgado al primer autor como ganador de la "Beca de incentivo a la investigación entomológica en las universidades colombianas", versión 2005. Este trabajo hace parte de los resultados del proyecto "Incorporación de un Bioplaguicida en el manejo integrado de la mosca blanca" financiado por COLCIENCIAS. Los autores del trabajo agradecen a esta entidad el apoyo financiero. A Jimena Sánchez, profesora de la Universidad Nacional de Colombia, por su invaluable apoyo científico.

### Literatura Citada

- BYRNE, D. N.; BELLOWS, T. S.; PARRELA, M. P. 1990. Whiteflies in agricultural systems, pp. 227-251. En: Gerling, D. (ed.). Whiteflies: Their bionomics, pest status and Management. Intercept, Ltd., Andover, Hants., UK. 348 p.
- CLAYDON, N.; GROVE, J. F. 1982. Insecticidal secondary metabolic products from the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. Journal of Invertebrate Pathology 40: 413-418.
- FERRON, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenic fungi. Annual Review of Entomology 23: 409-442.
- FRANSEN, J. 1990. Natural enemies of Whiteflies: Fungi, p. 187-211. En: Gerling, D. (ed.). Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Intercept, Ltd., Andover, Hants., UK. 348 p.
- GABRIEL, B. P. 1959. Fungus infection via alimentary tract. Journal of Insect Pathology 1: 319-330.
- GARCÍA, L.; GLEIBY, M.; MONTES DE OCA, N.; HIDALGO, L. 2004. Estudio de la irritación ocular y dérmica de *Polchonia chlamydosporia* var. Catanulata. Revista de Toxicología 12: 103-107.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, J. 2003. Estudio de los componentes de depredación para el sistema *Delphastus pusillus* (Le Conte) (Coleoptera: Coccinellidae) y su presa la mosca blanca de los invernaderos *Trialetrodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). Tesis de grado en M. Sc. en entomología Posgrado Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia. 108 p.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, J.; BENÍTEZ, E. R.; LÓPEZ-ÁVILA, A. 2005. Tabla de vida de *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) en la mosca blanca *Trialetrodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Revista Colombiana de Entomología 31 (2): 155-160.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, J.; LÓPEZ-ÁVILA, A. 1998. Biología y hábitos alimenticios de *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) depredador de moscas blancas. Revista Colombiana de Entomología 24 (3-4): 95-102.

- HAJEK, A. E.; GOETTEL, M. S. 2000. Guidelines for evaluating effects of entomopathogens on non-target organisms, p. 847-868. En: Lacey, L. A.; Kaya, H. K. (eds.). Manual of Field Techniques in Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Netherland. 492 p.
- HEINZ, K. M.; PARRELA, M. P. 1994. Biological control of *Bemisia argentifolii* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) infesting *Euphorbia pulcherrima*: evaluations of releases of *Encarsia luteola* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae). Environmental Entomology 88: 1494-1502.
- HEINZ, K. M.; BRAZZLE, J. R.; PICKETT, C. H.; NATWICK, E. T.; NELSON, J. M.; PARRELA, M. P. 1994. Predatory beetle may suppress silverleaf whitefly. California Agriculture 48 (2): 35-40.
- HEINZ, K. M.; ZALOM, F. G. 1996. Performance of the predator *Delphastus pusillus* on *Bemisia* resistant and susceptible tomato lines. Entomologia Experimentalis et Applicata 81: 345-352.
- HOELMER, K. A.; OSBORNE, L.; YOKOMI, R. 1993. Reproduction and feeding behavior of *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Journal of Economic Entomology 86 (2): 322-329.
- HOELMER, K. A.; OSBORNE, L. S.; YOKOMI, R. K. 1994. Interactions of the whitefly predator *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) with parasitized sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). Environmental Entomology 23 (1): 136-139.
- HORNBOSTEL, V. L.; OSTFELD, R. S.; ZHIOVA, E.; BENJAMIN, M. A. 2004. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on Engorged larval, Nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology 41 (5): 922-929.
- INGLIS, G. D.; IVIE, T. J.; DUKE, G. M.; GOETTEL, M. S. 2000. Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and Colorado potato beetle larvae. Biological Control 18: 55-64.
- JIMÉNEZ, L. G. 2002. Evaluación de técnicas de aplicación de un bioplaguicida a base de *Verticillium lecanii*, para el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* en un cultivo de frijol. Trabajo de grado Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia. 72 p.
- KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. 1999. The role of dextruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. Journal of Invertebrate Pathology 74: 213-233.
- LANGEWALD, J.; OUAMBAMA, Z.; MAMADOU, A.; PEVELING, R.; STOL, I.; BATEMAN, R.; ATTIGNON, S.; BLANDFORD, S.; ARTHURS, S.; LOWER, C.J. 1999. Comparison of an organophosphate insecticide with a mycoinsecticide for the control of *Oedaleus senegalensis* (Orthoptera: Acrididae) and other sahelian grasshopper at an operational scale. Biocontrol Science and Technology 9 (2): 199-214.
- LENTEREN, J. C.; NOLDUS, P. J. J. 1990. Whitefly-Plant Relationships: Behavioural and Ecological Aspects, pp. 47-88. En: Gerling, D. (ed.). Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Intercept, Ltd., Andover, Hants., UK. 348 p.
- LIU, T.-X.; STANSLY, P. A. 1999. Searching and feeding behaviour of *Nephaspis oculatus* and *Delphastus catalinae* (Coleoptera: Coccinellidae), predator of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). Environmental Entomology 28 (5): 901-906.
- LÓPEZ-ÁVILA, A. 1994. Avance y perspectivas del control biológico de las moscas blancas. p. 43-53. En: Manejo integrado de mosca blanca y técnicas de aplicación de pesticidas. Socolen, mayo 18. Bogotá. Colombia. 108 p.
- LÓPEZ-ÁVILA, A.; CARDONA, C.; GARCÍA, J.; RENDÓN, F.; HERNÁNDEZ, P. 2001. Reconocimiento e identificación de enemigos naturales de moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. Revista Colombiana de Entomología 27 (3-4): 137-141.
- MEYLING, N.; PELL, J. K. 2006. Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. Ecological Entomology 31: 162-171.
- MOORE, D.; CAUDWELL, R. W. 1997. Formulations of entomopathogens for the control of grasshoppers and locust. Memoirs of Entomological Society of Canada 171: 49-67.
- OSBORNE, L. S.; LANDA, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomologist 75 (4): 456-471.
- PACHÓN, M. P.; COTES, A. M. 1997. Efecto de *Verticillium lecanii* entomopatógono de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* sobre la actividad parasítica de *Amitus fuscipennis* en un cultivo de frijol. Revista Colombiana de Entomología 23 (3-4): 171-175.
- PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; Le PATOUREL, G. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Invertebrate Pathology 52: 66-72.
- PROPRAWSKY, T.; LEGASPI, J.C.; PARKER, P. 1998. Influence of entomopathogenic fungi on *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae), an important predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). Environmental Entomology 27 (3): 785-795.
- 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 (1-2): 21-26.
- RODRÍGUEZ, 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.
- ROSELYNE, L. 2005. Intraguild interactions of the greenhouse whitefly natural enemies, predator *Dicyphus hesperus*, pathogen *Beauveria bassiana* and parasitoid *Encarsia formosa*. Maîtrise en biologie végétale (M.Sc.). Faculté des sciences DE L'agriculture et DE L'alimentation. Université Laval. Québec. Canada. 99 p.
- ROSSING, W. H. A. 2004. IPM Technology: Crop growth and epidemiology, pp. 32-35. En: Memoirs training course "Integrated pest management and food safety", modulo IPM tools and Implementation. Wageningen. Netherlands. 65 p.
- SABELIS, M. W. 1985. Development, pp. 73-82. En: Helle, W.; Sabelis W. (eds.). Spider mites: Their biology, natural enemies and control. Vol. 1B. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 458 p.
- SAS INSTITUTE. 1999. SAS Language. Reference. Version 8. Sas Institute. Cary NC.
- SMITH, S. F.; KRISCHIK, V. A. 2000. Effects of biorational pesticides on four coccinellid species (Coleoptera: Coccinellidae) having potential as biological control agents in interiorscapes. Journal of Economic Entomology 93 (3): 732-736.
- STEIMBERG, S.; PRAG, H. 1994. Efficacy of the fungus *Aschersonia aleyrodalis* and the coccinellid predator *Delphastus pusillus*, used to control *Bemisia tabaci* in greenhouse cucumber. Bemisia Newsletter (special issue) 8: 3.
- TAVAINER, P. 2002. Drowning or just waving?: A perspective on the ways petroleum-derived oils kill arthropod pest of plants, pp.78-87. En: Beattie, G. A. C.; Watson, P. M.; Stevens, M. L.; RAE, D. J.; Spooner-Hard, R. N. (eds.). Spray oils beyond 2000, 25-29 October 1999. Sydney, NSW, Australia. University of Western Sydney, Australia.
- TORRES, J. S.; SILVA-TORRES, C. S. A.; VARGAS, J. 2003. Toxicity of pymetrozine and thiamethoxam to *Aphelinus gossypii* and *Delphastus pusillus*. Pesquisa Agropecuária. Brasileira, Brasília 38 (4): 459-466.

- VILLAMIZAR, L. F.; COTES, A. M. 2003. Efecto de las condiciones de cultivo sobre parámetros del modo de acción de *Metarhizium anisopliae*. Revista Colombiana de Entomología 29 (2): 121-126.
- VILLAMIZAR, L. F.; COTES, A. M. 2006. Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* para el control de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*, pp. 12-13. En: Díaz, A. (ed.). Resumen de investigaciones en el control biológico de las moscas blancas. Publicación Corpoica-Colciencias. Produmedios. Bogotá D.C. Colombia. 20 p.
- WANG, L.; HUANG, J.; YOU, M.; LIU, B. 2004. Time-dose mortality modelling and virulence indices for six strains of *Verticillium lecanii* against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). Journal of Applied Entomology 128 (7): 494-500.
- WANG, L.; HUANG, J.; YOU, M.; GUAN, X.; LIU, B. 2005. Effects of toxins from two strains of *Verticillium lecanii* (Hyphomycetes) on bioattributes of a predatory ladybeetle, *Delphastus catalinae* (Col., Coccinellidae). Journal of Applied Entomology 129 (1): 32-38.
- WRAIGHT, S. P.; CARRUTHERS, R. I.; BRADLEY, C. A.; JARONSKY, S. T.; LACEY, L. A.; WOOD, P.; GALAINI-WRAIGHT, S. 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paceilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silver whitefly *Bemisia argentifolii*. Journal of Invertebrate Pathology 71: 217-226.
- WRAIGHT, S. P.; JACKSON, M. A.; KOCK, S. L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents, p. 253-288. En: Butt, T. M.; Jackson, C.; Magan, N. Fungal as biocontrol agents: Progress, problems and potential. CABI publishing. New York. USA. 416 p.
- ZAMBRANO, K.; DÁVILA, M.; CASTILLO, M. A. 2002. Detección de fragmentos de ADN de hongos y su posible relación con sistemas de proteínas de actividad entomopatógena. Revista Facultad de Agronomía (Luz) 19: 185-193.
- ZARE, R.; GAMS W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. Nova Hedwigia 73: 1-50.

Recibido: 15-jun-2006 • Aceptado: 7-sep-2007

## Determinación de las principales plagas de la espinaca (*Spinacia oleracea*) en Cota, Colombia

Determination of the major spinach (*Spinacia oleracea*) pests in Cota, Colombia

RODRIGO GIL C.<sup>1</sup>, DANIEL CARRILLO Q.<sup>2</sup>, JAIME JIMÉNEZ G.<sup>1</sup>

**Resumen:** En el municipio de Cota (Cundinamarca) se siembran en promedio 90 ha de espinaca al año. Actualmente no existe información sobre los artrópodos plaga que atacan este cultivo. Sin embargo, los productores aplican frecuentemente insecticidas para su control entre los cuales se destacan: organofosforados, piretroides, carbamatos, organosulfurados y extractos vegetales. En el presente trabajo se identificaron los principales artrópodos plaga y se describe su daño en el cultivo de la espinaca en Cota. Se determinó la distribución espacial de algunos artrópodos y se propone un tamaño de muestra basado en las observaciones realizadas. Los principales artrópodos encontrados en cultivos de espinaca son: *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari: Acaridae), *Delia* sp. (Diptera: Anthomyiidae), *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), *Clavipalpus ursinus* (Blanchard) (Coleoptera: Melolonthidae), trips (Thysanoptera: Thripidae) y trozadores (Lepidoptera: Noctuidae). Dentro de este grupo los principales daños estuvieron relacionados con la presencia del ácaro *T. putrescentiae* y larvas de *Delia* sp. El principal daño observado fue la deformación de las hojas; se encontró una alta correlación ( $r = 0,80$ ) entre el síntoma y la presencia de colonias de *T. putrescentiae*. Las larvas de *Delia* sp., barrenan las raíces de la espinaca durante el establecimiento de la planta y se alimentan de las hojas tiernas del cogollo durante el desarrollo de follaje. *T. putrescentiae* y *Delia* sp. se distribuyen de forma agregada.

**Palabras clave:** *Delia* sp. *Clavipalpus ursinus*. Ley de poder de Taylor. *Myzus persicae*. *Tyrophagus putrescentiae*. Hortalizas. Insectos plaga.

**Abstract:** In the municipality of Cota (Cundinamarca) an average of 90 ha of spinach is planted annually. There is currently no information on the arthropod pests that attack this crop. Growers, however, frequently apply insecticides for their control, including: organophosphates, pyrethroids, carbamates, organosulfides and plant extracts. In this study, the major arthropod pests were identified and the damage caused to spinach was described in Cota. The spatial distribution of some arthropods was determined and a sampling size is proposed based on the observations made. The major arthropod pests found in spinach crops were: *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari: Acaridae), *Delia* sp. (Diptera: Anthomyiidae), *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), *Clavipalpus ursinus* (Blanchard) (Coleoptera: Melolonthidae), thrips (Thysanoptera: Thripidae) and cutworms (Lepidoptera: Noctuidae). Within this group the major damage was related to the presence of the mite *T. putrescentiae* and larvae of *Delia* sp. The major damage observed was leaf curling; there was a high correlation ( $r = 0.80$ ) between this symptom and the presence of *T. putrescentiae* colonies. Larvae of *Delia* sp. bore into spinach roots during establishment of the plant and feed on the young leaves during development of the foliage. *T. putrescentiae* and *Delia* sp. have an aggregated distribution.

**Key words:** *Delia* sp. *Clavipalpus ursinus*. *Myzus persicae*. Taylor's power law. *Tyrophagus putrescentiae*. Vegetables. Pest insects.

### Introducción

El cultivo de espinaca *Spinacia oleracea* L., 1753 se inició en Cota (Cundinamarca) hace 30 años y actualmente es su principal actividad agrícola. El área promedio de espinaca sembrada en los últimos años ha sido de 90 ha, convirtiéndose en el mayor productor de esta hortaliza en el país. La espinaca generalmente se siembra al voleo en camas de 1,7 m de ancho; con este sistema se alcanza una densidad promedio de 34 plantas/m<sup>2</sup>. La fertilización del cultivo generalmente se realiza mediante la incorporación al suelo de estiércol fresco de gallina (gallinaza). Los materiales genéticos sembrados en el municipio se caracterizan por tener las hojas lisas y el más común es el híbrido select 424. Bajo este esquema de producción el rendimiento promedio fue de 19 ton/ha para el año 2000 (DANE 2002).

En los cultivos se observan una serie de daños, de los cuales se desconoce el artrópodo plaga responsable. Los principales daños están relacionados con flacidez de las plantas durante

los primeros estados de desarrollo y la deformación de las hojas verdaderas, siendo este último el síntoma más observado. Como respuesta a estos daños y por la falta de información acerca de los artrópodos plagas, los productores pueden realizar hasta seis aplicaciones de mezclas de pesticidas en un ciclo de cultivo de solo 60 días. Las moléculas aplicadas con mayor frecuencia son: organofosforados (Clorpirifos, Profenofos y Metamidofos), piretroides (Deltametrina), carbamatos (Carbofuran), organosulfurados (Tetradifon) y extractos vegetales (ajo-ají). El uso inapropiado y frecuente de estos productos genera riesgos a la salud de productores y consumidores, además de tener efectos negativos sobre el ambiente y la rentabilidad del cultivo.

Actualmente en Colombia, la información sobre los insectos plaga del cultivo de espinaca es escasa. Sin embargo, en California (EE.UU), Chaney *et al.* (2001) mencionan que los principales grupos entomológicos relacionados con este cultivo son: los áfidos *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) y *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878) (Hemiptera: Aphididae), los

<sup>1</sup> Autor para correspondencia: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales, Carretera Central de Norte 3 km adelante del puente de La Caro, Chía, Colombia. [rodrigo.gil@utadeo.edu.co](mailto:rodrigo.gil@utadeo.edu.co)

<sup>2</sup> Universidad de la Florida. Tropical Research and Education Center. 18905 S.W. 280th Street. Homestead, FL 33031. U.S.A. [dancar@ufl.edu](mailto:dancar@ufl.edu)

minadores *Liriomyza huidobrensis* Blanchard, 1926. *L. sativae* Blanchard, 1938 y *L. trifolii* Burgess, 1880 (Diptera: Agromyzidae), el ácaro *Rhizoglyphus* sp. (Acari: Acaridae), y larvas de lepidópteros tales como, *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808), *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766), *Peridroma saucia* (Hübner, 1808), *Agrotis subterranea* (Fabricius, 1794) y *Spodoptera praefica* (Grote, 1875), (Lepidoptera: Noctuidae), así como larvas de *Limonium* spp. (Coleoptera: Elateridae). Guerrero *et al.* (2001), mencionan que en la región de Murcia (España), las plagas que afectan la espinaca son polífagas y comunes a otros cultivos hortícolas estacionales. Entre éstas destacan algunos áfidos como, *M. persicae*, *Aphis fabae* Scopoli, 1763 y *Aphis gossypii* Glover, 1877, lepidópteros defoliadores como, *S. exigua* y *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) y los ácaros *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) y *Tyrophagus similis* Volgin, 1949. En Japón, Kasuga y Amano (2003) afirman que ácaros del género *Tyrophagus*, presentes en los suelos de los invernaderos, se alimentan de las hojas jóvenes de la espinaca.

Además de desconocerse las plagas presentes en los cultivos de espinaca, tampoco se conoce la disposición de ellos dentro de las áreas cultivadas. La distribución de los organismos en el espacio, es una característica biológica importante. De forma general se aceptan tres formas de distribución: al azar, uniforme o agregada (Pedigo y Rice 2006; Duque-Echeverri 2002). Existen diferentes métodos que se emplean para describir la distribución de los insectos en el espacio (Southwood 1978). Dentro de los métodos mas empleados se encuentran la ley de poder de Taylor y la distribución binomial negativa (Trichilo *et al.* 1993; Osorio y Cardona 2003; Tello *et al.* 2001; Bueno *et al.* 2005). En la ley de poder de Taylor, el valor de la pendiente *b*: regresión entre el logaritmo de la media y el logaritmo de la varianza de una población, puede considerarse como una medida de agregación. En consecuencia, si se estima una pendiente menor a 1, se interpreta que el insecto está distribuido uniformemente; si es igual a 1, indica distribución al azar y si la pendiente es mayor que 1, indica agregación (Duque-Echeverri 2002; Bueno *et al.* 2005). La distribución binomial negativa es la distribución usada generalmente para modelar poblaciones agregadas. Esta distribución está determinada por dos parámetros *k* y *p*, los cuales se relacionan con la media ( $\mu = k \cdot p$ ). El parámetro *k* es interpretado como una medida de agregación y se considera que mientras menor sea su valor ( $k < 8$ ), mayor será la agregación de la población (Southwood 1978; Gómez 1997).

El propósito del presente trabajo es identificar los principales artrópodos plaga en el cultivo de espinaca en Cota, describir el daño que ocasionan y brindar información básica para su manejo.

Se presenta una aproximación a la distribución espacial de algunos de los artrópodos plaga encontrados y se propone un tamaño de muestra mínimo.

### Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en el municipio de Cota, Cundinamarca, a 2.547 m de altitud (4°49'05"N, 74°07'20"W), con una temperatura media de 13,7°C y un régimen de precipitación bimodal, con un promedio anual de 700 mm.

Dos cultivos se monitorearon semanalmente, desde la siembra hasta la cosecha. Un cultivo se situó en una finca manejada bajo un sistema de producción convencional (lote

A) y el otro bajo un sistema ecológico u orgánico (lote B). La fertilización y el manejo de enfermedades y arvenses, se realizó según el criterio del productor. En el lote A se usaron fertilizantes y otros insumos de síntesis química, y el lote B no recibió ninguno de estos tratamientos; sin embargo, en ninguno de los lotes se aplicó insecticidas. El número de plantas para el seguimiento de las poblaciones de insectos, se determinó mediante un muestreo piloto que permitió establecer los parámetros necesarios para desarrollar la fórmula (1) propuesta por Southwood (1978).

$$n = \left( \frac{S}{E\bar{x}} \right)^2 \quad (1)$$

Donde: *n* = Tamaño de muestra, *S* = desviación estándar de los datos del muestreo piloto, *E* = Error Estándar predeterminado y  $\bar{x}$  = la media de los datos del muestreo piloto.

Para el muestreo de artrópodos, se realizó una revisión manual en cada planta, en las hojas jóvenes en expansión localizadas en el "cogollo" y en las hojas totalmente desplegadas (haz y envés); se registró el tipo y número de artrópodos presentes. Se recolectaron algunos especímenes de cada una y se llevaron al laboratorio de entomología del Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales (CIAA), para su preparación. Los especímenes recolectados se preservaron, montaron y etiquetaron siguiendo métodos estándar, tanto para hexápodos como para ácaros (Krantz 1977; Triplehorn y Johnson 2005). Posteriormente se enviaron para su identificación a especialistas del Museo de Zoología de la Universidad de Michigan (EE.UU.), la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia (Venezuela) y la Facultad de Agronomía de Universidad Nacional de Colombia. En campo como en laboratorio, se tomaron fotografías de los daños atribuibles a cada organismo con el fin de caracterizarlos. Se usó la correlación de Pearson para establecer el nivel de asociación entre el síntoma de deformación de las hojas y la presencia de artrópodos que pudieran estar relacionados con este síntoma.

El ciclo de desarrollo de la espinaca se dividió en tres etapas, siguiendo el código uniforme de estados de crecimiento conocido como "escalas BBCH". En este código, el ciclo completo de las plantas se subdivide en diez fases principales claramente distinguibles. Estos estados son descritos usando números del cero al nueve en orden ascendente. Los estados secundarios son usados para describir fases cortas de desarrollo. Contrario a los estados principales de crecimiento, los estados secundarios son pasos cortos de desarrollo, que ocurren durante un determinado estado principal y también son codificados usando números de cero a nueve. La combinación de los números de un estado principal y uno secundario de crecimiento conduce a un código digital de dos cifras (Meier 2001). La primera etapa comprende desde la siembra de la semilla hasta cuando la plántula expande completamente las hojas cotiledonales (00 a 10, de la escala BBCH) y se denominó germinación. La segunda comprendió desde la aparición de las primeras hojas verdaderas hasta cuando la roseta foliar alcanzó el 70% del diámetro esperado (11 a 37), esta etapa se denominó desarrollo de hojas. La última etapa abarcó desde cuando la roseta foliar alcanzó el 70% del diámetro esperado hasta cuando está se desarrolló completamente (38 y 39), esta etapa se denominó cosecha. Durante cada una de estas tres

etapas se determinó la proporción de las plagas más relevantes encontradas en el cultivo. La distribución en campo de estos organismos se determinó mediante la ley de poder de Taylor (2) (Southwood 1978).

$$\ln(S^2) = \ln(a) + b \ln(\bar{x}) \quad (2)$$

Donde:  $\ln(S^2)$  = Logaritmo natural de la varianza de los datos poblacionales,  $\ln(a)$  = Logaritmo natural del intercepto de la regresión lineal,  $b$  = es la pendiente de la regresión y  $\ln(\bar{x})$  = Logaritmo natural de la media de la población. Además se determinó el ajuste de las frecuencias observada a la distribución binomial negativa (Gómez 1997; Southwood 1978).

El tamaño de muestra sólo se calculó para los artrópodos más relevantes encontrados sobre las plantas, utilizando tres márgenes de error: 10, 15 y 20%. La fórmula empleada (3) para calcular el tamaño de muestra, utiliza los valores de  $a$  y  $b$  de la ley de poder de Taylor y el valor de la distribución  $t$ .

$$n = \left( \frac{100}{c} \right)^2 t^2 a \bar{x}^{b-2} \quad (3)$$

Donde:  $n$  = número de muestras a tomar,  $c$  = margen de error admitido (error estándar de la media),  $t$  = valor aproximado de la distribución  $t$ ,  $\bar{x}$  = media de la población y  $a$  y  $b$  = son los valores estimados con la ley de poder de Taylor (Bueno *et al.* 2005).

### Resultados y Discusión

Con base en el muestreo piloto, se determinó un tamaño de muestra de 180 plantas para cada lote, las cuales fueron seleccionadas aleatoriamente. Los principales artrópodos encontrados en cultivos de espinaca fueron: *Delia* sp. (Diptera: Anthomyiidae), *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781) (Acari: Acaridae), *M. persicae* (Hemiptera: Aphididae), *Clavipalpus ursinus* (Blanchard, 1850) (Coleoptera: Melolonthidae), trips (Thysanoptera: Tripidae) y trozadores (Lepidoptera: Noctuidae). Dentro de este grupo los principales daños están relacionados con la presencia de larvas de *Delia* sp. y del ácaro *T. putrescentiae*.

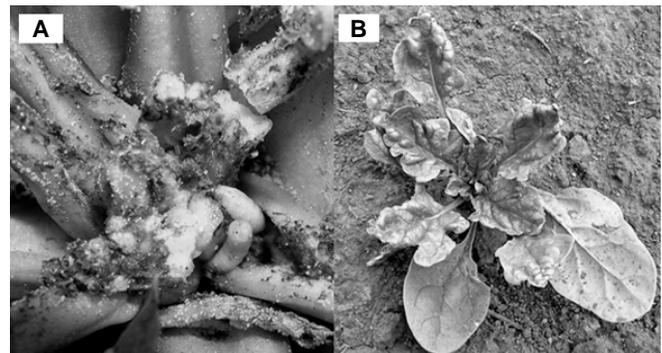
**Descripción del daño.** El daño ocasionado por la larva de *Delia* sp., consiste en la destrucción del tallo y de la raíz de la plántula y del punto de crecimiento de la planta (Fig. 1A), cuando está próxima a la cosecha. La especie que se encuentra en los cultivos de espinaca en Cota, aún no ha sido determinada. Sin embargo, a nivel mundial las especies predominantes de este género son *Delia antiqua* (Meigen, 1826) y *D. platura* (Meigen, 1826). La primera de ellas, se asocia a especies cultivadas como cebolla (*Allium cepa* L. 1753), ajo (*Allium sativum* L. 1753) y otras pertenecientes a este mismo género, mientras que la segunda, posee un rango más amplio de hospederos (Hill 1983). Según Hough-Goldstein y Bassler (1988), la oviposición de *D. platura* y de otras especies de este género, está influenciada por la acción de microorganismos del suelo involucrados en procesos de descomposición. En Cota, es común la aplicación e incorporación al suelo de altas cantidades de gallinaza, generalmente de ocho a 15 días antes de la siembra. Esta práctica, al favorecer procesos de descomposición probablemente también ayude al desarrollo de altas poblaciones de *Delia* sp.

El ácaro encontrado sobre las hojas jóvenes en expansión de la espinaca se identificó como *T. putrescentiae*. Se determinó que hay una alta asociación entre la presencia de *T. putrescentiae* y la deformación de las hojas ( $r = 0,80$ ,  $P = <0,0001$ ). Se infiere, que la presencia de este ácaro sobre las plantas de espinaca está relacionada con la deformación de sus hojas (Fig. 1B). El ácaro se encontró, en el 100% de los casos, sobre hojas jóvenes en expansión (cogollo) y por su ubicación en la planta, a este artrópodo se le conoce como el ácaro de la corona de la espinaca (Chaney *et al.* 2001).

Se registraron colonias del áfido *M. persicae*, tanto ápteros como alados, generalmente en el envés de las hojas maduras de la espinaca. *M. persicae* transmite eficientemente cerca de 100 tipos de virus de plantas, por lo cual se le considera como la especie más importante en la transmisión de enfermedades virales (Blackman y Eastop 2000). En la espinaca el virus del mosaico de las cucurbitáceas (CBV) es transmitido principalmente por *M. persicae* y produce moteado sobre las hojas jóvenes y en casos severos destrucción del punto de crecimiento (Correll *et al.* 1994). Debido a que la deformación de las hojas puede ser atribuida a un síntoma viral (Martínez *et al.* 1999) y que *M. persicae* es reportado como un transmisor de virus en espinaca, se realizó la correlación de Pearson entre la presencia del áfido y del síntoma pero se obtuvo una baja asociación ( $r = 0,21$ ,  $P = <0,0001$ ) por lo que se puede inferir preliminarmente, que es poco probable que la deformación de las hojas sea un síntoma de un virus transmitido por *M. persicae*.

Las larvas del coleóptero *C. ursinus*, causan daños graves durante la germinación del cultivo, debido a que se alimenta del sistema radicular de la planta. En Cota, este insecto es comúnmente llamado “chisa” durante sus estados larvales y “mayito” o “viejita” en su estado adulto. Según Zuluaga (2003), *C. ursinus* es una plaga subterránea de hábito fitófago y se alimenta de las raíces de muchas plantas incluyendo la mayoría de las hortalizas; su ataque puede ocasionar la pérdida completa de la cosecha, especialmente cuando el ataque ocurre sobre plantas en estados iniciales de crecimiento. Esta especie parece ser la más limitante en la sabana de Bogotá, por los daños que causa y por su abundancia. (Londoño 2000). Parra *et al.* (2006), determinaron que los adultos solo se presentan durante los periodos lluviosos y sugieren que es probable que se presente predominio de un determinado instar larval dependiendo de la época del año.

También se observó un complejo de larvas de lepidópteros, los cuales se agrupan en dos categorías. La primera corresponde



**Figura 1.** Principales problemas asociados a presencia de artrópodos plaga en el cultivo de la espinaca. **A.** Daño ocasionado por larvas de *Delia* sp. en el cogollo de las plantas. **B.** Deformación de las hojas de la espinaca, relacionada con la presencia del ácaro *T. putrescentiae*.

a larvas que actúan como cogolleros y atacan a la espinaca en estado de plántula. La segunda corresponde a larvas defoliadoras, las cuales se observan cuando la planta ya ha desplegado las hojas verdaderas. En otras zonas productoras de espinaca se menciona la presencia de larvas de lepidópteros solo como defoliadores (Chaney *et al.* 2001; Guerrero *et al.* 2001). Según Venette y Gould (2006), la espinaca es hospedera de *Copitarsia* spp., esta plaga es de importancia cuarentenaria en EE.UU y ha sido reportada en la Sabana de Bogotá (López-Ávila 1996). Es necesario realizar la identificación taxonómica de este complejo de larvas, como un primer paso para plantear estrategias de manejo integrado.

También se encontraron algunos estados inmaduros y adultos de trips. La correlación entre la presencia de estos insectos y la deformación de las hojas fue de  $r = 0,14$  ( $P = < 0,0001$ ), lo que indica una baja asociación entre estas dos variables. Sin embargo, según Dreistadt y Phillips (2001) la alimentación de muchas especies de trips consideradas como plaga ocasiona la aparición de cicatrices sobre el órgano de la planta afectado, lo que corresponde a una deformación; Dreistadt y Phillips (2001) mencionan que muchas especies de trips se alimentan en los brotes, donde las hojas se encuentran iniciando el proceso de expansión. Por lo tanto es posible que la presencia de trips en el punto de crecimiento de las plantas de espinaca, ocasione también un daño que se manifieste como una deformación de las hojas. Es necesario caracterizar el daño ocasionado por los trips para poder diferenciarlo del que probablemente causa *T. putrescentiae*.

**Distribución espacial de *Delia* sp. y *T. putrescentiae*.** Debido a que son las principales plagas que atacan al cultivo de la espinaca en el municipio de Cota. Preliminarmente, con base en el índice *b* se determinó que la distribución espacial de *Delia* sp., en el lote A (agregada) no coincide con la del lote B (uniforme). Las frecuencias se ajustan a la distribución binomial negativa, por lo cual se confirma la distribución agregada de las larvas en el lote A (Tabla 1). Sin embargo, es probable que la distribución sea agregada y el índice *b* de la ley de Taylor este influenciada por factores como: el método de muestreo, la población de la plaga (Lote A, 97 larvas; Lote B, < 30 larvas) y el estímulo para la oviposición. Con respecto a este último factor Gouinguéné y Städler (2006) mencionan que materiales orgánicos en descomposición, incluyendo fertilizantes orgánicos, estimulan la oviposición de *D. platura*.

La continua aplicación de gallinaza en el lote A, puede favorecer el establecimiento de la plaga *Delia* sp. y su agregación y la segregación detectada por la ley de Taylor en el lote B, puede ser consecuencia de la ausencia de este recurso. La mayor proporción de individuos de este insecto en el lote

A, se halló durante el período de cosecha (72,04%), en cual se encontraron hasta tres larvas por planta. Durante el periodo de germinación se encontró el 24,73% de la población total muestreada y el restante 3,23% se halló durante la fase de desarrollo de las hojas. Esta situación contrasta con lo observado en el lote B, donde el 78,26% de la población de *Delia* sp., se encontró durante el periodo de germinación y el restante 21,74% se halló durante la fase de desarrollo de las hojas. La aplicación de gallinaza en el Lote A al inicio del ciclo, posiblemente favoreció la oviposición, el establecimiento y la permanencia de este insecto. Aunque autores como Chaney *et al.* (2001) y Guerrero *et al.* (2001) no mencionan la presencia de esta plaga en los cultivos de espinaca en California (EE.UU.) y Murcia (España) respectivamente, en Cota es necesario iniciar estudios tendientes a diseñar estrategias de manejo integrado. Los estudios deben partir de la identificación taxonómica de esta plaga hasta el nivel de especie, la relación entre la aplicación de diferentes fuentes de materia orgánica y su presencia, así como la búsqueda de enemigos naturales.

Para *Delia* sp., se determinó un tamaño de muestra preliminar basado en los parámetros *a* y *b* de la ley de Taylor y tres valores para el error estándar de la media. Si se desea estimar la población de *Delia* sp., en una hectárea de cultivo con un error estándar del 10% de la media se deben revisar 1.025 plantas; con un error estándar del 15% se deben examinar 455 plantas y con un error estándar del 20% de la media se deben inspeccionar 256 plantas. Según Southwood (1978) para realizar estudios cuyo objetivo sea el control de la plaga o la valoración del daño, un error estándar del 20% de la media es aceptable. Sin embargo, advierte que para estudios cuyo objetivo sea elaborar tablas de vida, o que requieren estimar la población con un mayor grado de precisión, es necesario emplear un error estándar que no superen el 10%.

Para las colonias del ácaro *T. putrescentiae* se observó preliminarmente agregación tanto en el lote A ( $b = 1,54$ ,  $R^2 = 0,98$ ) como en el lote B ( $b = 1,41$ ,  $R^2 = 0,94$ ), mediante la regresión lineal de ley de poder de Taylor. La mayor proporción del total de colonias de ácaros en ambos lotes (lote A, 52,5% y lote B, 61,5%) se encontró durante el periodo de cosecha; durante el período de desarrollo de hojas la proporción en el lote A fue de 38,5% y en el lote B fue de 47,5%. Sin embargo, durante la germinación se encontró 0% de presencia de ácaros sobre las plantas en ambos lotes. Posiblemente el establecimiento de las colonias de *T. putrescentiae* sobre las plantas de espinaca está condicionado por la existencia de hojas verdaderas tiernas, bien sea por que le sirven de refugio y/o de alimento. También se determinó que la incidencia de *T. putrescentiae* al final del ciclo fue mayor en el lote A (79,8%) que en el lote B (28,6%). Esta diferencia, al igual que en las

**Tabla 1.** Estimación del índice de dispersión por medio de la regresión lineal y pruebas de bondad de ajuste a una distribución binomial negativa para las poblaciones de larvas de *Delia* sp. durante el desarrollo un ciclo de espinaca. *b* = pendiente;  $R^2$  = coeficiente de determinación;  $\chi^2$  = chi cuadrado; G. l. = grados de libertad.

Localización	Regresión lineal		Interpretación	Distribución binomial negativa		
	<i>b</i>	$R^2$		$\chi^2$	G. l.	Interpretación
Lote A	1,67**	0,65	Agregado	4,91 <sup>ns</sup>	4	Agregado
Lote B	0,096 <sup>ns</sup>	0,99	Uniforme	51,5**	3	-

<sup>ns</sup> No significativo, \*\* Significativo ( $\alpha < 0,05$ ).

poblaciones de *Delia* sp., puede estar relacionada con la incorporación de gallinaza, 15 días antes de la siembra en el lote A Chaney *et al.* (2001), mencionan que la presencia de un ácaro del género *Rhizoglyphus* en la misma ubicación del encontrado en las plantas de espinaca en Cota, ocasiona la deformación de las hojas. Estebanes-González y Rodríguez-Navarro (1991) y Guerrero *et al.* (2001), también mencionan la presencia del ácaro *Tyrophagus similis* sobre las hojas tiernas de plantas de espinaca los cuales son descritos como plagas, sin especificar de forma clara el daño que ocasionan. Por lo anterior, son necesarios estudios más detallados para verificar que la especie encontrada en Cota es la mayor responsable de la deformación de las hojas de la espinaca y a partir de esta información diseñar estrategias de manejo integrado.

### Agradecimientos

Al Dr. Alexander Cooman, y a la Ing. Agr. Sandra Pulido por revisar y corregir este trabajo. A los productores hortícolas de Municipio de Cota por permitirnos realizar las observaciones para el desarrollo del presente trabajo.

### Literatura Citada

- BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. F. 2000. Aphids on the world crops. An identification and information guide. Jhon Wiley & Sons. England. 375 p.
- BUENO, M. J.; CARDONA, C.; CHACÓN, P. 2005. Fenología, distribución espacial y desarrollo de métodos de muestreo para *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) en habichuela y fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Colombiana de Entomología 31 (2): 161-170.
- CHANEY, W. E.; LESTRANGE, M.; KOIKE, M.; SMITH, R. F.; FENNIMORE, S. A. 2001. Spinach UC IPM pest management guidelines. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PDF/PMG/pmgspinach.pdf>. Fecha última revisión: 15 mayo 2005. Fecha último acceso: [31 de Julio 2007].
- CORRELL, J. C.; MORELOCK, T. E.; BLACK M. C.; KOIKE, S. T.; BRANDENBERGER, L. P.; DAINELLO, F. J. 1994. Economically important disease of spinach. Plant Disease 78 (7): 653-660.
- DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA - DANE. 2002. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Censo Hortícola, Sabana de Bogotá. [http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/ena/Censo\\_Horticola\\_Bta\\_2002.pdf](http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/ena/Censo_Horticola_Bta_2002.pdf). Fecha de última revisión: 10 mayo 2005. Fecha de último acceso: [25 de Julio 2007].
- DUQUE-ECHEVERRI, M. C. 2002. Patrones de disposición espacial y su importancia en la definición de un plan de muestreo en MIP, pp. 182-209. En: López-Ávila, A (ed.). Control biológico componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Produmedios. Bogotá. Colombia. 340 p.
- DREISTADT, S. H.; PHILLIPS, P. A. 2001. Thrips. Pest notes. University of California Agricultural and Natural Resources. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PGM/PESTNOTES/pn7429.html>. Fecha última revisión: 25 mayo 2005. Fecha último acceso: [16 de Julio 2007].
- ESTEBANES-GONZÁLEZ, M. L.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, S. 1991. Observaciones de algunos ácaros de las familias Tetranychidae, Eriophyidae, Acaridae y Tarsonemidae (Acari), en cultivos de Hortalizas en México. Folia Entomológica Mexicana 83: 199-212.
- GÓMEZ, H. 1997. Estadística experimental aplicada a la ciencias agrícolas. Imprenta Universidad Nacional, Medellín. 571 p.
- GOINGUENÉ, S. P.; STÄDLER, E. 2006. Oviposition in *Delia platura* (Diptera, Anthomyiidae): The role of volatile and contact cues of bean. Journal of Chemical Ecology 32 (7): 1399-1413.
- GUERRERO, M. M.; LACASA, A.; ALCÁZAR, A.; BIELZA, P. 2001. El ácaro *Tyrophagus similis* Volgin (Acari: Acaridae) una incómoda plaga de la espinaca. Agrícola Vergel (España) 234: 336-340.
- HILL, D. S. 1983. Agricultural insect pest of the tropics and their control. Cambridge University Press. Great Britain. 746 p.
- HOUGH-GOLDSTEIN, J.; BASSLER, M. A. 1988. Effects of bacteria on oviposition by seedcorn maggots (Diptera: Anthomyiidae). Environmental Entomology 17 (1): 7-12.
- KASUGA, S.; AMANO, H. 2003. Seasonal prevalence and susceptibility to agrochemicals of *Tyrophagus similis* (Acari: Acaridae) in spinach buds and agricultural soil under greenhouse conditions. Experimental and Applied Acarology 30: 279-288.
- KRANTZ, G. W. 1977. A manual of acarology. Oregon State University Book Stores. Oregon. 509 p.
- LONDOÑO, M. E. 2000. Control biológico de la chisa (Coleoptera: Melolonthidae), pp. 40-48. En: López A. Memorias I curso taller internacional de control Biológico: Componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. Bogotá. D.C.
- LÓPEZ-ÁVILA, A. 1996. Insectos plaga del cultivo de la papa en Colombia y su manejo, pp. 146-148, 150-154. En: Anon. (ed.). Papas colombianas con el mejor entorno ambiental, Comunicaciones y Asociados Ltda, Santafé de Bogotá, Colombia.
- MARTÍNEZ, P.; RODRÍGUEZ D. A.; BORRERO, F. 1999. Manejo de plagas en hortalizas de clima frío. Instituto Colombiano Agropecuario, División de Sanidad Vegetal. Produmedios, Bogotá. 103 p.
- MEIER, U. 2001. Growth stages of mono-and dicotyledonous plants. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. <http://www.bba.de/veroeff/bbch/bbcheng.pdf>. Fecha última revisión: 20 febrero 2005. Fecha último acceso: [23 de Julio 2007].
- OSORIO, J.; CARDONA, C. 2003. Fenología, fluctuación de poblaciones y métodos de muestreo para *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) en habichuela y fríjol. Revista Colombiana de Entomología 29 (1): 43-49.
- PARRA, R.; CARRILLO, D.; GIL, R.; JIMÉNEZ, J. 2006. Fluctuación poblacional anual de cinco especies de escarabajos (Coleoptera: Melolonthidae) en Cota, Cundinamarca. Resúmenes XXXIII Congreso de Entomología. Sociedad Colombiana de Entomología. p. 118.
- PEDIGO, L. P.; RICE, M. E. 2006. Entomology and pest management. Prentice Hall, New Jersey 749 p.
- SOUTHWOOD, T. R. E. 1978. Ecological methods with particular reference to the study of insect populations. Chapman and Hall, London. 524 p.
- TELLO, V.; RAMÍREZ, S.; PINTO, V.; BAUTISTA, N. 2001. Patrones de distribución de áfidos (Homoptera: Aphididae) asociados con los el cultivo de brócoli en la zona agrícola de San Andres Mixquic, Tlahuac, D.F., México. Folia Entomológica Mexicana 40 (3): 311-324.
- TRICHILO, P. J.; WILSON, L.T.; MACK, T. P. 1993. Spatial and temporal dynamics of the threecornered alfalfa hopper (Homoptera: Membracidae) on soybeans. Environmental Entomology 22 (4): 802-809.
- TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. 2005. Introduction to the study of insects. Thomson Brooks/Cole. United States of America. 864 p.
- VENETTE, C. R.; GOULD, J. R. 2006. A pest risk assessment for *Copitarsia* spp., insects associated with importation of commodities into the United States. Euphytica 148: 165-183.
- ZULUAGA, C. A. 2003. Identificación de chizas (Col: Melolonthidae) asociadas a pastos "Kikuyo" (*Pennisetum clandestinum* Hoehst) y papa (*Solanum tuberosum* L.) y sus enemigos naturales en Cundinamarca. Trabajo de grado de ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional, Facultad de Agronomía, Bogotá. 52 p.

## Evaluación de la asociación ácaros-hongos causantes del amarillamiento de la cebolla junca *Allium fistulosum*

Evaluation of the mite-fungus association responsible for the yellowing in the Welsh onion *Allium fistulosum*

LUIS ALFONSO MUÑOZ B.<sup>1</sup> y ANY MERCEDES LUCERO M.<sup>2</sup>

**Resumen:** Bajo condiciones de campo, invernadero y laboratorio, el estudio evaluó la asociación ácaros-hongos-amarillamiento de la cebolla junca *Allium fistulosum* en cultivos recién establecidos y en cultivos de edad avanzada, en las localidades de San Francisco y Alianza (Pasto, Colombia), ubicadas a 2.650 msnm, con una temperatura de 12°C y precipitación media de 1.100 mm anuales. En los cultivos recién establecidos se encontraron una incidencia de amarillamiento del 11,0% y 14,2% respectivamente, sin presentar diferencias significativas para las dos localidades. De igual manera no hubo diferencias significativas entre localidades para los cultivos de edad avanzada, con una incidencia de 38,4% y 43,4%, respectivamente. En las muestras de cada localidad se encontraron dos tipos de ácaros como causantes de amarillamiento de la cebolla, *Rhizoglyphus echinophus* y *Rhizoglyphus vincatus* (Acari: Acaridae), siendo *R. echinopus* el que presentó el mayor porcentaje de plantas afectadas (56,7%). Los hongos causantes del daño al cultivo de cebolla fueron: *Phoma* sp., *Botrytis* sp., *Gliocladium* sp. y *Fusarium oxysporum*. En invernadero el mayor porcentaje de plantas afectadas se presentó con *F. oxysporum* (43,3%) y con el complejo *F. oxysporum* y *Phoma* sp. (40,0%). La asociación del ácaro *R. echinopus* y el hongo *F. oxysporum*, produjo el mayor porcentaje de plantas afectadas (80,0%). Además, se encontró que *R. echinopus* presentó mayor descendencia en presencia de *F. oxysporum* (78 individuos a las 72 horas).

**Palabras clave:** *Rhizoglyphus*. *Phoma*. *Botrytis*. *Gliocladium*. *Fusarium oxysporum*. Plagas. Horticultura.

**Abstract:** Under field, greenhouse and laboratory conditions, the study evaluated the mite-fungus-yellowing association in the Welsh onion *Allium fistulosum*, in recently established and mature crops, in the localities of San Francisco and Alianza (Pasto, Colombia), located at 2650 m elevation, with a temperature of 12°C and an average annual rainfall of 1100 mm annual. In recently established crops, the incidence of yellowing was 11.0% and 14.2%, respectively, with no difference between localities. Similarly, there were no significant difference between localities for the mature crop, with an incidence of 38.4% and 43.40%, respectively. In the sampling at each locality two kinds of mites were found which are responsible for the yellowing of onion, *Rhizoglyphus echinophus* and *Rhizoglyphus vincatus* (Acari: Acaridae), being *R. echinopus* with the greatest percentage of affected plants (56.7%). The fungi responsible for the damage to the onion crops were: *Phoma* sp., *Botrytis* sp., *Gliocladium* and *Fusarium oxysporum*. In the greenhouse the greatest percentage of affected plants had *F. oxysporum* (43.3%) and the complex *F. oxysporum* and *Phoma* sp. (40.0%). The association of the mite *R. echinopus* and the fungus *F. oxysporum*, produced the greatest percentage of affected plants (80.0%). Moreover, *R. echinopus* was found to present the most descendents when in the presence of *F. oxysporum* (78 individuals in 72 hours).

**Key words:** *Rhizoglyphus*. *Phoma*. *Botrytis*. *Gliocladium*. *Fusarium oxysporum*. Pests. Horticulture.

### Introducción

La cebolla *Allium fistulosum* (L., 1753), es un cultivo hortícola importante en la economía del municipio de Pasto, donde por las condiciones de clima y suelo la planta se desarrolla adecuadamente, con rendimientos de 6 ton/ha por cosecha, las cuales alcanzan un precio en el mercado local de 12 millones de pesos (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2002).

La cebolla junca (también llamada cebolla larga o de rama) alcanza una vida productiva de 10 años y puede ser cosechada tres a cuatro veces por año Jaramillo y Hernández (1983), los productores de esta hortaliza, en su mayoría son minifundistas y realizan un manejo empírico del cultivo en las diferentes etapas de crecimiento y producción, también carecen de conocimientos técnicos en las labores de selección de semilla, fertilización, deshierba, manejo de plagas y enfermedades, muchas de las cuales son limitantes (Pumalpa 1983).

El problema fitosanitario más grave de la cebolla, principalmente en el sur del departamento de Nariño, es el

secamiento de las plantas, debido a pudriciones en la base del tallo y el sistema radical; sin embargo, hasta el momento no se conocen las bases para el manejo de la enfermedad, por no tener un conocimiento exacto de las causas que la ocasionan a pesar de existir evidencias de que se trata de un complejo de hongos y ácaros.

Se caracterizó el complejo hongos-ácaros causante del amarillamiento de la cebolla en las veredas San Francisco y Alianza (Pasto, Nariño) a lo largo de un año. También se determinó el porcentaje de incidencia del amarillamiento en las dos localidades, se identificaron y aislaron diversos hongos y ácaros asociados con dicho amarillamiento, se evaluó el efecto de la interacción entre ellos y se logró establecer la etiología de la enfermedad mediante pruebas de patogenicidad.

### Materiales y Métodos

En las localidades San Francisco y Alianza (Pasto, Nariño, Colombia), ubicadas a 2.650 msnm, con temperatura y

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo. Docente Institución Educativa Técnico San Juan Bautista (Los Andes, Nariño). [sinagro@latinmail.com](mailto:sinagro@latinmail.com)

<sup>2</sup> Bacterióloga. M. Sc. Microbiología. Docente Universitaria. Universidad Mariana. Pasto. Colombia. Diagonal 16D #2E37 Barrio Miraflores. Teléfono: (092)7325288. Celular: 3007791444. [alu2403@gmail.com](mailto:alu2403@gmail.com)

precipitación promedio anual de 12°C y 1.100 mm. Se recolectaron muestras de cebolla *A. fistulosum* que presentaron síntomas de pudrición de raíz y pseudotallo, amarillamiento y secamiento de hojas. Para determinar el porcentaje de incidencia se evaluaron cinco fincas por localidad, realizando un recorrido en forma de X en cada una, se contabilizó el número de plantas sanas, plantas enfermas y el número total de plantas. Los porcentajes obtenidos para las dos localidades fueron comparados con la prueba "t" (Montgomery 2002).

**Colección e identificación de los ácaros y los hongos.** De las plantas de cebolla recolectadas en el campo con síntomas de secamiento se tomaron trozos de tallo con pudriciones suaves y ácaros, se separaron ninfas y adultos y se establecieron las primeras colonias que fueron criadas en cajas petri, en el fondo de cada caja se colocó un papel filtro impregnado con 1 ml de agua destilada y sobre éste se depositaron trozos sanos de pseudotallo, para favorecer la multiplicación de los ácaros. Los ácaros y el pseudotallo fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 3% durante dos minutos.

Para la clasificación de los ácaros se tomaron especímenes presentes en las pudriciones de la cebolla y se colocaron en un recipiente que contenía una solución de alcohol y agua, posteriormente se rotularon y fueron enviados a la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional, Palmira, donde se realizó la identificación taxonómica. Para la identificación de los hongos se tomaron raíces, discos basales y pseudotallos que presentaron necrosis, de los cuales se cortaron pequeños trozos, dejando parte de tejido sano y porción muerta, luego fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 3% durante dos minutos y se los depositó en cajas de petri con agar-peptona-glucosa acidificado. Una vez hubo formación de las colonias, con la ayuda de una espátula se tomó parte de la colonia, la cual fue transferida a tubos de ensayo inclinados que contenían agar-peptona-glucosa, las muestras fueron identificadas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño, teniendo en cuenta los criterios de Booth (1971).

**Siembra del material vegetal empleado en los ensayos.** En los ensayos se utilizaron plantas de cebolla de 65 días de edad, sembradas en bolsas de polietileno con capacidad de un kilogramo; el sustrato estuvo compuesto por tres partes de tierra y una de arena; este fue esterilizado con formol al 3%.

**Prueba de patogenicidad de los ácaros.** En este ensayo se utilizaron 90 plantas de cebolla, las cuales se agruparon en un diseño de bloques completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento, para cada tratamiento se emplearon diez plantas, en cada una de ellas se descubrió el área radical y se colocaron en la base 20 ácaros (ninfas). Los tratamientos correspondieron a los dos tipos de ácaros identificados en el laboratorio de la Universidad Nacional y un testigo, así: T1 = *Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze y Robin, 1868), T2 = *Rhizoglyphus vincatus* Claparède, 1869 y T3 = Testigo (Plantas libres de ácaros). Las evaluaciones se hicieron hasta que las plantas manifestaron síntomas de marchitamiento; la variable evaluada fue porcentaje de plantas afectadas.

**Prueba de patogenicidad de los hongos.** Para este ensayo se emplearon 240 plantas de cebolla las cuales se agruparon en un diseño de bloques completamente al azar, con ocho tratamientos; Cuatro tratamientos consistieron en la inoculación de los tipos de hongos aislados de las fincas afectadas, tres,

para determinar la acción conjunta de *Fusarium oxysporum* Schlechtendal, 1824 con *Phoma* sp., *Botrytis* sp., y *Gliocladium* sp., y hubo un testigo absoluto así: T1 = *F. oxysporum*, T2 = *Phoma* sp., T3 = *Botrytis* sp., T4 = *Gliocladium* sp., T5 = *F. oxysporum* + *Phoma* sp., T6 = *F. oxysporum* + *Botrytis* sp., T7 = *F. oxysporum* + *Gliocladium* sp. y T8 = Testigo (Plantas sin inoculación de hongos). En cada tratamiento se hicieron tres repeticiones y cada repetición estuvo constituida por diez plantas, los síntomas observados en el campo se compararon con los producidos en las inoculaciones en condiciones de invernadero, la variable analizada fue porcentaje de plantas afectadas. Para las observaciones de los síntomas y reaislamiento de patógenos se aplicaron los postulados de Koch descritos por Agrios (1988).

**Prueba de patogenicidad de la interacción ácaros-hongos.** Para probar la interacción del daño causado por ácaros y hongos, se realizó un ensayo con cuatro tratamientos donde se inocularon en forma individual ácaros, hongos y conjuntamente ácaros y hongos en plantas de cebolla; se hicieron tres repeticiones por tratamiento y cada repetición estuvo conformada por diez plantas, las cuales se agruparon en un diseño de bloques completamente al azar. La variable evaluada fue porcentaje de plantas afectadas, los tratamientos fueron: T1 = *R. echinopus*, T2 = *F. oxysporum*, T3 = *R. echinopus* + *F. oxysporum* y T4 = Testigo (Plantas sin inoculación).

**Reproducción de *Rhizoglyphus echinopus*.** Para determinar cual era el medio en el que prosperaban los ácaros *R. echinopus*, se realizó un ensayo conformado por seis tratamientos cada uno con cinco repeticiones. En cajas de petri se colocaron partes de raíz de cebolla, pseudotallo y cuatro colonias de hongos y en cada una se depositaron 20 ácaros adultos.

Los tratamientos se agruparon en un diseño completamente al azar y después de 72 horas se contabilizó el número de descendientes independientemente del estado de desarrollo. Los tratamientos empleados fueron: T1 = *F. oxysporum*, T2 = *Phoma* sp., T3 = *Botrytis* sp., T4 = *Gliocladium* sp., T5 = Raíces de cebolla y T6 = Pseudotallo.

**Análisis estadístico.** Para todos los ensayos se realizó análisis de varianza y en el caso de encontrar diferencias entre los tratamientos se efectuó la prueba de comparación de medias de Tukey HSD al 95% (SAS Institute 2002). La homogeneidad de las varianzas fue verificada con la prueba de Levene (95%) y los datos fueron normalizados con la fórmula  $Y = \text{Arcoseno } \sqrt{\%}$ ; los valores para el número de descendencias fueron normalizados con la fórmula  $\sqrt{Y + 0,5}$  (Steell y Torrie 1989).

## Resultados y Discusión

**Síntomas y porcentaje de incidencia.** En los lotes se encontraron parches de plantas cuyos síntomas fueron: amarillamiento, plantas de menor tamaño con hojas delgadas y de color verde pálido, secamiento progresivo a partir de los extremos apicales. Además la enfermedad progresa rápidamente a partir de pequeños focos de infección.

Las plantas con ataques avanzados presentan menor altura y pocas hojas, las cuales al inicio son flácidas y luego se secan; la parte subterránea manifiesta una deshidratación completa de los tejidos, con secamiento total de las membranas externas. También ocurre secamiento de raíces, necrosis de la corteza y pudrición húmeda de los tallos. Como signo característico se

percibe un olor a fermento, masas miceliales de diferentes tonalidades y abundantes poblaciones de ácaros en diferentes estados de desarrollo lo cual coincide con Cifuentes y Arcos (1987).

Como plantea Smith (1988), con frecuencia los síntomas aparecen solo en uno de los costados del tallo y avanzan hacia la parte superior de la planta, hasta que destruyen el follaje y por último causa la muerte de la planta. El porcentaje de plantas afectadas por el complejo ácaro-hongo en cultivos recién establecidos de cebolla no presentó diferencias estadísticas significativas para las dos localidades, con 11,0% en la vereda Alianza y 14,2% en San Francisco ( $t = 0,37$ ; g. l. = 1;  $P < 0,05$ ) lo mismo sucedió para el cultivo en estado maduro con porcentajes de 43,8% y de 38,4% para la vereda San Francisco y la vereda Alianza respectivamente ( $t = 0,37$ ; g. l. = 1;  $P < 0,05$ ). El porcentaje de incidencia aumentó en los cultivos maduros.

Estas similitudes son posiblemente resultado de prácticas de cultivo similares. Además, la mayor parte de los productores de cebolla en el departamento de Nariño son minifundistas y realizan un manejo empírico del cultivo en las diferentes etapas (Pumalpa 1983). La interacción en un ambiente adecuado, entre una planta y un agente patógeno agresivo determinan el desarrollo de una enfermedad. Esa interacción se conoce por el nombre de patosistema vegetal, cuyo estado depende de factores como la abundancia de unidades del agente infeccioso, la virulencia de las razas de éste, la naturaleza genética del hospedante, la edad de los tejidos de la planta al momento de producirse la infección y las condiciones del medio, que afectan tanto al hospedante como al organismo patógeno (Smith 1988).

**Identificación de los ácaros y los hongos.** Los ácaros que se encontraban en las plantas de cebolla con síntomas de amarillamiento fueron *R. echinopus* y *R. vincatus*. Los hongos aislados de las plantas afectadas fueron: *F. oxysporum*, *Phoma* sp., *Botrytis* sp. y *Gliocladium* sp.

**Prueba de patogenicidad de los ácaros.** Esta variable presentó diferencias para los tratamientos ( $F = 21,53$ ; g. l. = 2,6;  $P < 0,05$ ). El mayor porcentaje de plantas afectadas se dio al inocular el ácaro *R. echinopus* (56,7%). No hubo diferencias para el porcentaje de plantas afectadas por el ácaro *R. vincatus* (16,7%) y el testigo (0%).

Estos resultados guardan algunas similitudes con el cultivo de cebolla en países tan diferentes como Israel, Japón y los Estados Unidos donde los principales problemas son *R. echinopus* y *R. robini*, que son especies cosmopolitas. Por otra parte, su amplia gama de hospederos incluye cebolla, ajo, lirios y cereales entre otros. También se alimentan de materia orgánica del suelo; la mayor parte del daño causado por estos ácaros ocurre en las raíces y la placa basal (Jepson 1985). El daño de los ácaros es más grave en las plántulas de cebolla (Booth 1971), las plantas severamente dañadas eventualmente pierden sus raíces y se vuelcan. El daño también se manifiesta con infecciones de patógenos fungos y bacteriales que pueden entrar por las heridas abiertas por los ácaros.

**Prueba de patogenicidad de los hongos.** Se encontraron diferencias entre estas variables ( $F = 8,65$ ; g. l. = 6,6;  $P < 0,05$ ) Al inocular las plantas con los hongos *F. oxysporum*, *F. oxysporum* más *Phoma* sp. y *F. oxysporum* más *Botrytis* sp. se obtuvo los mayores porcentajes de incidencia con 43,3%, 40,0% y 30,0% respectivamente, sin presentar diferencias entre

sí. Pero si hay diferencias con respecto a la inoculación de los hongos *Botrytis* sp., *F. oxysporum* más *Gliocladium* sp., *Phoma* sp. y *Gliocladium* sp., los cuales incluso presentaron porcentajes de mortalidad de 6,7%, 3,3%, 3,3% y 0% respectivamente. Los anteriores tratamientos no presentaron diferencias entre sí.

El mayor porcentaje de plantas afectadas se dio con la inoculación de *F. oxysporum*, posiblemente por la capacidad del hongo para desdoblar polímeros químicamente complejos como la lignina y la queratina. Garret (1982), describe a *Fusarium* sp. como parte de los hongos celulocíticos, los cuales realizan la mayor parte de la descomposición, utilizando la celulosa y la hemicelulosa, materiales que comprenden hasta el 70% de la pared celular de la planta. Las interacciones de *F. oxysporum* con *Phoma* sp. y *Botrytis* sp., también presentan mortalidades altas, debido posiblemente a que estos hongos no presentaron interferencia en su desarrollo. Toda especie de hongo difiere de otra al menos en algún aspecto de su comportamiento, de tal manera que ellas pueden coexistir (Hudson 1988).

**Patogenicidad de la interacción ácaros-hongos.** El ANAVA para esta variable presentó diferencias para los tratamientos ( $F = 18,22$ ; g. l. = 3,8;  $P < 0,05$ ). Las plantas inoculadas con el ácaro *R. echinopus* más *F. oxysporum* tuvieron el mayor porcentaje de plantas afectadas (80,0%), sin presentar diferencias con respecto a las inoculadas individualmente con *F. oxysporum* y *R. echinopus*, (60,0% y 53,3% respectivamente). Los tratamientos anteriores presentan diferencias con respecto al testigo en el cual no hubo plantas afectadas.

La interacción *R. echinopus* más *F. oxysporum* presenta el mayor porcentaje de plantas afectadas debido posiblemente a que el ácaro facilita la entrada del hongo, haciendo que los compuestos de lignina presentes en la planta sean más asimilables para el hongo. *F. oxysporum* es un saprofito del suelo que ataca los sistemas radicales, aprovechando daños mecánicos o heridas causadas por insectos, en muchos casos se presenta en la planta como síntomas externos del ataque de estos organismos (Callow 1992).

Las enzimas producidas por algunas especies de *Fusarium* sp. no llegan a afectar los compuestos de "protección" de la planta como la celulosa (Mace 1981), estos organismos se valen de animales que ingieren parte del material original con las hifas del hongo que luego los depositan en sus heces. Al hacerlo, los animales trituran el material, haciéndolo más accesible a los microorganismos. En alguna etapa de su vida todos los microorganismos resultan afectados por las actividades de otros organismos Park (1987), por esta razón es de esperarse encontrar una cantidad de interacciones muy variadas. Algunas son indirectas, como cuando un organismo hace que un sustrato quede fácilmente disponible para otro.

**Reproducción de *Rhizoglyphus echinophus*.** Para esta variable el ANAVA presentó diferencias entre los tratamientos ( $F = 6,57$ ; g. l. = 5,12;  $P < 0,05$ ). Se encontró que el mayor número de ácaros se dio en el medio que contenía el hongo *F. oxysporum* con 78 individuos, sin presentar diferencias estadísticas significativas con los tratamientos que contenían *Botrytis* sp., *Phoma* sp., pseudotallo y *Gliocladium* sp., los cuales tuvieron 52, 36,4, 26,7 y 19,7 individuos respectivamente; el tratamiento en el cual se usó como medio de cultivo raíz de cebolla, fue el que tuvo el menor promedio con 2,7 individuos, presentándose diferencias estadísticas

significativas con el medio de cultivo que contenía *F. oxysporum*.

Lo anterior hace suponer que *R. echinophus* se encuentra directamente relacionado con la presencia de hongos, preferentemente con *F. oxysporum* pudiéndose encontrar un efecto sinérgico entre ellos, de acuerdo con el número de descendientes obtenidos al someter *R. echinophus* al medio con *F. oxysporum* se puede afirmar que el ácaro se alimenta del hongo o parte de él ya que el número de ácaros está directamente relacionado con el tipo de alimento del que dispone un organismo.

### Literatura Citada

- AGRIOS, G. 1988. Plant pathology. Academic press, Inc. New York: 3th. Ed. 803 p.
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Surrey. England. 18 p.
- CALLOW, J. 1992. Advances in botanical research. Burgess Publishing Company, Minnesota. 99 p.
- CIFUENTES, H.; ARCOS, E. 1987. Reconocimiento de ácaros, hongos y nematodos en el secamiento de la cebolla de rama *Allium fistulosum* (L.) en el Departamento de Nariño. Pasto, Colombia. Trabajo de grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. 62 p.
- GARRET, L. 1982. Microbiología. Mc Graw-Hill, México. Segunda edición. 826 p.
- HUDSON, H. 1988. New phytologist. Mc Graw-Hill, New York. 900 p.
- JARAMILLO, M.; HERNÁNDEZ, F. 1983. Raíz rosada de la cebolla de rama *Allium fistulosum* (L.) y su distribución en el departamento de Nariño. Pasto, Colombia. Trabajo de grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. 42 p.
- JEPSON, L. 1985. Mite injuries to economic plants. University of California press, EUA. 614 p.
- MACE, M. 1981. Fungal wilt diseases of plants. Academic press, New York. 230 p.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2002. Consolidado Agropecuario, Acuícola y Pesquero. Secretaría de Agricultura y Medio Ambiente. Gobernación de Nariño. 76 p.
- MONTGOMERY, D. 2002. Diseño y análisis de experimentos. Limusa S.A. Segunda edición. Mexico, D.F. 686 p.
- PARK, D. 1987. Ecology of soil fungi. Liverpool: University press. 233 p.
- PUMALPA, J. 1983. Identificación de problemas fitopatológicos del cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) su distribución e incidencia en el departamento de Nariño. Trabajo de grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. 87 p.
- SAS INSTITUTE. 2002. SAS Procedures Guide, Version 9. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- SMITH, I. 1988. European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 583 p.
- STEELL, R.; TORRIE, J. 1989. Bioestadística, principios y procedimientos. Mac Graw-Hill. México. Segunda edición. 642 p.

Recibido: 10-jul-2006 • Aceptado: 22-oct-2007

## Frecuencia de cópula de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Mating frequency of the Guatemalan potato moth *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)

DIEGO FERNANDO RINCÓN<sup>1</sup> y JAVIER GARCÍA G.<sup>2</sup>

**Resumen:** La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* es considerada una de las principales plagas del cultivo de la papa en Colombia. Actualmente, parte de los esfuerzos para controlar las poblaciones del insecto se enfocan en el desarrollo de metodologías para interrumpir su reproducción. Para esto, es necesario conocer el comportamiento y los factores que afectan el potencial reproductivo de *T. solanivora*. En el presente trabajo se determinó la frecuencia de cópula de *T. solanivora* y su efecto sobre el potencial reproductivo de los adultos. Para determinar la frecuencia de cópula de las hembras, se realizaron dos experimentos en donde se confinaron hembras y machos de *T. solanivora* en diferentes proporciones. Para determinar la frecuencia de cópula de los machos, se realizaron dos experimentos. En el primero se ofreció diariamente una hembra virgen a machos confinados individualmente. En el segundo se ofrecieron diferentes cantidades de hembras a machos individuales. La mayoría de las hembras copulan una vez y aquellas que copulan varias veces no obtienen un beneficio significativo sobre su potencial reproductivo ni sobre su longevidad. Los machos copulan en promedio cinco veces dependiendo de la cantidad de hembras disponibles. Se observó un declive significativo en el potencial reproductivo de los machos con el aumento del número de cópulas, aunque estos parecen tener la capacidad de dosificar la eyaculación de acuerdo con la cantidad de hembras disponibles. Se discute la viabilidad de la implementación de metodologías basadas en la captura masiva de machos para el control de *T. solanivora*.

**Palabras clave:** Comportamiento reproductivo. Fecundidad. Fertilidad. Poliandria. Poliginia.

**Abstract:** The Guatemalan potato moth *Tecia solanivora* is considered one of the most serious pests of the potato crop in Colombia. Currently, most efforts for controlling populations of the insect are focused in the development of methodologies to disrupt its reproduction. Therefore, it is necessary to understand the behavior and factors affecting the reproductive potential of *T. solanivora*. In this study the mating frequency of *T. solanivora* and its effect on adult reproductive potential was determined. To determine the mating frequency of females, two experiments were conducted in which males and females of *T. solanivora* were confined in different proportions. To establish the mating frequency of males, two experiments were carried out. In the first, one virgin female was offered daily to each male confined individually. In the second, different numbers of females were offered to an individual male. Most females mate just once, and those females that mate more than once do not obtain a significant benefit in their reproductive potential or in their longevity. Males mate an average of five times depending on the number of females available. A significant decline in male reproductive potential with increasing number of copulations was observed, although they seem to have the capacity to dose their ejaculation depending on the number of females available. The viability of the implementation of methodologies based on the mass capture of males for the control of *T. solanivora* is discussed.

**Key words:** Reproductive behavior. Fecundity. Fertility. Polyandry. Polygyny.

### Introducción

La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolný, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) actualmente es considerada uno de los insectos plaga de mayor importancia económica en el cultivo de la papa en Colombia (Herrera 1998; López-Ávila 2000; Espinal *et al.* 2005). El daño económico es causado por la larva, la cual, tan pronto emerge, penetra en el tubérculo formando galerías por las que va dejando exuvias y excrementos que propician, junto con patógenos secundarios, la pudrición del tubérculo (Arias 1996).

Estudios recientes (Bosa *et al.* 2005) han centrado su atención en el desarrollo de feromonas sexuales sintéticas para la interrupción de la reproducción de la plaga. Sin embargo, para la implementación exitosa de estas metodologías es indispensable adelantar estudios sobre el comportamiento reproductivo y los diferentes factores que afectan la fecundidad

y la fertilidad de la plaga. En los insectos con reproducción sexual, la cópula es indispensable para a la transferencia de esperma y tiene efectos importantes en la producción y fertilización de los huevos, la oviposición, e incluso en la longevidad de los adultos (Simmons 2001; Wedell *et al.* 2002). Debido a que no existe evidencia de partenogénesis en la polilla guatemalteca de la papa, la cópula representa un evento fundamental para la reproducción de esta especie (Torres *et al.* 1997; García *et al.* 2003).

La asimetría en el costo de producción de huevos y espermatozoides a menudo se ve reflejada en diferencias en el comportamiento reproductivo de las hembras y los machos. Las hembras maximizan su éxito reproductivo incrementando la producción de huevos viables, para lo que una o pocas cópulas son suficientes (Arnqvist y Nilsson 2000). No obstante, las hembras de los insectos pueden presentar diferentes grados de poliandria, es decir, tendencias para copular diferente

<sup>1</sup> Autor para la correspondencia: Biólogo. Laboratorio de Ecología y Comportamiento de Insectos. Programa Manejo Integrado de Plagas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Centro de Investigación "Tibaitatá", Kilómetro 14 vía a Mosquera (Cundinamarca). [drincon@corpoica.org.co](mailto:drincon@corpoica.org.co)

<sup>2</sup> M. Sc. Ciencias Agrarias. Área de Prevención y Riesgo de Plagas. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Edificio Cavipetrol, Carrera 13 No. 37 -37 piso 10, Bogotá D.C. [javier.garcia@ica.gov.co](mailto:javier.garcia@ica.gov.co)

número de veces. El grado de poliandria puede ir desde hembras que copulan una sola vez en su vida (monoandria) hasta hembras que copulan varias veces con diferentes machos. Paradójicamente, la poliandria es la estrategia reproductiva más común para los lepidópteros (Arnqvist y Nilsson 2000; Torres-Villa y Rodríguez-Molina 2004), aunque se ha discutido si realmente representa una mayor eficacia reproductiva para los individuos o especies que la presentan en mayor grado (Brown *et al.* 2004).

Para los machos, cada cópula ofrece la oportunidad de producir nueva descendencia, por lo que su éxito reproductivo se encuentra estrechamente relacionado con el número de hembras que éstos tienen la posibilidad de inseminar. Al respecto, Thornhill y Alcock (2001) y Trivers (1972) concluyen que la poliginia, es decir, copular tantas veces y con tantas hembras como sea posible, es la mejor estrategia para que los machos de los insectos maximicen su eficacia reproductiva. Sin embargo, Torres-Vila y Jennions (2005) enfatizan en el gasto energético que implica el apareamiento y concluyen que los machos vírgenes tienen un desempeño reproductivo mayor que el evidenciado por machos que han copulado previamente.

Vale anotar que los lepidópteros tienen una ventaja única para ser usados como modelo en el estudio del comportamiento reproductivo. Esto se debe a que, en estos insectos, la esperma es trasferida en paquetes (espermátóforos), uno por cópula, los cuales son retenidos en el tracto reproductor de las hembras a lo largo de sus vidas. Esto hace posible determinar el número de veces que éstas han copulado (Simmons 2001; Wedell 2005a, b).

El presente trabajo tuvo por objeto determinar la frecuencia de cópula de la polilla guatemalteca de la papa y su efecto sobre el potencial reproductivo de las hembras y los machos. Dicho efecto se determinó analizando la variación de la fecundidad, la fertilidad, la longevidad y la capacidad de producción de esperma de acuerdo con la ocurrencia de diferente número de cópulas. Se discute la viabilidad de la implementación de metodologías basadas en la captura masiva de machos para el control de *T. solanivora*.

### Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología y Comportamiento de Insectos del Programa de Manejo Integrado de Plagas en el Centro de Investigación "Tibaitatá" de Corpoica, localizado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca, Colombia) a una altitud de 2.550 msnm y una temperatura promedio de 19°C.

**Cría de los insectos.** Se estableció una cría de *T. solanivora* en la Unidad de Cría y Producción de Insectos del Centro de Investigación "Tibaitatá" de Corpoica, siguiendo la metodología descrita por Vargas *et al.* (2004). La cría se estableció a partir de tubérculos infestados con la plaga recolectados en las zonas rurales de los municipios de Motavita y Ventaquemada (Boyacá, Colombia).

**Frecuencia de cópula de las hembras.** Para establecer la frecuencia de cópula de las hembras de *T. solanivora* y el efecto del número de apareamientos sobre su fecundidad, fertilidad y longevidad, se realizaron dos experimentos teniendo en cuenta el posible efecto de la disponibilidad de machos vírgenes sobre la frecuencia de cópula de las hembras.

En el primer experimento, se confinaron 30 parejas de adultos recién emergidos de *T. solanivora* cada una en un frasco

de vidrio de 300 ml de capacidad. Los frascos se acondicionaron con un algodón impregnado con una solución de miel al 10%, se taparon y aseguraron con muselina y bandas elásticas, y se colocaron boca abajo sobre papel absorbente para recibir las posturas de los insectos. Las 30 parejas se mantuvieron bajo un fotoperíodo controlado de 10h: 14h (luz: oscuridad). Se realizaron observaciones cada 15 minutos durante las cuatro primeras horas de la foto-fase, período que coincide con la mayor actividad sexual de *T. solanivora* (Okunaga y Ochoa 1987; Torres *et al.* 1997). Las observaciones se realizaron por diez días durante los cuales se registró el número de apareamientos de cada pareja. Cada tercer día, se reemplazó el papel absorbente para contabilizar el número de huevos depositados y el porcentaje de eclosión. Una vez que se detectó la muerte natural de los insectos, se midió su tamaño usando para ello la longitud desde la punta de la cabeza hasta el ápice del ala anterior. Utilizando un estereomicroscopio Ernst Leitz® dotado con reglilla micrométrica, se diseccionaron las hembras para determinar el número y el área de los espermátóforos dejados por los machos.

Debido a que la disponibilidad de un solo macho podría ser insuficiente para determinar la frecuencia de cópula de las hembras (Dewsbury 1982; Simmons 2001), en el segundo experimento se conformaron siete grupos de una hembra con tres machos. Cada grupo se confinó en un frasco de vidrio de 300 ml de capacidad, tapado con muselina y colocado boca abajo sobre papel absorbente. Los machos introducidos en cada frasco se marcaron en el ápice del ala izquierda con marcadores metálicos Zig Poterman Calligraphy® de diferentes colores, de acuerdo con la metodología descrita por Sánchez (1999). Los siete grupos se mantuvieron bajo las mismas condiciones ya descritas. Diariamente, se realizaron observaciones cada 15 minutos durante las cuatro primeras horas de la foto-fase. Las observaciones se realizaron por diez días durante los cuales se registró el número de apareamientos de cada hembra. Para determinar si las hembras copularon con el mismo o con diferentes machos, se registró el color de la marca de los machos que se observaban en cópula. Cada tercer día se reemplazó el papel absorbente de las unidades experimentales para contabilizar el número de huevos depositados y el porcentaje de eclosión. Se realizaron disecciones de las hembras y los machos para determinar el número y el área de los espermátóforos encontrados en el interior de las hembras y el área de los testículos de los machos. Se registró además, la longitud de cada hembra desde la punta de la cabeza hasta el ápice del ala anterior.

El número de cópulas fue establecido de acuerdo con el número espermátóforos encontrados en el interior de las hembras. Estos datos fueron comparados con el número de cópulas observadas durante las cuatro primeras horas de la foto-fase. La fecundidad se calculó usando el número de huevos puestos por cada hembra y la fertilidad con el porcentaje de huevos que eclosionaron. La normalidad de las variables se probó mediante el procedimiento de Shapiro-Wilk. Para establecer si la proporción de sexos afectó la distribución de las frecuencias con las que ocurrieron las cópulas, se realizó un ANOVA. Para establecer si había diferencias significativas en el potencial reproductivo y la longevidad de hembras copuladas una o varias veces, se realizaron ANOVA para las variables distribuidas normalmente. Para eliminar el posible efecto del tamaño de las hembras sobre la fecundidad (Barah y Sengupta 1991; Calvo y Molina 2005; Heliövaara *et al.* 1990), se tomó en cuenta la longitud de cada una de estas como

covariable en el análisis. Para las variables que no se distribuyeron normalmente se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

**Frecuencia de cópula de los machos.** Para determinar el grado de poliginia de los machos de *T. solanivora* y el efecto de las cópulas sucesivas sobre el potencial reproductivo de las hembras, se realizaron dos experimentos teniendo en cuenta posibles modificaciones en el comportamiento reproductivo de los machos con la oferta de diferentes cantidades de hembras.

Para determinar el número de veces que puede copular un macho de *T. solanivora*, 30 machos vírgenes recién emergidos se ubicaron individualmente en frascos de vidrio de 300 ml acondicionados con un algodón impregnado con miel en agua al 10%, y tapados con muselina asegurada con una banda elástica. Cada 24 horas y por diez días, se introdujo una hembra virgen. Cuando las hembras cumplieron 24 horas con el macho, se retiraron y ubicaron individualmente en frascos de vidrio de 300ml. Estos frascos se acondicionaron de la misma manera que los anteriores y se colocaron boca abajo sobre un trozo de papel absorbente para recibir las posturas. Se contabilizó el número total de huevos puestos por cada hembra y el porcentaje de eclosión de las posturas.

Para establecer si la oferta de hembras influye sobre la frecuencia de cópula de los machos de *T. solanivora*, se llevó a cabo un experimento con cuatro tratamientos y cinco repeticiones. Los tratamientos consistieron en la exposición de diferentes cantidades de hembras a un macho así: 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Los grupos de insectos se confinaron en cámaras de vidrio de acuerdo con los tratamientos. Durante el experimento, se suministró un algodón impregnado con una solución de miel al 10% en el interior de cada una de las cámaras. Se permitió el contacto continuo de los adultos hasta su muerte. Se retiraron y diseccionaron diariamente las polillas que iban muriendo. Se registró la cantidad de espermatozoides dejados por los machos dentro de cada una de las hembras y el número de huevos puestos y de huevos eclosionados. Adicionalmente, para determinar el efecto del número de apareamientos sobre la capacidad de producción de esperma, se reportó el área de la bolsa testicular de cada macho utilizando un estereomicroscopio Ernst Leitz® dotado con reglilla micrométrica y siguiendo los procedimientos descritos por Simmons *et al.* (2000) y Ward y Simmons (1991).

Con el fin de analizar la relación entre el número de cópulas de los machos y la fecundidad (número de huevos puestos/hembra) y la fertilidad (porcentaje de eclosión) de las hembras ofrecidas individualmente, se calcularon coeficientes de correlación de Spearman ( $r_s$ ). Por otro lado, el efecto de los niveles de oferta de hembras sobre la frecuencia de cópula de los machos se analizó mediante ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Adicionalmente, se realizaron ANOVA para examinar la relación del número de cópulas de los machos con la fecundidad y la fertilidad de diferentes cantidades de hembras ofrecidas simultáneamente. Finalmente, para determinar la relación fenotípica entre el número de cópulas y el tamaño de la bolsa testicular, se realizó un análisis de regresión lineal simple. La normalidad de las variables se probó mediante el procedimiento de Shapiro-Wilk. Los datos se analizaron usando el software R versión 2.5.1 (R, Development Core Team 2007).

## Resultados y Discusión

**Frecuencia de cópula de las hembras.** En el primer experimento, de acuerdo con el número de espermatozoides encontrados en el interior de las 30 hembras confinadas con un macho, se encontró que el 80% copularon una vez (Fig. 1). Por otra parte, en el segundo experimento, de las siete hembras confinadas cada una con tres machos, el 71,43% copularon una vez, y el resto lo hicieron dos veces (Fig. 1). La proporción de sexos no afectó la distribución de las frecuencias con las que ocurrieron las cópulas ( $F = 0,032$ ; g. l. = 1, 35;  $P = 0,85$ ), lo que indica que la frecuencia de cópula de las hembras se mantiene constante independientemente de la disponibilidad de machos. La frecuencia de cópula promedio de las hembras de una especie determina el nivel de competencia espermática que los machos tienen que afrontar, y por ende, la confianza de la paternidad. Wedell (2005a, b) enumera los diferentes mecanismos que los machos de los lepidópteros pueden utilizar para suprimir la receptividad de las hembras y evitar la competencia espermática, a saber: (1) transferencia de antiafrodisiacos, (2) colocación de tapones anexos al espermatozoides (sphrag), (3) presencia física del espermatozoides y de la esperma y (3) transferencia de sustancias inhibitorias de la síntesis de feromona sexual.

Al comparar el potencial reproductivo de las hembras que copularon una vez con las que lo hicieron varias veces, no se observó que el número de cópulas tuviese un efecto significativo sobre la fertilidad (Kruskal-Wallis;  $H_{1,37} = 0,005$ ;  $P = 0,94$ ) ni sobre la fecundidad ( $F = 2,08$ ; g. l. = 1,33;  $P = 0,169$ ) (Fig. 2). Los resultados evidencian que un número elevado de cópulas no trae beneficios significativos sobre el potencial reproductivo de las hembras, al menos cuando éstas

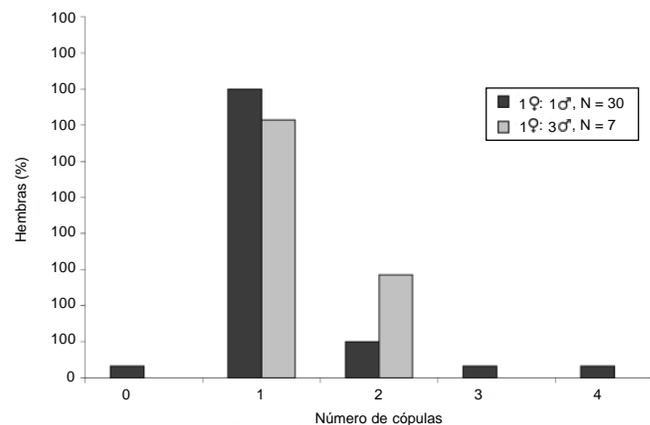


Figura 1. Frecuencia de cópula de las hembras de *Tecia solanivora*.

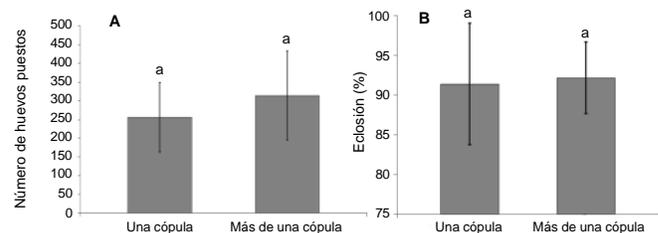


Figura 2. Fecundidad (número de huevos puestos) (A) y fertilidad (porcentaje de eclosión) (B) de hembras de *Tecia solanivora* que copularon una y varias veces. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes.  $\alpha = 0,05$ .

tienen la oportunidad de copular con machos vírgenes. En condiciones de campo, requerir un elevado número de cópulas puede disminuir la sobrevivencia de las hembras por el incremento de la exposición a depredadores y patógenos, e incrementar el hostigamiento de machos afectando el tiempo y la energía destinados para la oviposición (Simmons 2001). Contrario a lo esperado, no se observó un efecto significativo del tamaño de las hembras sobre la fecundidad (covariable;  $F = 2,80$ ; g. l. = 1,33;  $P = 0,10$ ), por lo que es posible omitir esta variable en futuros estudios relacionados con la fecundidad de *T. solanivora* realizados en condiciones similares. Esta característica ha sido observada en varias especies de lepidópteros (Boggs 1986), incluyendo la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Gelechiidae) (Fenemore 1977).

Diferentes revisiones (Simmons 2001; Arnqvist y Nilsson 2000; Torres-Vila y Rodríguez-Molina 2004) concluyen que, en general, altos niveles de poliandria incrementan la oviposición y la fertilidad de los huevos en los insectos. Sin embargo, es común observar que el nivel de poliandria varíe entre especies e incluso dentro de una misma especie. Wedell *et al.* (2002) afirman que los grados de poliandria son condiciones que deben verse como “estilos de vida” establecidos en el acervo genético de las poblaciones. Según estos autores, las hembras poliandras son exitosas captando los recursos proveídos por los machos durante la cópula para luego invertirlos en la producción de huevos fértiles. Las hembras monoandras, por su parte, son exitosas obteniendo los recursos por sí mismas, y aunque generalmente son menos fecundas, viven más tiempo.

Por otro lado, se observó que el espermátforo encontrado en las hembras que copularon una vez es más grande que el mayor de los espermátforos encontrados en las hembras que copularon varias veces, con  $1,49 \text{ mm}^2$  (DE = 0,11) y  $1,32 \text{ mm}^2$  (DE = 0,09) respectivamente ( $F = 3,63$ ; g. l. = 1,34;  $P = 0,06$ ). Esto sugiere que el tamaño del espermátforo recibido en la primera cópula puede jugar un papel importante en la variación del nivel de poliandria de las hembras de *T. solanivora*. Se ha reportado que el tamaño del espermátforo varía dependiendo esencialmente del tamaño del macho (Wedell 2005) y de los apareamientos que este haya sostenido previamente (Simmons 2001). Si la receptividad de las hembras para nuevos apareamientos depende del tamaño del primer espermátforo,

en el campo el porcentaje de hembras que copulan en más de una oportunidad variaría dependiendo de la oferta de machos. Torres-Vila y Jennions (2005) concluyen que si el primer espermátforo que recibe una hembra es relativamente pequeño, el nivel de poliandria de la hembra se incrementa. Distintos autores (Simmons 2001; Boggs y Gilbert 1979; Simmons y Parker 1989) proponen la hipótesis de inversión parental para explicar el efecto del tamaño del espermátforo sobre el potencial reproductivo de las hembras. Esta hipótesis sugiere que las donaciones nutricionales suministradas por los machos durante la cópula para su utilización en la producción de huevos y el mantenimiento somático de las hembras (inversión parental) son directamente proporcionales al tamaño del espermátforo. De esta manera cuando el tamaño de la inversión parental es insuficiente, la receptividad de las hembras se incrementa. Sin embargo, esta explicación ha sido cuestionada en razón a que se ha encontrado muy poca evidencia que soporte la relación positiva entre el tamaño del espermátforo y el contenido nutricional donado durante la cópula (Marshall y McNeil 1989).

El número de espermátforos encontrados en el interior de las hembras no coincidió con el número de cópulas observadas. Sólo el 47,90% de los apareamientos ocurrieron durante las horas de observación (cuatro primeras horas de la foto-fase), y el restante 52,1% ocurrió en horas diferentes, presuntamente durante las primeras horas de penumbra. Esto sugiere que el periodo de actividad sexual de la polilla guatemalteca de la papa no está restringido a las primeras horas de la mañana, como es sugerido por Torres *et al.* (1997) y Okunaga y Ochoa (1987). En cambio, es posible que en las horas de la tarde exista una actividad sexual importante. Debido a esto, no fue posible establecer con exactitud la procedencia de los espermátforos encontrados y determinar si las hembras que copularon más de una vez lo hicieron con uno o con varios machos.

Contrario a lo esperado, se encontró que las hembras de *T. solanivora* que copulan más de una vez no exhiben mayor longevidad ( $F = 0,008$ ; g. l. = 1,34;  $P = 0,92$ ). Es posible que este incremento no haya sido observado, debido a que todas las hembras mantuvieron una oferta constante de alimento que a la postre impediría observar la diferencia nutricional entre las hembras que copularon una vez y las que lo hicieron varias veces. Es ampliamente aceptado que el espermátforo transferido por el macho a la hembra durante la cópula contiene sustancias nutritivas que proveen beneficios indirectos como el incremento en la tasa de producción de huevos y en el tiempo de vida de las hembras (Simmons 2001; Wedell *et al.* 2002).

**Frecuencia de cópula de los machos.** Se encontró que los machos de *T. solanivora* copulan en promedio 5,03 veces (DE = 2,33). De los 30 machos utilizados en el experimento, el 29,03% copularon cinco veces (Fig. 3). Es importante anotar que en el campo el gasto energético de los insectos es mayor. Por este motivo, es probable que la frecuencia de cópula de los machos de *T. solanivora* sea menor en el cultivo, especialmente cuando la densidad del insecto es baja.

En general, el potencial reproductivo de los machos se redujo con el incremento en el número de apareamientos. La fecundidad, representada en el número de huevos puestos, se redujo linealmente con la cantidad de cópulas ( $r_s = -0,47$ ;  $P < 0,001$ ) (Fig. 4). Igualmente, la fertilidad representada en el porcentaje de eclosión de los huevos, disminuyó con el aumento en el número de cópulas ( $r_s = -0,34$ ;  $P = 0,001$ ) (Fig. 5).

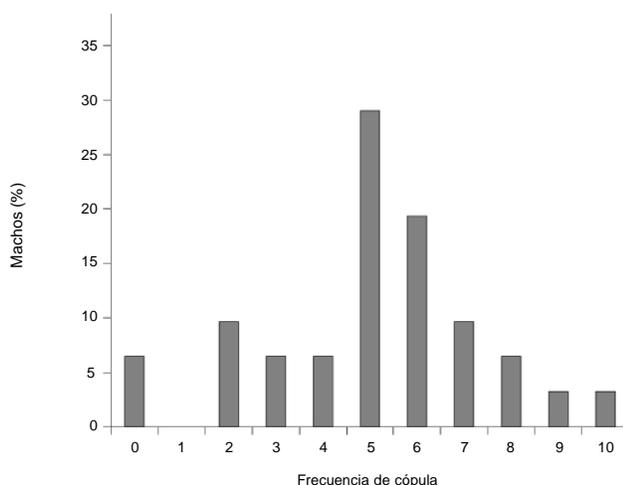
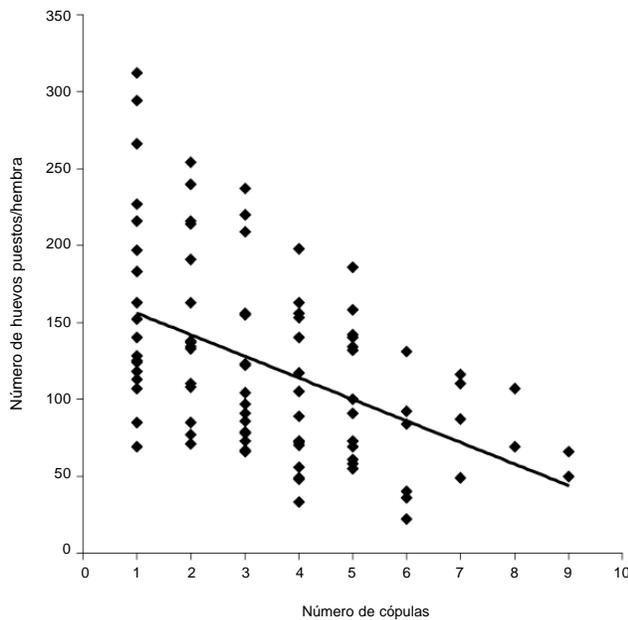


Figura 3. Frecuencia de cópula de los machos de *Tecia solanivora*.

Pese a que el éxito reproductivo de los machos generalmente se encuentra asociado con una frecuencia de apareamiento alta (Trivers 1972; Thornhill y Alcock 2001), se ha comprobado que la producción de esperma es costosa (Dewsbury 1982). Este costo puede verse reflejado en una disminución considerable en el desempeño sexual de los machos que sostienen múltiples copulas en términos de número de espermatozoides, tamaño del espermátforo, estimulación de la hembra para la producción de huevos, e inhibición de la hembra para nuevos apareamientos (Simmons 2001; Lewis 2004). Torres-Vila y Jennions (2005) demuestran que las hembras de los lepidópteros que copulan con machos vírgenes tienen una mayor fecundidad que las hembras que lo hacen con machos que han copulado previamente.

Por otra parte, cuando se ofrecieron simultáneamente diferentes cantidades de hembras a machos confinados individualmente, se observó que la cantidad de hembras disponibles tuvo un efecto significativo en la frecuencia de cópula de los machos ( $F = 10,79$ ; g. l. = 3,16;  $P < 0,001$ ). Los machos que permanecieron en contacto con ocho hembras copularon significativamente más veces que los machos que fueron confinados con una menor cantidad de hembras (Fig. 6). Contrario a lo esperado, en este experimento la fertilidad y la fecundidad de las hembras no se observaron afectadas por el número de cópulas de los machos ( $F = 0,60$ ; g. l. = 5,10;  $P = 0,70$ .  $F = 1,93$ ; g. l. = 5,10;  $P = 0,17$ ; respectivamente).

Los resultados sugieren que la frecuencia de apareamiento de los machos de *T. solanivora* varía dependiendo de la cantidad de hembras disponibles en el ambiente. No obstante, se observó que estos alcanzan un promedio de cinco cópulas cuando se ofrece una cantidad ilimitada de hembras. Con respecto al potencial reproductivo, en el primer experimento se evidenció que cuando el macho percibe una baja cantidad de hembras en el ambiente, éste parece incrementar su eyacuación durante la cópula, lo que provoca un declive significativo en la fecundidad y la fertilidad de apareamientos

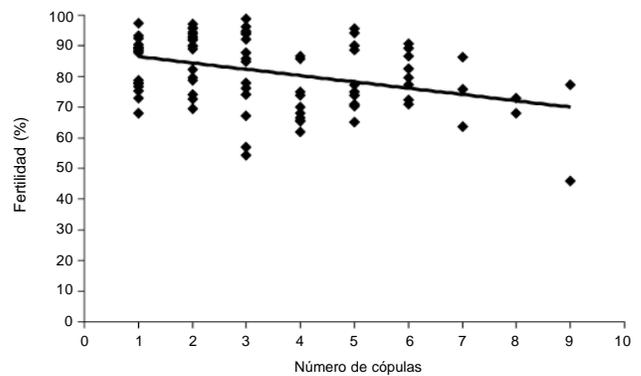


**Figura 4.** Relación entre el número de cópulas de los machos y la fecundidad de las hembras de *Tecia solanivora* representada por el número de huevos puestos.

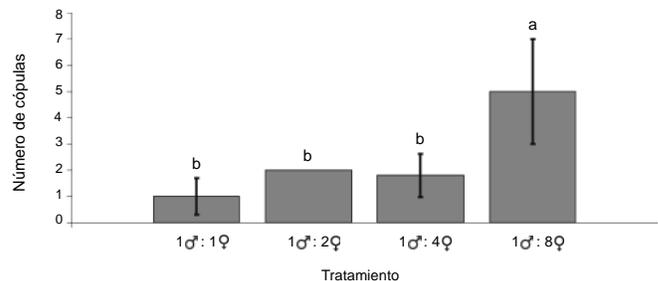
posteriores. En cambio, cuando en el segundo experimento se incrementó la cantidad de hembras disponibles en el ambiente, el macho parece contar con la capacidad de dosificar la eyacuación con el fin de maximizar su eficacia reproductiva, copulando y dejando descendencia con tantas hembras como sea posible.

Parker (1998) afirma que los machos de diferentes especies de insectos pueden ajustar su gasto en eyacuación de acuerdo con el riesgo de competencia espermática para asegurar el éxito en la fertilización. Adicionalmente, se ha comprobado que los machos usan diferentes señales para estimar el riesgo de competencia espermática, incluyendo la presencia de competidores potenciales, el grado de poliandria de las hembras, y la densidad de la población (Simmons 2001; Gage 1991, 1995; Yamane y Miyatake 2005). En particular, Yamane y Miyatake (2005) en experimentos realizados con *Callosobruchus chinensis* (L. 1758) (Coleoptera: Bruchidae) encontraron que los machos pertenecientes a linajes con bajos niveles de poliandria eyaculan una mayor cantidad de esperma cuando son criados en densidades bajas, en comparación con las eyacuaciones de aquellos que son criados en densidades altas. El efecto opuesto se observó en linajes con altos niveles de poliandria. La monoandria reduce el riesgo de competencia espermática, por lo que los machos pueden incrementar su eficacia reproductiva disminuyendo la eyacuación en las diferentes cópulas para invertir más esperma y nutrientes en futuros apareamientos.

Se encontró que el área promedio de la bolsa testicular de los machos de *T. solanivora* es de 0,420 mm<sup>2</sup> (DE = 0,065).



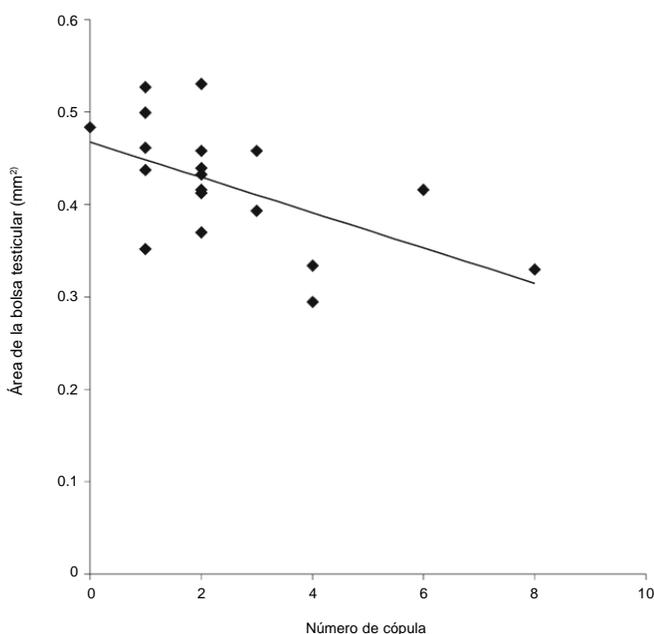
**Figura 5.** Relación entre el número de cópulas de los machos y la fertilidad de las hembras de *Tecia solanivora* representada en el porcentaje de eclosión de los huevos.



**Figura 6.** Número de cópulas registradas a partir del número de espermátforos encontrados en las hembras. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes.  $\alpha = 0,05$ .

Sin embargo, se observó una disminución significativa del tamaño de esta estructura con el aumento en el número de cópulas de los machos ( $r^2 = 0,30$ ;  $F = 7,75$ ;  $P = 0,01$ ) (Fig. 7). De acuerdo con Chapman (2004), el sitio en donde se almacena el esperma en los machos de los lepidópteros es la vesícula seminal, que se ubica por fuera de la bolsa testicular en el punto de convergencia de los vasos deferentes con los ductos de las glándulas accesorias. Baker *et al.* (2003) reportan que no existe relación fenotípica entre el tamaño de los testículos y la frecuencia de cópula de los machos de *Cyrtodiopsis dalmanni* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Diopsidae). Sin embargo, el encogimiento de los testículos, es un efecto que ha sido comprobado como consecuencia de cópulas sucesivas, e incluso ha sido utilizado en diversos estudios como medida de la cantidad de esperma transferida (Ward y Simmons 1991; Martin y Hosken 2002; Simmons *et al.* 2000). Es conveniente realizar trabajos encaminados a profundizar en el estudio de esta relación fenotípica en los machos de *T. solanivora*, debido a que su comprensión es de gran utilidad para el desarrollo de modelos matemáticos que permitan estimar el número de cópulas que ha sostenido un macho de acuerdo con el tamaño de su bolsa testicular. Esta estimación podría ser utilizada para realizar diagnósticos de la efectividad de diferentes metodologías de control, y para pronosticar el daño que puede presentarse en condiciones de cultivo.

**Implicaciones y perspectivas.** Actualmente, las trampas cebadas con feromona sexual son utilizadas para la vigilancia y el seguimiento de las poblaciones de la polilla guatemalteca en el campo (López-Ávila y Espitia-Malagón 2000). Sin embargo, la captura masiva de machos de la plaga, utilizando esta feromona sexual como atrayente, difícilmente constituye una alternativa de control debido a que su eficacia máxima de captura es sólo del 15% de la población de machos (Sánchez 1999). Para que la captura masiva de machos con trampas de feromona sexual sea eficiente, es necesario reducir la población



**Figura 7.** Relación entre el número de cópulas y el área de la bolsa testicular de machos de *Tecia solanivora*.

de machos de la plaga lo suficiente para provocar: (a) que un porcentaje importante de hembras no copulen, o (b) que éstas copulen con machos que, al haber sostenido apareamientos previos, reduzcan significativamente su potencial reproductivo. Para determinar la cantidad de machos que es necesario remover mediante sistemas de captura masiva, es preciso establecer el motivo de la variación en el grado de poliandria de las hembras de la polilla guatemalteca de la papa.

Existen dos posibles explicaciones para la variación en el grado de poliandria de *T. solanivora*. La primera radica en el tamaño del espermatozoides producido durante la primera cópula. Si bien se evidenció que las hembras de *T. solanivora* disminuyen su potencial reproductivo cuando se aparean con machos que han copulado previamente, también se observó que el tamaño del espermatozoides de la primera cópula puede ser determinante para incrementar el grado de poliandria de las hembras. De acuerdo con Simmons (2001), los machos que han tenido apareamientos anteriores producen espermatozoides más pequeños que los machos que copulan por primera vez. Esto sugiere que cuando una hembra de *T. solanivora* se aparee con un macho que ha copulado previamente, éste produce un espermatozoides tan pequeño que incrementa la receptividad de la hembra para nuevos apareamientos incrementando así su potencial reproductivo. Otra posible explicación sugiere que el grado de poliandria es una característica establecida en el genotipo de las hembras, es decir, que este comportamiento es heredado. Esto se ha observado en diferentes especies de insectos como *Pieris napi* (L., 1758) (Lepidoptera: Pieridae) (Wedell *et al.* 2002), *Gryllus integer* Scudder, 1902 (Orthoptera: Gryllidae) (Solymar y Cade 1990) y *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (Diptera: Drosophilidae) (Pyle y Gromko 1981).

A la luz de estas posibilidades, es fundamental adelantar estudios encaminados a determinar la causa de la variación en el grado de poliandria de las hembras de la polilla guatemalteca de la papa con el fin de establecer la viabilidad de las metodologías de control basadas en la captura masiva de machos. Si el grado de poliandria puede ser alterado por las hembras en procura de maximizar su potencial reproductivo, las metodologías de control basadas en la captura masiva de machos podrían resultar inviables en la práctica. En este caso, asumiendo que los machos de *T. solanivora* copulan en promedio cinco veces y que las hembras pueden expresar su potencial reproductivo ya sea copulando una vez con machos vírgenes, o varias veces con machos no vírgenes, habría que diseñar sistemas de trapeo con la capacidad de remover al menos un 80% de la población de machos para alcanzar una reducción significativa de la población. Esto en razón a que, en teoría y sólo bajo estas condiciones, únicamente el 20% de las hembras tendrían la posibilidad de copular con machos vírgenes, y las hembras restantes no tendrían la oferta suficiente de machos para poder expresar plenamente su potencial reproductivo. Si, por otro lado, el grado de poliandria es una característica establecida en el genotipo de *T. solanivora*, es posible obtener una disminución considerable de la población en la siguiente generación del insecto acorde con la eficacia de las trampas de feromona sexual.

#### Agradecimientos

A Diana del Pilar Ojeda por su apoyo en la generación del proyecto de investigación. A Jesús Gómez Benavides por su apoyo logístico durante el desarrollo del trabajo. A Aristóbulo

López-Ávila, Diego Cuadros, Ricardo Pérez y al grupo de investigación en Entomología del C.I. "Tibaitatá" de Corpoica. El trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia a través del Centro Virtual de Investigación de la Cadena Agroalimentaria de la Papa (Cevipapa).

### Literatura Citada

- ARIAS, J. 1996. Evaluación de la incidencia y severidad de daño de la polilla gigante de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en Antioquia. En: Seminario experiencias y avances en el manejo de la polilla guatemalteca de la papa (1997, Bogotá D. C.) Memorias de Seminario. Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen), Bogotá D.C.
- ARNQVIST, G.; NILSSON, T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour* 60: 145-154.
- BAKER, R.; DENNIFF, M.; FUTERMAN, P.; FOWLER, K.; POMIANKOWSKI, A.; CHAPMAN, T. 2003. Accessory gland size influences time to sexual maturity and mating frequency in the stalk-eyed fly, *Cyrtodiopsis dalmanni*. *Behavioral Ecology* 14: 607-611.
- BARAH, A.; SENGUPTA, A. 1991. Correlation and regression studies between pupal weight and fecundity of muga silkworm *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae) on four different foodplants. *Acta Physiologica Hungarica* 78 (3): 261-264.
- BOGGS, C. 1986. Reproductive strategies of female butterflies: variation in and constraints on fecundity. *Ecological Entomology* 11 (1): 7-15.
- BOGGS, C.; GILBERT, L. 1979. Male contribution to egg production in butterflies: evidence for transfer of nutrients at mating. *Science* 206: 83-84.
- BOSA, C.; COTES, A.; FUKUMOTO, T.; BENGTSSON, M.; WITZGALL, P. 2005. Pheromone-mediated communication disruption in Guatemalan potato moth, *Tecia solanivora*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 114: 137-142.
- BROWN, W.; BJORK, A.; SCHNEIDER, K.; PITNICK, S. 2004. No evidence that polyandry benefits females in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 58 (6): 1242-1250.
- CALVO, D.; MOLINA, M. 2005. Fecundity-body size relationship and other reproductive aspects of *Streblote panda* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Annals of the Entomological Society of America* 98 (2): 191-196.
- CHAPMAN, R. 2004. *The Insects: Structure and Function*. 4th Edition. Cambridge University Press. Cambridge (UK).
- DEWSBURY, D. 1982. Ejaculate cost and male choice. *American Naturalist* 119: 601-610.
- ESPINAL, C.; MARTÍNEZ, H.; PINZÓN, N.; BARRIOS, C. 2005. La cadena de la papa en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio de Agrociencias, Bogotá D.C. Colombia.
- FENEMORE, P. 1977. Oviposition of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae); fecundity in relation to mated state, age, and pupal weight. *New Zealand Journal of Zoology* 4: 187-191.
- GAGE, M. 1991. Risk of sperm competition directly affects ejaculate size in the Mediterranean fruit fly. *Animal Behaviour* 42: 1036-1037.
- GAGE, M. 1995. Continuous variation in reproductive strategy as an adaptive response to population density in the moth *Plodia interpunctella*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 261: 25-30.
- GARCÍA, J.; OJEDA, D.; LÓPEZ-ÁVILA, A. 2003. Determinación de hábitos reproductivos de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae), pp. 158-163. En: *Tecia solanivora* II Taller Nacional. Abril 24 – 25. Memorias.
- HELIOVAARA, K.; VÄISÄNEN, R.; VARAMA, M. 1990. Fecundity and egg viability in relation to female body size in *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae). *Holarctic Ecology* 13 (2): 166-172.
- HERRERA, F. 1998. La polilla guatemalteca de la papa. Biología, comportamiento y prácticas de manejo integrado. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Bogotá D.C. (Colombia), 15 p.
- LEWIS, S. 2004. Multiple mating and repeated copulations: effects on male reproductive success in red flour beetles. *Animal Behaviour* 67: 799-804.
- LÓPEZ-ÁVILA, A. 2000. Insectos plaga del cultivo de la papa en Colombia y su manejo. Papas Colombianas 2000, con el mejor entorno ambiental. 25 años Fedepapa. Ventana al Campo Andino 3 (1-2): 152-159.
- LÓPEZ-ÁVILA, A.; ESPITIA-MALAGÓN, E. 2000. Plagas y benéficos en el cultivo de la papa en Colombia. Boletín técnico divulgativo. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas. Corpoica-Pronatta. Editorial Produmedios. Bogotá D.C., Colombia. 35 p.
- MARSHALL, L.; McNEIL J. 1989. Spermatophore mass as an estimate of male nutrient investment: a closer look in *Pseudaletia unipuncta* Haworth (Lepidoptera: Noctuidae). *Functional Ecology* 3: 605-612.
- MARTIN, O.; HOSKEN, D. 2002. Strategic ejaculation in the common dung flies *Sepsis cynipsea*. *Animal Behaviour* 63: 541-546.
- OKUNAGA, Y.; OCHOA, R. 1987. Estudio de la dinámica reproductiva de la palomilla de papa *Scrobipalopsis solanivora* y relación natalidad-mortalidad para *S. solanivora* y *Phthorimaea operculella*. En: XII Reunión ANAP. Panamá, 9 al 13 de marzo, p. 402-418.
- PARKER, G. 1998. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. En: Birkhead, T; Moller, A. (eds.). *Sperm competition and sexual selection*. Academia Press, London, pp. 3-54.
- PYLE, D.; GROMKO, M. 1981. Genetic basis for repeated mating in *Drosophila melanogaster*. *American Naturalist* 117: 133-146.
- R, DEVELOPMENT CORE TEAM. 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.
- SÁNCHEZ, M. 1999. Efecto de la trampa de feromona sexual en el Monitoreo de poblaciones de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny). Trabajo de grado para optar al título de Biólogo. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología. Bogotá D.C., Colombia. 143 p.
- SIMMONS, L. 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Monographs in behavior and ecology*. Princeton University Press. Oxford (UK). 434 p.
- SIMMONS, L.; PARKER G. 1989. Nuptial feeding in insects: mating effort versus parental investment. *Ethology* 81: 332-343.
- SIMMONS, L.; TOMKINS, J.; ALCOCK, J. 2000. Can minor males of Dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni* (Hymenoptera: Anthophorini) compensate for reduced access to virgin females through sperm competition? *Behavioral Ecology* 11: 319-325.
- SOLYMAR, B.; CADE, W. 1990. Heritable variation for female mating frequency in field crickets, *Gryllus integer*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 26: 73-76.
- THORNHILL, R.; ALCOCK, J. 2001. *The evolution of insect mating systems*. Harvard University Press, Cambridge (United Kingdom).
- TORRES, F.; NOTZ, A.; VALENCIA, L. 1997. Ciclo de vida y otros aspectos reproductivos de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado Táchira, Venezuela. *Boletín Entomología Venezolana* 12 (1): 81-94.

- TORRES-VILA, L.; JENNIONS, M. 2005. Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57: 318-326.
- TORRES-VILA, L.; RODRÍGUEZ-MOLINA, C. 2004. Polyandry and fecundity in Lepidoptera: can methodological and conceptual approaches bias outcome? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55: 315-324.
- TRIVERS, L. 1972. Parental investment and sexual selection, pp. 136-179. En: Campbell, B. (ed.) *Sexual selection and the descent of man, 1871-1971*. Aldine, Chicago.
- VARGAS, B.; RUBIO, S.; LÓPEZ-ÁVILA, A. 2004. Estudios de hábitos y comportamiento de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en papa almacenada. *Revista Colombiana de Entomología* 30 (2): 211- 217.
- WARD, P.; SIMMONS, L. 1991. Copula duration and testes size in the yellow dung fly, *Scathophaga stercoraria* (L.): The effects of diet, body size, and the mating history. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 29: 77-85.
- WEDELL, N. 2005a. Sperm competition in butterflies and moths, pp. 49-81. En: *Insect Evolutionary Ecology*. M. Fellowes y G. Holloway (eds.). Royal Entomological Society. CABI Publishing, CAB International. Wallingford (Reino Unido).
- WEDELL, N. 2005b. Female receptivity in butterflies and moths. *The Journal of Experimental Biology* 208: 3433-3440.
- WEDELL, N.; WIKLUND, C.; COOK, P. 2002. Monoandry and polyandry as alternative lifestyles in a butterfly. *Behavioral Ecology* 13 (4): 450-455.
- YAMANE, T.; MIYATAKE, T. 2005. Intra-specific variation in strategic ejaculation according to level of polyandry in *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Insect Physiology* 51: 1240-1243.

Recibido: 9-ene-2007 • Aceptado: 28-oct-2007

## *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) depredador en el cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

*Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) predator in tobacco crops (*Nicotiana tabacum*)

KATERINE VALDERRAMA<sup>1</sup>, JAIME GRANOBLES<sup>2</sup>, EDISON VALENCIA<sup>3</sup>, MANUEL SÁNCHEZ<sup>4</sup>

**Resumen:** Se identificaron las plagas del Tabaco (*Nicotiana tabacum*) y sus enemigos naturales en las principales zonas cultivadas de Colombia. Se efectuaron muestreos semanales durante dos ciclos de cultivo. Se observó que el hemíptero Miridae *Nesidiocoris tenuis*, es depredador. Las presas son tres de las principales plagas del tabaco: *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* y *Myzus persicae*. El tabaco está asociado a poblaciones de estas plagas desde el semillero hasta la final del cultivo. *N. tenuis* ha sido considerado hasta ahora por los productores de tabaco como un enemigo para su cultivo y realizan aplicaciones de insecticidas para su control. Para tener más información sobre *N. tenuis*, se evaluó su hábito depredador en campo y su respuesta funcional en laboratorio sobre las presas *T. vaporariorum* y *M. persicae*. Se establecieron colonias del depredador y de las presas en jaulas en el centro experimental la Tupia (Candelaria, Valle). En cajas de Petri se ubicaron ninfas de *T. vaporariorum* con un adulto del depredador. También se colocaron ninfas y adultos de *M. persicae* en platos petri con un adulto del depredador. *N. tenuis* depreda la mosca blanca preferentemente cuando son ninfas de primero y segundo estado mientras que prefiere ninfas grandes y adultos de *M. persicae*. Esta investigación es un aporte hacia la eficiencia y competitividad de este cultivo en las zonas productoras del país, debido a la problemática actual de plagas de cada zona y al desconocimiento de los controladores biológicos asociados al cultivo del tabaco en Colombia.

**Palabras clave:** *Trialeurodes*. *Bemisia*. *Myzus*. Depredación. Tabaco.

**Abstract:** Pests of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and their natural enemies crops were identified in the main cultivated areas of Colombia. Weekly sampling was carried out over two cycles of the crop. The hemipteran Miridae *Nesidiocoris tenuis* was observed to be a predator. The main prey are three of the major pests of tobacco crops: *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* and *Myzus persicae*. Tobacco is associated with populations of these pests from the nursery to the final harvest. Up to now *N. tenuis* has been considered by tobacco farmers to be an enemy of their crop and they make pesticide applications for its control. To obtain additional information on *N. tenuis*, its predatory habits in the field and its functional response in the laboratory on the prey *T. vaporariorum* y *M. persicae* were evaluated. Colonies of the predator and prey were established in cages at La Tupia field station (Candelaria, Valle). Nymphs of *T. vaporariorum* were placed in Petri dishes with one adult predator. Nymphs and adults of *M. persicae* were also put in Petri dishes with one adult predator. *N. tenuis* preferentially preys on first and second instar whiteflies while it prefers larger nymphs and adults of *M. persicae*. This research is a contribution toward the efficiency and competitiveness of this crop in cultivated areas of the country, due to the current pest problems in each area and the lack of knowledge on the biological agents associated with tobacco crops in Colombia.

**Key words:** *Trialeurodes*. *Bemisia*. *Myzus*. Predatory. Tobacco.

### Introducción

El cultivo del tabaco viene ganando importancia en el desarrollo agrícola colombiano, por lo que se adapta a terrenos pobres y con escasez de agua, que son condiciones poco rentables para otros cultivos (Corporación Colombia Internacional 2001). Desde la década de los noventa el área de tabaco cultivada en promedio por año fue de 14.790 ha, con la cual se generaron más de 2,5 millones de jornales por año, lo que en términos de empleo equivale a poco menos de 15.000 anuales (Espinal *et al.* 2005). La cadena productiva del tabaco también es una importante generadora de recursos fiscales para la nación y los departamentos, lo que convierte a este cultivo en un importante sector productivo.

Entre las principales plagas limitantes para la producción de tabaco están las moscas blancas, *Bemisia tabaci* Gennadius,

1889 y *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, 1856, y el áfido *Myzus persicae* Sulzer, 1776. Estas especies causan daño directo por la extracción de savia (Hilje 1993). Estos insectos también pueden ser vectores de virus como el TYLCV (Virus del enrollado foliar amarillo del tomate), mosaico del tabaco, mosaico del pepino entre otros (Conti *et al.* 2000). Estas plagas han presentado aumentos de población en todas las zonas productoras del país debido a diversos factores, pero principalmente al mal uso de los productos para su control, favoreciendo el desarrollo de resistencia a los insecticidas, impactos negativos sobre los enemigos naturales, y grandes pérdidas en la producción. Actualmente para el manejo de estas plagas no se tienen estrategias de manejo integrado debido a que existe un desconocimiento general de las especies plaga presentes en cada zona y los enemigos naturales asociados al cultivo. El control biológico se presenta como una de las

<sup>1</sup> Autor de correspondencia. Investigadora. Programa MIP Bayer CropScience S.A. [katerine.valderrama@bayercropScience.com](mailto:katerine.valderrama@bayercropScience.com), [katerine.valderrama@gmail.com](mailto:katerine.valderrama@gmail.com)

<sup>2</sup> Gerente de Cultivos de Clima Calido, Bayer CropScience S.A. [jaime.granobles@bayercropscience.com](mailto:jaime.granobles@bayercropscience.com)

<sup>3</sup> Director Agricultura Sostenible, Bayer CropScience S.A. [edison.valencia@bayercropScience.com](mailto:edison.valencia@bayercropScience.com)

<sup>4</sup> Dirección de Cadenas Productivas, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. [msanches@minagricultura.gov.co](mailto:msanches@minagricultura.gov.co)

principales herramientas dentro de un manejo integrado de plagas, por esta razón se buscaron los enemigos naturales (Depredadores y parasitoides) de estas plagas, asociados al cultivo en las zonas tabacaleras del país. El principal enemigo natural encontrado es la especie zoofitófaga *Nesidiocoris tenuis* (Reuter, 1895) (Hemiptera: Miridae). Este hemíptero es erróneamente considerado por los productores tabacaleros como una plaga para el cultivo. Para tener más información respecto a *N. tenuis*, se evaluó su hábito depredador en campo y de igual manera en condiciones de laboratorio se estudió su respuesta funcional, preferencia y patrón de ataque sobre las presas *T. vaporariorum* y *M. persicae*.

### Materiales y Métodos

**Muestreos de campo.** Se efectuaron muestreos en los departamentos de Huila, Santander, Norte de Santander y Valle del Cauca (Colombia) para determinar las localidades con presencia del depredador *N. tenuis*. Se seleccionaron los municipios con mayor área cultivada de cada departamento así: en Norte de Santander, el municipio de Abrego, (8°04'48"N, 73°13'14"W y 1.395 msnm); en Santander los municipios de San Gil (6°33'23"N, 73°07'57"W y 1.117 msnm) y Capitanejo (6°31'44"N, 72°41'50"W y 1.100 msnm); en Huila los municipios de Campoalegre (2°41'10"N, 75°19'05"W y 531 msnm) y Garzón (2°11'44"N, 75°37'41"W y 830 msnm). Se estableció una parcela experimental de 5.000 m<sup>2</sup> en cada municipio con plantas de tabaco rubio sembradas a 0,45 x 1,0 m. El manejo agronómico de las parcelas se hizo igual en todas las zonas, utilizando insecticidas selectivos al depredador. El muestreo se realizó en espiral concéntrico, en cada parcela se marcaron 100 estaciones al azar, cada estación correspondió a una planta (Duque 1988), donde se contó el número de individuos depredadores y plaga. El muestreo se realizó durante dos ciclos de cultivo cada siete días, desde la siembra (semillero en bandejas flotantes) hasta el inicio de la cosecha. Las muestras se contaron y para la determinación taxonómica se utilizaron las referencias de Carvalho y Costa (1994), Goula (1985, 1994), Goula y Alomar (1994) debido a que este insecto no había sido reportado en el cultivo del tabaco en Colombia.

**Respuesta funcional sobre *Trialeurodes vaporariorum* y *Myzus persicae*.** Este experimento se realizó en los laboratorios del Centro Experimental la Tupia ubicado en Candelaria, Valle del Cauca, (3°24'37"N, 76°20'51"W y 975 msnm). Se estableció un cultivo de tabaco rubio en materas (40 x 40 x 50 cm) con suelo esterilizado, las cuales se introdujeron en jaulas

para obtener colonias del depredador *N. tenuis* y de las presas *T. vaporariorum* y *M. persicae*. Se tomaron muestras en campo de *N. tenuis* en todos los estados ninfales y adultos, con los cuales se infestaron las plantas de tabaco en una jaula de 2 x 2 x 2 m. Para la dieta se utilizaron ninfas de mosca blanca (*T. vaporariorum*) y áfidos (*M. persicae*) y otros insectos fitófagos que se establecieron en el tabaco. En jaulas de 1,20 x 1,0 x 1,0 m se infestaron las plantas de tabaco con ninfas de *T. vaporariorum*. En el caso de *M. persicae* se estableció la colonia en plantas de ajonjolí (*Sesamun indicum* L) en jaulas de 1,20 x 1,0 x 1,0 m. Las colonias se mantuvieron en la estación experimental con temperatura de 24,0 ± 5,0°C y humedad relativa de 83 ± 6%.

Para encontrar la respuesta funcional de *N. tenuis* sobre *T. vaporariorum* y *M. persicae*, así como su preferencia por presas en cajas de petri, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), seis tratamientos para *T. vaporariorum* y seis tratamientos para *M. persicae* con 50 repeticiones. Las evaluaciones se realizaron cada dos, cuatro, ocho, 12 y 24 horas. Para *T. vaporariorum* se ubicaron hojas de tabaco infestadas con ninfas provenientes de la colonia. Las ninfas se agruparon en dos estados de desarrollo, ninfas de primero y segundo estado y ninfas de tercero y cuarto estado. En cajas de Petri de cada uno de los grupos de ninfas, se ubicaron 20, 40, 60, 80, 100, 120 ninfas. En el caso de *M. persicae* para encontrar la respuesta funcional también se agruparon en dos estados de desarrollo, ninfas de tercero y cuarto estado y el segundo grupo con adultos (de acuerdo con las observaciones de campo), se ubicaron 15, 30, 45, 60, 75 y 90 presas (tratamientos) por caja de petri.

Por cada una de las cajas de Petri en los dos casos con *T. vaporariorum* y *M. persicae* se ubicó un adulto de *N. tenuis* (finalizada la muda de la ninfa cinco) el cual tuvo un ayuno previo de 24 horas (Aplen y Jervis 1996). Durante las evaluaciones también se observó el patrón de ataque y la preferencia frente a cada una de las presas. Se realizaron análisis de varianza con el paquete estadístico SAS v. 8.2 (SAS Institute 1985).

### Resultados y Discusión

**Muestreos de campo.** *N. tenuis* estuvo presente en todas las zonas muestreadas productoras de tabaco rubio del país (Tabla 1), desde los 442 msnm hasta los 1.470 msnm. En cada uno de los municipios se observó que *N. tenuis* se ubica en el estrato superior de las plantas de tabaco. Se observaron cinco estados ninfales pero es a partir del cuarto que presenta hábito depredador. Las ninfas de *N. tenuis* desde cuarto estado y sus

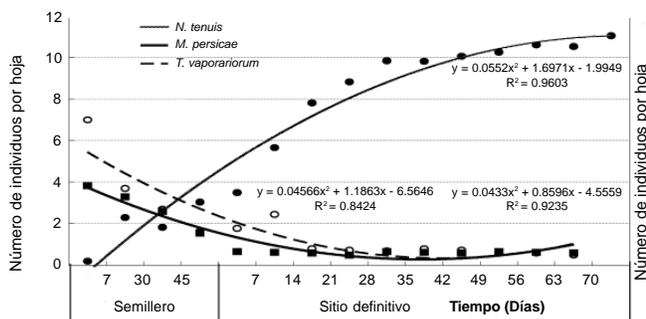
**Tabla 1.** Municipios muestreados de las zonas tabacaleras donde está presente *Nesidiocoris tenuis*.

Departamento	Municipios	Coordenadas geográficas	Altitud msnm
Huila	Neiva, Algeciras, Altamira, Campoalegre, Garzón, Guadalupe, Hobo, Rivera, Tesalia, Yaguara.	Desde 2°55'48"N, 75°17'07"W hasta 2°01'31"N, 75°46'24"W	442 – 1.078
Norte de Santander	Abrego, La playa, Ocaña.	Desde 8°14'01"N, 73°21'16"W hasta 8°04'48"N, 73°13'14"W	1.205 – 1.395
Santander	Barichara, Capitanejo, Curiti, Los Santos, Mogotes, San Gil, Villanueva.	Desde 6°45'22"N, 73°06'08"W hasta 6°33'23"N, 73°07'57"W	1.100 – 1.470
Valle del Cauca	Palmira, Candelaria	Desde 3°31'43"N, 76°17'57"W hasta 3°24'37"N, 76°20'51"W	963 – 1.003

adultos presentan preferencia por las ninfas de primer y segundo estado de *T. vaporariorum*; sin embargo, depreda ninfas de *T. vaporariorum* en todos los estados de desarrollo. En el otro caso, frente a *M. persicae*, *N. tenuis* depreda preferentemente ninfas de cuarto estado y adultos.

En campo se observó un aumento de la población de *N. tenuis* durante el desarrollo del cultivo y una marcada tendencia a disminuir la población de plagas (Fig. 1) atribuida al control biológico, porque no se realizaron aplicaciones de insecticidas para el control de las plagas (*T. vaporariorum* y *M. persicae*). También se encontraron otros enemigos naturales de mosca blanca como el parasitoide *Amitus fuscipennis* MacGown y Nebeker, 1978 y los hemípteros depredadores *Macrolophus* sp. y *Dichypus* sp. esta tendencia se observó en todas las zonas evaluadas. El periodo crítico en el cultivo para el establecimiento de las plagas corresponde a los primeros 30 días en sitio definitivo. Con la presencia de este depredador se observó una relación depredador: plaga promedio de 4:1. Se observó a *N. tenuis* depredando otros insectos asociados al cultivo del tabaco y plagas de importancia económica como larvas de *Heliothis tergeminus* (Felder y Rogenhofer, 1872) y adultos de *Epitrix* sp. (Coleoptera). Dependiendo de la disponibilidad del alimento principal *N. tenuis* depreda otros insectos fitófagos asociados, lo que garantiza la presencia del predador en el cultivo aunque haya bajas densidades de la presa. Observaciones de campo mostraron que *N. tenuis* presentó hábito depredador sobre diferentes insectos plaga mostrando una preferencia por moscas blancas *T. vaporariorum* y *B. tabaci*. Lacasa y Contreras (1998) reportan que entre las potenciales especies de insectos como alimento se pueden encontrar minadores, pulgones, ácaros, trips y mosca blanca, por lo cual se puede afirmar que este depredador es generalista. Las otras especies como *Macrolophus* sp. y *Dicyphus* sp. se encontraron asociadas en los cultivos de tabaco; sin embargo, la especie predominante en todas las zonas muestreadas fue *Nesidiocoris tenuis*.

El desconocimiento general de los productores sobre *N. tenuis*, y los daños ocasionados por plagas como mosca blanca y áfidos, hacía que confundieran a *N. tenuis* como una plaga, y cuando aumentaba la población de *N. tenuis* realizaban aplicaciones de control. Varios Hemiptera, Miridae juegan un papel importante como depredadores de las moscas blancas *B. tabaci* y *T. vaporariorum* en países europeos (Castañé *et al.* 2000). En cultivos de tomate, *N. tenuis* es capaz de eliminar totalmente la mosca blanca (Carnero *et al.* 2000). Lo que apoya la idea que *N. tenuis* es muy versátil y tiene un gran papel en el

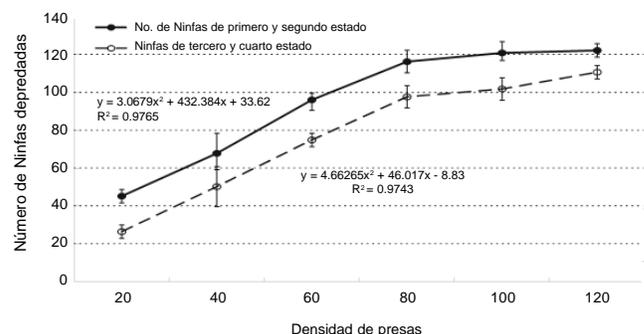


**Figura 1.** Dinámica poblacional de *M. persicae*, (*Eje izq.*) y *T. vaporariorum* (*Eje der.*) en relación con el depredador *N. tenuis* (*Eje izq.*). Los datos se presentan hasta el inicio de la cosecha en promedios de evaluaciones semanales durante dos ciclos de cultivo.

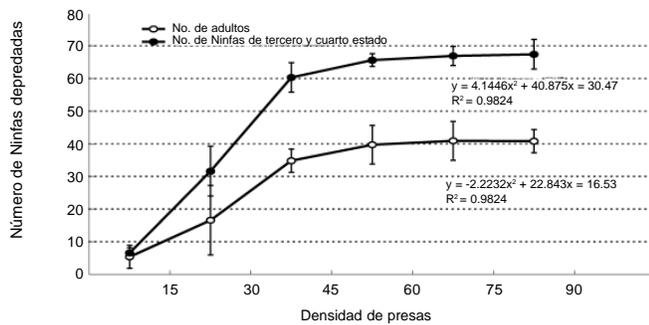
cultivo del tabaco debido a que controla los principales vectores de virus.

**Respuesta funcional sobre *Trialeurodes vaporariorum* y *Myzus persicae*.** *N. tenuis* busca las ninfas, las pincha con el aparato bucal por la parte posterior del cuerpo y succiona aproximadamente  $3 \pm 0,4$  segundos y abandona la presa. Las ninfas después de ser succionadas mueren en  $30 \pm 16$  segundos y la sintomatología es un orificio hundido. La respuesta funcional de *N. tenuis* sobre ninfas de primer y segundo estado de *T. vaporariorum* es de tipo II (Fig. 2) el número de individuos depredados en 24 horas alcanza los 120. Existe un aumento inicial en la tasa de consumo del depredador con el aumento de la densidad de presas pero se produce una disminución en la velocidad de depredación después de las 60 presas ofrecidas, hasta dejar de consumir y saciarse (120 presas). En el caso de la respuesta funcional sobre las ninfas de tercer y cuarto estado (Fig. 2), se observa la misma tendencia que la respuesta sobre las ninfas de primer y segundo estado, sin embargo, en los estados avanzados de *T. vaporariorum* el número de presas consumidas es menor y tiene un alcance máximo de 105 presas en 24 horas. Entonces, se podría afirmar que existe una preferencia por las ninfas de estados iniciales; probablemente por la poca o nula movilidad y la relación de tamaño entre el depredador y la presa, favorable para el depredador. Esta desaceleración a las seis horas de evaluación puede deberse a que el depredador tiene una cantidad limitada de su tiempo para realizar la búsqueda de presas y cada presa le demanda un determinado tiempo y energía para consumirla y buscar una nueva. A medida que aumenta la abundancia de presas, es cada vez más fácil ubicarlas pero la manipulación demanda el mismo tiempo.

El hábito depredador frente a *M. persicae* requiere un mayor gasto de energía para el depredador. De acuerdo con las observaciones, *N. tenuis* golpea con las patas delanteras las ninfas y adultos de *M. persicae* y los abandona temporalmente ( $40 \pm 10$  segundos aproximadamente). Posteriormente regresa y sostiene la presa con las patas delanteras y succiona el abdomen. La respuesta funcional de *N. tenuis* sobre *M. persicae* (Fig. 3), presenta un aumento inicial en la tasa de consumo con el aumento de la densidad de presas hasta un punto de inflexión en el cual comienza la desaceleración hasta alcanzar un máximo o saciarse, similar a la respuesta sobre *T. vaporariorum* (tipo II). Por lo cual se puede afirmar que la respuesta funcional de *N. tenuis* sobre *M. persicae* es de tipo III. La respuesta tipo II es encontrada en la mayoría de los



**Figura 2.** Respuesta funcional tipo II de *N. tenuis* sobre ninfas de *T. vaporariorum*. Los datos se presentan en promedios de cinco evaluaciones realizadas a las 24 horas en 50 repeticiones por tratamiento.



**Figura 3.** Respuesta funcional tipo III de *N. tenuis* sobre ninfas de tercer y cuarto estado y adultos de *M. persicae*. Los datos se presentan en promedios de cinco evaluaciones realizadas a las 24 horas en 50 repeticiones por tratamiento.

estudios que envuelven insectos depredadores (Ambrose y Claver 1995, 1997). La respuesta tipo III es más común en vertebrados (Holling 1965) aunque algunos artrópodos también pueden presentar este tipo de respuesta cuando no están delante sus presas predilectas (Jervis y Kidd 1996; Hassel *et al.* 1976). De esta forma, *M. persicae* puede que no sea la presa predilecta de *N. tenuis*. En este tipo de respuesta funcional que habitualmente se origina en incrementos de la densidad de la presa lleva a un aumento en la eficiencia de búsqueda del depredador o a una disminución de su tiempo de manipulación.

Los depredadores de marcada respuesta funcional como es *N. tenuis* pueden poseer la capacidad de estabilizar las poblaciones de sus presas. La respuesta funcional de un depredador mide su tasa de consumo en función de la disponibilidad de la presa y en ambos casos el depredador alcanza un nivel de saturación a altas densidades de presas (*T. vaporariorum* y *M. persicae*). Esto ocurre cuando el depredador se sacia. Las evidencias empíricas sugieren que los depredadores con marcada respuesta funcional, especialmente aquellos que pueden consumir presas alternativas con facilidad y por lo tanto suelen presentar respuesta sigmoidea (tipo III), poseen mayor capacidad de estabilizar las poblaciones de sus presas (Schmitz 1995; Norrdahl y Korpimäki 2000; Erlinge *et al.* 1984).

*N. tenuis* cambia el tipo de respuesta funcional entre sus dos presas *T. vaporariorum* y *M. persicae*. En *T. vaporariorum* la distribución de las ninfas es desagregada en las hojas, lo cual hace que busque la presa demandándole más energía. Sin embargo, la relación en tamaño es importante, notando la nula movilidad de las ninfas lo que le permite a *N. tenuis* consumir un número mayor de presas. A diferencia de *T. vaporariorum*, *M. persicae* se distribuye agregado en la planta, dando mayor disponibilidad de presas al depredador, sin embargo, éste gasta más tiempo y energía en someterlas debido a su movilidad, por lo cual consume un número de presas menor.

### Conclusiones

*Nesidiocoris tenuis* está presente como un depredador predominante en todas las zonas tabacaleras evaluadas, que abarcan las importantes zonas productoras del país. El depredador presentó un alto consumo de presas por día con una respuesta funcional tipo II para *T. vaporariorum* y tipo III para *M. persicae*. Dependiendo de la presa cambia su respuesta funcional y su comportamiento de depredación es generalista debido a que también depreda insectos fitófagos y otras plagas de importancia económica.

Es importante reevaluar el papel de este insecto en el cultivo del tabaco, debido a que por algunos productores por desconocimiento es catalogado como plaga. Con este trabajo se comprobó el hábito depredador frente al principal complejo de plagas transmisores de virus *T. vaporariorum* y *M. persicae* en el cultivo del tabaco. Por lo anterior *N. tenuis* se constituye en una herramienta potencial de control biológico para la implementación de programas de manejo integrado de plagas en el cultivo del tabaco en Colombia. Asimismo, colaborando a una producción limpia y sostenible con el fin de mejorar la eficiencia y competitividad de este cultivo en las zonas productoras del país.

### Agradecimientos

Este trabajo hace parte de los resultados del proyecto de investigación “Diseño e implementación de un modelo de Manejo Integrado de Plagas para el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum*) en Colombia”. Convenio Bayer CropScience S.A.- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Los autores expresan agradecimientos a las siguientes personas, instituciones y empresas por sus contribuciones. Al Ministerio de Agricultura por su contribución económica. A la compañía Bayer CropScience S.A. por la dirección y aportes económicos y recursos para el desarrollo de la investigación.

### Literatura Citada

- AMBROSE, D. P.; CLAVER, M. A. 1995. Functional response of *Rhynocoris fuscipes fabricius* (Heteroptera: Reduviidae) to *Riptortus clavatus* Thunberg (Heteroptera: alydidae). *Journal of Biological Control* 9: 74-77.
- AMBROSE, D. P.; CLAVER, M. A. 1997. Functional and numerical responses of the reduviid predator, *Rhynocoris fuscipes* F. (Het., Reduviidae) to cotton leafworm *Spodoptera litura* F. (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 121:333-336.
- APLEN, J. J. M. VAN; JERVIS M. A. 1996. Foraging behaviour, pp. 1-62. En: Jervis, M. A.; Kidd, N. A. C. (eds.). *Insect natural enemies: practical approaches to their study and evaluation*. Chapman & Hall, London, United Kingdom. 723 p.
- CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL CCI. 2001. Acuerdo de competitividad de la cadena productiva del tabaco en Colombia. Bogotá. 54 p.
- CARNERO, A.; DÍAZ, S.; AMADOR, S.; HERNÁNDEZ M.; HERNÁNDEZ, E. 2000. Impact of *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera, Miridae) on whitefly populations in protected tomato crops. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23 (1): 259.
- CARVALHO, J.; COSTA, L. 1994. The genus *Fulvius* from the Americas (Hemiptera: Miridae). *Anales de Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, ser. Zoología*, 65 (1): 63-135
- CASTAÑÉ, C.; ALOMAR, O.; GOULA M.; GABARRA, R. 2000. Natural populations of *Macrolophus caliginosus* and *Dicyphus tamaninii* in the control of the greenhouse whitefly in tomato crops. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23 (1): 221-224.
- CONTI M., D.; GALLIELLI, V.; LISA, O.; LOVISOLO, G.; MARTELLI, A.; RAGOZZINO, G.; RANA, C. 2000. Principales virus de las plantas hortícolas. Ediciones mundi prensa, Bayer. España. 206 p.
- DUQUE, M. C. 1988. Disposición espacial y muestreo de artrópodos. *Miscelánea Sociedad Colombiana de Entomología*. Bogotá. 45 p.
- ERLINGE S, G.; GORANSSON, G.; HOGSTEDT, G.; JANSSON, O.; LIBERG, J.; LOMAN, I.; NILSSON, T.; VON S.; SYLVÉN, M. 1984. Can vertebrate predators regulate their prey? *American Naturalist* 123: 125-133.

- ESPINAL, C.; MARTÍNEZ, H.; PINZÓN, N.; BARRIOS, C. 2005. La cadena del tabaco en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agro cadenas Colombia. 44 p.
- GOULA, M. 1985. *Cyrtopeltis (Nesidiocoris) tenuis* Reuter 1895 (Heteroptera: Miridae), nueva cita para la Península Ibérica, pp. 93-102. En: Segundo Congreso Ibérico de Entomología. Lisboa. Suplemento 1, volumen 3.
- GOULA, M. 1994. Notas miridológicas, 3. Boletín Asociación Española de Entomología 17 (2): 357.
- GOULA, M.; ALOMAR, O. 1994. Miridos (Heteroptera: Miridae) de interés en el control integrado de plagas en el tomate. Guía para su identificación. Boletín Sanidad Vegetal de Plagas 20: 131-143.
- HASSEL, M. P.; LAWTON, J. H.; BEDDINGTON, J. R. 1976. The components of arthropod predation. Journal of Animal Ecology 45: 135-164.
- HILJE, L. 1993. Un esquema conceptual para el manejo integrado de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en el cultivo del tomate. Manejo integrado de plagas (Costa Rica) 10: 51-57.
- HOLLING, C. S. 1965. The functional response of predators to prey density and its role mimicry and populational regulation. Memoirs of the Entomological Society of Canada 45: 1-60.
- JERVIS, M. A.; KIDD, N. A. 1996. Insect natural enemies: practical approaches to their study and evaluation. Chapman & Hall. London, 491 p.
- LACASA, A.; CONTRERAS, J. 1998. En la sanidad del cultivo del tomate. Ediciones. Phytoma. Valencia. 127 p.
- NORRDAHL, K.; KORPIMÄKI, E. 2000. Do predators limit the abundance of alternative prey? Experiments with vole-eating avian and mammalian predators. Oikos 91: 528-540.
- SAS Institute, Inc. 1985. SAS User's guide: Statistics, SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- SCHMITZ, O. J. 1995. Functional responses of optimal consumers and the potential for regulation of resource populations. Wildlife Research 22: 101-113.

Recibido: 6-feb-2006 • Aceptado: 8-sep-2007

## Nota científica

**Sexing the “drop-drop” beetle, *Psiloptera pertyi* (Coleoptera: Buprestidae)**Sexando el escarabajo “cai-cai”, *Psiloptera pertyi* (Coleoptera: Buprestidae)RODOLFO MOLINARIO DE SOUZA<sup>1</sup>, NORIVALDO DOS ANJOS<sup>2</sup>, JANAÍNA DE NADAI<sup>3</sup>,  
RODRIGO DINIZ SILVEIRA<sup>4\*</sup>, GLAUCIA CORDEIRO<sup>3</sup>

**Abstract:** The sexual description of adult *Psiloptera pertyi* was carried out through observations of their external morphological characteristics. Males have their first five abdominal sternites, as well as the seventh and eighth, strongly sclerotized. Females have a similar morphology except the eighth abdominal sternite is not sclerotized. Males have a prominent apex on the seventh sternite, while females have a deep incision in the apical margin of the same segment. Males also have a triangular incision in the extreme posterior margin of the fifth sternite; in females, this segment is rounded. The number and form of the abdominal sternites should be taken into account for sexing adults of *P. pertyi*.

**Key words:** Sexual dimorphism. Eucalyptus pest.

**Resumen:** La descripción sexual de los adultos de *Psiloptera pertyi* se realizó a través de observación de sus características morfológicas externas. Los machos presentan los cinco primeros esternitos abdominales, así como el séptimo y octavo, fuertemente esclerotizados. Las hembras presentan morfología semejante, excepto por el octavo esternito abdominal que no es esclerotizado. Los machos tienen una fuerte proyección en el séptimo esternito, mientras que las hembras tienen una profunda incisión en el margen posterior del mismo segmento. Los machos también presentan una incisión triangular en el extremo posterior del margen del quinto esternito; en las hembras, este segmento es redondeado. El número y la forma de los esternitos abdominales deben ser considerados para sexar los adultos de *P. pertyi*.

**Palabras clave:** Dimorfismo sexual. Plaga del eucalipto.

**Introduction**

Many problems have arisen with eucalyptus plantations, as has happened with other monocultures, and pest outbreaks are included among these problems. Some papers have reported on the occurrence of *Psiloptera* spp. attacking young plantations of eucalyptus in Brazil (Berti Filho 1981; Anjos and Majer 2003; Vellozo *et al.* 1953; Zanuncio *et al.* 1986; Ribeiro *et al.* 2001). Adults of these insects are tree defoliators that destroy the lateral branches and main shoot, stopping apical growth and reducing wood production (Anjos and Majer 2003). Since the knowledge on life history is one of the basic premises to a successful control of insect pests, sexual differentiation is basic to understand their reproductive habits (Weber 1976; Lima 2001). The purpose of this paper is to report on the morphological characters that allow sexing in *Psiloptera pertyi* (Laporte & Gory, 1836), without dissection.

**Materials and Methods**

Adults of *P. pertyi* were collected from Grão Mogol region, northeast of Minas Gerais State, in November 2003, were stored in plastic containers filled with 70% ethanol. Sexual identity was previously obtained through dissections to ascertain the presence of an aedeagus. Then the external morphology of determined males and females was studied. Morphological details were examined through stereoscopic 40X microscope.

We looked for characters that were useful to differentiate each sex, such as the shape of urosternites and elytra (Macrae 2003; De Nadai *et al.* 2005), sclerite colors (Rejzek 2007; Piper *et al.* 2005) and body measurements (Nelson 1994; De Nadai *et al.* 2005). Body length is the distance between the anterior margin of the head and the apex of elytra. The body width is the longest distance between lateral margins of body (Anjos 1992). Evaluation of morphological characters was carried out on 50 males and 50 females. Morphological measurements were then compared by one-way ANOVA.

**Results**

We note eleven abdominal segments for both males and females. The 1<sup>st</sup> to 5<sup>th</sup> uromeres are distinguishable, but others are retracted inside the fifth. After relaxing the specimens and lifting the apical opening of the 5<sup>th</sup> abdominal sternite, we located both the 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> uromeres in males, but only the 7<sup>th</sup> in females.

In *P. pertyi* males, we found a sharp projection just in the central apex of the 7<sup>th</sup> abdominal sternite (Fig. 1A). In contrast, females possess a deep notch in the same position (Fig. 1B). Additionally, we found a notch in the posterior border of 5<sup>th</sup> abdominal sternite for males; females have a rounded margin in the equivalent sternite. No consistent color differences were detected between males and females of *P. pertyi*. Females have body dimensions statistically larger than males (length: F =

<sup>1</sup> Ms. Produção Vegetal, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 36571-000. [molinariodesouza@yahoo.com.br](mailto:molinariodesouza@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Dr. Entomologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 36571-000. [nanjos@ufv.br](mailto:nanjos@ufv.br)

<sup>3</sup> Ms. Entomologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 36571-000. [janadenadai@insecta.ufv.br](mailto:janadenadai@insecta.ufv.br); [glacordeiro@hotmail.com](mailto:glacordeiro@hotmail.com)

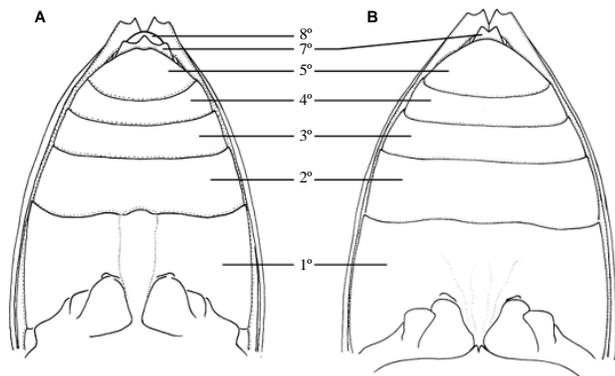
<sup>4\*</sup> Autor para correspondencia. Dr. Entomologia, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brasil. 39100-000. [silveirard@insecta.ufv.br](mailto:silveirard@insecta.ufv.br)

63,68; d. f. = 1;  $P < 0,01$  and width:  $F = 22,53$ ; d. f. = 1;  $P < 0,01$ ) (Table 1) but ranges are overlapping. So, adults can not be differentiated through length or width measurements.

### Discussion

According to Hastir and Gaspar (2002), sexual dimorphism in buprestids varies in different species, but most variations occur in margin shape of the last sternite abdominal. In some cases, as in *Lampetis* spp (De Nadai *et al.* 2005), this is applicable, but *Acmaeodera lupinae* Nelson, 1996 females have 5<sup>th</sup> urosternite more elongated than in the male (Nelson 1996). According to Gigli (2007), body color may be used to differentiate sex in some buprestids. Females in *Anthaxia nitidula* (L., 1758) species have the head color different from body color, but males are uniformly colored along their body (Rejzek 2007). In contrast, females in *Agrilus hyperici* (Creutzer, 1799) species are uniformly colored while male beetles have their head color different from the rest of the body (Piper *et al.* 2005).

In insects, the females are usually larger than the males (Snodgrass 1993), but overlapping intervals for body dimensions were found by Nelson (1996) in *Acmaeodera vanduzeei* VanDyke, 1934; *A. ephedrae* Barr, 1942; *A. constricticollis* Knull, 1937 and *A. barri* Cazier, 1940 and by De Nadai *et al.* (2005) in *Lampetis nigerrima* (Kerremans, 1897), *L. instabilis* (Castelnau & Gory, 1836), and *L. roseocarinata* Thomson, 1878 (De Nadai *et al.* 2005). So, *P. pertyi* adults have similar dimensions. Finally, we conclude that adults of *P. pertyi* have morphological differentiations in the abdomen. Sexing adults in Buprestidae species should be done by checking the shape of the 7<sup>th</sup> abdominal sternite, only



**Figure 1.** Abdominal morphology in *Psiloptera pertyi* (Laporte & Gory) male (A) and female (B).

**Table 1.** Body size (mm) for *Psiloptera pertyi* (Laporte & Gory) males (n = 50) and females (n = 50). Specimens from Grão Mogol, Minas Gerais, 2003.

Adults	Length (Mean and interval)	Wide (Mean and interval)
Female	30,6 a (23,0 - 34,0)	11,8 a (9,0 - 13,0)
Male	27,1 b (22,0 - 29,0)	10,9 b (8,0 - 12,0)

<sup>1</sup> Means followed by the same letter, in the same column, do not differ between them ( $P < 0,01$ ).

after 5<sup>th</sup> abdominal sternite is opened for careful internal examination.

### Acknowledgments

This work would not be possible without the financial support from CAPES. We are grateful to both of these institutions.

### Literature Cited

- ANJOS, N. 1992. Taxonomia, ciclo de vida e dinâmica populacional de *Costalimaita ferruginea* (Fabr., 1801) (Coleoptera: Chrysomelidae), praga de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae). Tesis de Doctorado en Entomologia. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 165 p.
- ANJOS, N.; MAJER, J. D. 2003. Leaf-eating beetles in Brazilian eucalypt plantations. *School of Environmental Biology* 23 (1): 10-11.
- BERTI FILHO, E. 1981. Insetos associados a plantações de espécies do gênero *Eucalyptus* nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 176 p.
- DE NADAI, J.; ANJOS, N.; SOUZA, R. M.; SILVEIRA, R. D. 2005. Dimorfismo sexual em *Lampetis* spp. (Coleoptera: Buprestidae). *Acta Biológica Leopoldensia* 27 (1): 43-46.
- GIGLI, M. 2007. Sexual Dimorphism. <http://utenti.romascuola.net/bups/dimorph.htm>. [Last access: 16 January 2007].
- HASTIR, P.; GASPAR, C. 2002. Les <<richards>> (Coleoptera: Buprestidae) de la faune de Belgique: éthologie, phénologie, classification et systematique. *Notes fauniques de Gembloux* 47 (2): 3-40.
- LIMA, E. R. 2001. Feromônio sexual do bicho-mineiro do café, *Leucoptera coffella*: avaliação para uso em programas de manejo integrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 82 p.
- MACRAE, T. C. 2003. *Agrilus* (s. str.) *betulanigrae* Macrae (Coleoptera: Buprestidae: Agrilini), a new species from North America, with comments on subgeneric placement and a key to the otiosus species-group in North America. *Zootaxa* 380 (1): 1-9.
- NELSON, G. H. 1994. Six new species of *Acmaeodera* Eschscholtz from México (Coleoptera: Buprestidae). *The Coleopterists Bulletin* 48 (3): 272-282.
- NELSON, G. H. 1996. A new genus, *Squamodera* Nelson, for the vanduzeei group of *Acmaeodera* Eschscholtz from Western North America (Coleoptera: Buprestidae). *The Coleopterists Bulletin* 50 (2): 167-175.
- PIPER, G. L.; VILLEGAS, B.; STORY, J. 2005. *Agrilus hyperici* (Creutzer) - "Klamath Weed Root Borer". [http://www.wes.army.mil/el/pmis/biocontrol/html/agrilus\\_html](http://www.wes.army.mil/el/pmis/biocontrol/html/agrilus_html) [Last access: 14 august 2005].
- REJZEK, R. 2007. *Anthaxia* (s. str.) *nitidula nitidula* (Linné, 1758). <http://volny.cz/midge/buprang/antnit.htm> [Last access: 15 january 2007].
- RIBEIRO, G. T.; ZANUNCIO, J. C.; SOSSAI, F. M.; ZANUNCIO, J. S. 2001. O besouro Buprestidae em reflorestamento. *Folha Florestal* 99: 19-20.
- SNODGRASS, R. E. 1993. Principles of insect morphology. McGraw-Hill Book Co., New York. 667 p.
- VELLOZO, L. G. C.; NOWACKI, M. J.; VERNALHA, M. M. 1953. Contribuição ao levantamento fitossanitário do Estado do Paraná. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 8 (1): 349-378.
- WEBER, R. G. 1976. Sexing the elm leaf beetle, *Pyrrhalta luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America* 69 (1): 217-218.
- ZANUNCIO, J. C.; MOURA, J. I. L.; OLIVEIRA, A. C.; ANJOS, N.; SANTOS, G. P. 1986. Coleópteros associados a *Eucalyptus* spp. em Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 10, 1986, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro: S.E.B., p. 339.

## Sección Médica

## Experiencia de un análisis entomológico de criaderos de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en Cali, Colombia

Experience of an entomological analysis of the breeding sites of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Cali, Colombia

RANULFO GONZÁLEZ OBANDO<sup>1</sup>, FEDERICO GAMBOA<sup>2</sup>, ORLANDO PERAFÁN<sup>2</sup>,  
MARCO FIDEL SUÁREZ<sup>3</sup>, JAMES MONTROYA LERMA<sup>1</sup>

**Resumen:** Mediante muestreos larvales se evaluó la positividad y asociación poblacional del vector de dengue, *Aedes aegypti*, con *Culex quinquefasciatus*, vector del virus del Nilo, en 537 sumideros ubicados en 19 comunas de seis SILOS (Sistemas Locales de Salud) de la Ciudad de Cali, Colombia. Los índices promedio de positividad de sumideros (IS) fueron 57,2 y 73,6% para cada especie, respectivamente. Aunque sólo fue una tendencia, estos valores variaron acorde al estrato social de la ciudad y en todas las áreas evaluadas se estableció que ambas especies presentan una asociación poblacional positiva de alta significancia. Al evaluar la importancia relativa de los sumideros en la producción de *A. aegypti*, se observó que estos criaderos son tan o más importantes que los encontrados en áreas intra y peridomiciliares de los barrios y unidades residenciales. El análisis de las casas de 10 manzanas, incluyendo 62 sumideros ubicados en la vecindad próxima de las viviendas, mostró que en el intradomicilio no se producen pupas. Si se asume una tasa constante de sobrevivencia diaria de 0,80, el número de hembras/manzana estimado para los sumideros fue mayor que la de otros criaderos del peridomicilio. Para los sumideros la densidad absoluta varió entre 45 y 555 ( $\bar{X} = 200$  hembras/manzana), mientras que en los segundos, éste varió únicamente entre 0 y 69 ( $\bar{X} = 22$  hembras/manzana).

**Palabras clave:** Población. Vector dengue. Índices criaderos. Sumideros urbanos.

**Abstract:** Larval sampling was carried out to evaluate the presence and population relationship between the vector of dengue, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, vector of West Nile virus, in 537 sinks, located in 19 “comunas” (quarter associations) of the six SILOS (i.e. local health systems) of the city of Cali, Colombia. The mean positivity index (IS) for the sinks was 57.2% and 73.6% for each species, respectively. Although it was only a tendency, these values varied according to city social strata, and in all of the areas evaluated it was established that each species had a highly significant positive population correlation. In evaluating the relative importance of the city sinks in the production of *A. aegypti*, it was established that those breeding sites are equally or more important than intra or peridomiciliar breeding sites. The analysis of houses in 10 city blocks, including 62 street sinks in the nearby vicinity, revealed that intradomiciliar settings do not produce pupae. Assuming a constant adult survival rate of 0.80 per day, the number of females per block estimated for the sinks was greater than peridomiciliar breeding sites. For the street sinks, absolute density varied between 45 and 555 ( $\bar{X} = 200$  female/block), while in the peridomiciliar settings it was only 0 and 69 ( $\bar{X} = 22$  female/block).

**Key words:** Vector. Dengue population. Breeding site indices. Urban sinks.

### Introducción

El dengue clásico y sus manifestaciones clínicas más graves, hemorrágico (DH) y síndrome del choque (SCD) son patologías que originan amplia morbilidad y mortalidad en salud pública (OPS 1995). Estas enfermedades son endémicas y, en ocasiones han alcanzado características epidémicas en más de 100 países de zonas tropicales de América, África y Asia, donde la prevalencia está asociada a su principal vector, *Aedes aegypti* L., 1762 aunque, eventualmente, *A. albopictus* (Skuse, 1894) puede estar involucrado (OPS 1987; Rai 1991). En el mundo se estima en 50 millones de infecciones al año (San Martín y Prado 2004) y en las Américas, la situación se ha agravado durante los últimos 20 años como consecuencia del incremento del número de casos y de países afectados así como por el incremento de las manifestaciones graves de DH y del SCD. En el año 2002, de 1'019.196 casos, 17.363 fueron de DH

(San Martín y Prado 2004). En Colombia, especialmente a partir de 1980, se han presentado epidemias en varias regiones del país. En el año 2003 fueron registrados 58.335 casos, de los cuales 5.026 fueron atribuidos a DH (Sivigila 2004) y se estima que aproximadamente 18 millones de personas se encuentran en áreas de riesgo de contraer la enfermedad (Camacho 1991).

La detección temprana de casos unida al monitoreo entomológico representan, indiscutiblemente, es la forma más eficaz de evitar brotes epidémicos. Sin embargo, la vigilancia serológica y viral están fuera del alcance de los recursos de la gran mayoría de países afectados. Además, por lo general, la transmisión de los diferentes serotipos está altamente correlacionada con el crecimiento desordenado de las ciudades, debido manejo doméstico del agua, limitada cobertura de los servicios de acueducto y/o deposición de materiales “inservibles” o “desechos” (Nelson 1986). Por lo tanto, no es

<sup>1</sup> Biólogos, Profesores. Grupo de Investigaciones Entomológicas. Departamento de Biología. Universidad del Valle. A.A 25360 Cali. [ranulfog@univalle.edu.co](mailto:ranulfog@univalle.edu.co), [jamesmon@univalle.edu.co](mailto:jamesmon@univalle.edu.co)

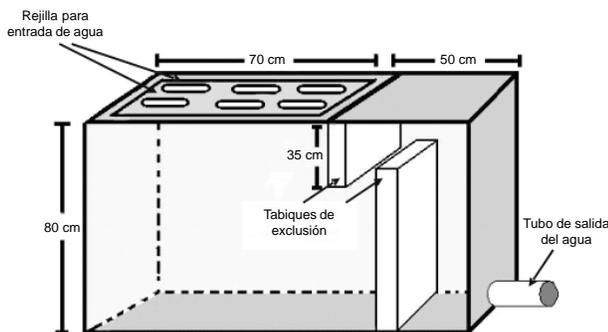
<sup>2</sup> Exfuncionarios Servicio Erradicación de la Malaria, SEM. Cali.

<sup>3</sup> Biólogo, Funcionario OPS, [masuarez@hotmail.com](mailto:masuarez@hotmail.com)

sorprendente que las inferencias de infección y consecuentes medidas de control estén determinadas por la variación de las poblaciones (adultas y larvales) del vector.

Tradicionalmente, las medidas de control están encaminadas a reducir al mínimo las poblaciones de *A. aegypti*, mediante la eliminación o tratamiento, generalmente químico, de los hábitats de las formas inmaduras (huevos, larvas y pupas). En las Américas, la colonización de *A. aegypti* se ha asociado a una gran diversidad de criaderos naturales y artificiales (Trapido y Galindo 1956; Tinker 1974; Chadee 1984, 1992; Nelson 1986; Chadee *et al.* 1998) siendo las llantas probablemente las principales fuentes de cría del mosquito (Nelson 1986). En Trinidad, Focks y Chadee (1997) al analizar, en términos de producción de pupas, el aporte por tipo de criadero, registraron que solamente cuatro de 11 de los criaderos encontrados (tanques, tinas, baldes y pequeños contenedores), presentaban más del 90% de las pupas de *A. aegypti*. La utilización de criaderos permanentes y temporales sugiere, que, esta especie, sufre cambios de comportamiento debido a la presión de insecticidas y eliminación de criaderos domiciliarios y peridomiciliarios (Chadee *et al.* 1998). Sin embargo, hasta ahora, no existen datos del aporte relativo de cada tipo de criadero en una comunidad determinada.

Los sumideros (Fig. 1), son construcciones muy comunes en las áreas urbanas para el desagüe de las vías públicas, son considerados muy prolíficos en la producción de especies de *Culex*, en especial *C. quinquefasciatus* Say 1823 debido a que retienen agua y materia orgánica por largos periodos (Geery y Holub 1989). Observaciones preliminares realizadas en la ciudad de Cali, indicaron que estos sitios han sido, paulatinamente, colonizados también por *A. aegypti*. Por ejemplo, en el Campus de la Universidad del Valle se encontró que de 47 sumideros más del 50% eran positivos para *A. aegypti*, independiente del nivel de fermentación o contenido de materia orgánica (R. González, datos no publicados). Para comienzos de 1991 se desconocía si esta situación prevalecía en toda la ciudad de Cali y, por lo tanto, a mediados de ese año, con personal del antiguo Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM), se realizó una encuesta entomológica para determinar el índice de sumideros positivos (IS), la densidad relativa de las especies de *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti* y la estratificación de su importancia según las comunas de los denominados en ese entonces Sistemas Locales de Salud (SILOS). Aunque los resultados sirvieron de base para adelantar un programa de control, aún vigente, por la secretaria de salud municipal, el estudio nunca fue publicado. En el presente



**Figura 1.** Esquema de uno de los principales modelos de sumideros construidos en la ciudad de Cali (diseño esquematizado por R. González y N. Carrejo).

documento, se retoma y analiza la información, no solo en el sentido de presentar los índices aélicos de ese momento, sino también que a partir de los índices de asociación o repulsión entre *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*, establecer los parámetros de importancia de las dos especies de Culicidae dominantes en este hábitat urbano. Complementariamente, con el fin de contribuir al entendimiento de la relación entre la densidad larval y la producción de pupas de *A. aegypti* por manzana, se incluyen los resultados de una evaluación en un área de la ciudad con alto índice de sumideros positivos para esta especie, realizada posteriormente, entre diciembre de 1994 y enero de 1995.

## Materiales y Métodos

**Área de estudio.** La investigación se desarrolló en 19 comunas, cubriendo los seis Sistemas Locales de Salud (SILOS) que integran el Municipio de Santiago de Cali ( $3^{\circ}24'56''N$ ,  $76^{\circ}30'10''W$ ), Departamento del Valle del Cauca. Cada zona presenta características propias en cuanto a su panorama urbanístico y arquitectónico, generando condiciones ambientales muy variables (Arévalo 1998). Las zonas verdes de las comunas han sido arborizadas con especies ornamentales, pero algunas áreas aún conservan parte de la vegetación natural del bosque seco tropical (Arévalo 1998). En todas se presentan sumideros que por lo general proporcionan un ambiente adecuado para la cría, establecimiento y diseminación de poblaciones de *A. aegypti*. Asimismo, en el área de estudio se presentan casas, conjuntos residenciales y comerciales, que poseen, tanto en su interior como externamente, sitios depósitos artificiales (floreros, sanitarios, botellas, platos de materas, llantas, huecos, etc.) favorables para la cría y establecimiento de mosquitos.

**Muestreo de sumideros.** En cada SILOS se realizó conteo y mapeo de los sumideros. Seguidamente, de forma aleatoria, se hizo búsqueda de larvas de Culicidae en el 5% (537) de aquellos sumideros con agua. Las muestras, tomadas con un cucharón de 300 cc en las cuatro esquinas de cada sumidero, fueron depositadas en un concentrador larval, luego vertidas a un recipiente con alcohol al 80% y, finalmente, trasladadas al laboratorio de Entomología de la Universidad del Valle, donde se separaron y determinaron hasta especie. Cada muestra se acompañó de un formulario, con datos de localidad, fecha y características físicas del sumidero. En todos los casos, se cuantificó la densidad promedio de larvas por cucharón de cada especie.

**Comparación de la producción de *A. aegypti* entre criaderos.** Con el objeto de evaluar y comparar la producción de pupas de *A. aegypti* en diferentes tipos de criaderos, se seleccionaron diez manzanas, correspondientes a cuatro barrios del SILOS VI, área en donde se detectó la mayor frecuencia de sumideros positivos. En cada manzana se inspeccionaron todos los sumideros de las calles que la delimitaban y casi la totalidad de las viviendas. De cada casa se obtuvo el número de criaderos (positivos y negativos) en el intra y peridomicilio. De todos los criaderos positivos, incluyendo los sumideros, se extrajo la totalidad de larvas y pupas, utilizando una red de organza y cucharones. Cada muestra fue concentrada, fijada en alcohol al 70% y trasladada al laboratorio en donde se realizó la separación, determinación, y cuantificación de las larvas y pupas de *A. aegypti*.

**Análisis numérico y estadístico.** Los sumideros fueron analizados por grupos (comunidades), en los cuales se determinó el índice de positividad, densidad relativa por cazo y/o sumidero. Se realizaron análisis de correlación lineal (correlación de Pearson) de asociación y de similitud para las especies de Culicidae dominantes, mediante los programas Statistical Ecology de Ludwig y Reynolds (1988) y Statistix para Windows 98, versión 2.0. Las medidas de asociación interespecíficas se estimaron a partir de datos de presencia o ausencia de las dos especies más abundantes. Este análisis mide la independencia de la distribución de las dos especies y asume que la probabilidad de ocurrencia de ellas es constante en todas las muestras.

La evaluación de la producción de pupas de *A. aegypti*, fueron analizados para normalidad y se calcularon los estadísticos descriptivos y las tasas de densidades encontradas entre sumideros y los criaderos para cada manzana, de acuerdo con Focks *et al.* (1981):

$\frac{\text{(Número de pupas)} (0,5)}{\text{dos días}}$ , donde, 0,5 representa al número de hembras.

Para el promedio de todas las manzanas el divisor de la fórmula anterior fue multiplicado por el número de manzanas:

$\frac{\text{(Número de pupas)} (0,5)}{\text{(Número de manzanas)} (\text{dos días})}$

La comparación de medias entre la producción de larvas y pupas en ambas situaciones (domicilio, sumideros) se realizó mediante una prueba no paramétrica de pares ajustados de Wilcoxon. Se estimó la población absoluta de hembras de *A. aegypti* por manzana, a partir de sumideros y otros criaderos, mediante la fórmula de Focks *et al.* (1981),

$$\left( \int_0^{\infty} Sa^t dt \right)$$

que asume una tasa de supervivencia diaria de adultos hembra constante ( $Sa = 0,8$ ) e independiente de la edad ( $t$ ). Ante la imposibilidad de registrar el 100% de las personas (unas pocas viviendas no pudieron ser encuestadas) no se realizó la determinación del número de pupas por persona.

## Resultados y Discusión

**Índices de sumideros (IS) por especie.** Se inspeccionaron 537 sumideros en las 19 comunas de la ciudad. En promedio, los IS fueron 57,2% para *A. aegypti* y 73,6% para *C. quinquefasciatus*, las dos especies de mosquitos dominantes. En ambas, el IS por especie varió por SILOS, Comuna y Barrio.

Los mayores IS positivos, tanto para *A. aegypti* como *C. quinquefasciatus*, se presentaron en los SILOS IV y VI. No obstante, aquellos de menor porcentaje de positividad no fueron coincidentes, mientras que para la primera especie correspondió al SILO V, con 36,4%, el silo II lo fue para *C. quinquefasciatus* (Tabla 1). Las densidades relativas, analizadas en número promedio por cucharoneada por sumidero por comuna, variaron entre 0,2 y 44,6 pero sus valores no tuvieron correlación con los índices de positividad de cada comuna ( $r = 0,115$ ,  $P = 0,639$ ). Esto significa que una mayor positividad de criaderos no necesariamente implica una mayor densidad de población por área. Sin embargo, en las comunas tres, 18 y 19, que presentaron índices mayores al 40%,

estuvieron asociados a densidades elevadas (Fig. 2; Tabla 2), lo cual representaba un factor de riesgo entomológico importante para la transmisión de dengue.

El 84% de las comunas en estudio, presentaron una densidad promedio por debajo de siete larvas por cucharoneada por sumidero (0,2 a 6,9). Aunque en apariencia estos valores son bajos no representan la densidad absoluta por sumidero. Al realizar un análisis de agrupamiento (figura no presentada) con las densidades promedio de *A. aegypti* por comuna, se revela la existencia de tres grupos principales: uno de mayor densidad conformado por las comunas tres y 18 (33,06 y 44,57 larvas/cucharoneada/sumidero); la comuna 19 (15,50 L/C/S) se ubica, por separado, entre las anteriores y el resto de comunas, las cuales conformaron dos subgrupos, uno por las comunas 6, 11, 15 y 17 (densidades entre 5,12 y 7,27 L/C/S) y otro representado por el resto de comunas con densidades entre 0,20 y 3,32 L/C/S.

Los resultados sugieren que no existe un patrón fijo de distribución para la densidad larvaria, ya que está sujeta a la dinámica de los factores físicos y fisicoquímicos de cada sumidero; sin embargo, en nuestro caso su estado estuvo aparentemente relacionado con el estrato social del área residencial o tipo de actividad desarrollada en la zona. Tal como se ha establecido en otros trabajos (Tun-Lin *et al.* 1995a, 1995b), es plausible que factores tales como la arborización, limpieza de las vías, topografía del terreno y hábitos de las personas próximas al sumidero, influyan en la positividad y densidad larvaria de mosquitos.

**Índices de asociación entre *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*.** En casi la totalidad de las comunas de la ciudad, la densidad relativa promedio de *C. quinquefasciatus* fue significativamente mayor que aquellas registradas para *A. aegypti* (Tabla 2).

Al considerar únicamente la presencia o ausencia de cada especie en todos los sumideros evaluados, se observaron algunos criaderos que contenían sólo una de las dos especies, pero considerando la densidad relativa, los coeficientes de correlación entre las dos especies fueron positivos y estadísticamente significativos. Lo anterior sugiere una tendencia, en siete de las comunas, donde independiente del análisis comparativo de sus medias existen sumideros que presentan características ambientales igualmente buenas para ambas especies (Tabla 3).

Resultados similares se obtuvieron cuando el análisis se particularizó para cada SILOS, pero no fue aplicable al SILOS IV, ya que en este en más del 80% de las muestras se encontraron juntos y no se encontró ningún sumidero con únicamente *A. aegypti*. Lo anterior corrobora la afirmación de Frager (1957, citado por Southwood 1978), quien establece que, en estos casos a pesar de que desde el punto de vista biológico la asociación es obvia, es estadísticamente indeterminada. Una situación similar se observó en el análisis por comunas (Tabla 4), en tres de ellas la asociación fue indeterminada pero muy evidente biológicamente. Aunque en el 99% de las comunas se observó un índice de asociación positivo entre las dos especies, en 12 de ellas no fue recomendable la prueba de Chi-cuadrado, ya que la frecuencia esperada en alguna de las celdas fue menor que uno y en más de dos menor que cinco (Southwood 1978).

En casi todas las comunas se presentó diferencia significativa entre las medias de las dos especies por comuna, sin embargo, el análisis de los coeficientes de correlación de

**Tabla 1.** Índice de sumideros positivos para *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* en 19 Comunas de la ciudad de Cali (mayo de 1991).

SILOS No.	Comuna	No. Sumideros	Positividad (%)	
			<i>A. aegypti</i>	<i>C. quinquefasciatus</i>
I	3	28	60,7	82,1
I	19	42	76,2	76,2
I	20	15	33,3	73,3
I	1	15	46,7	20,0
MEDIA I			61	69,0
II	2	17	17,6	29,4
II	4	18	33,3	61,1
II	5	22	50,0	54,5
II	6	20	70,0	75,0
II	7	8	62,5	62,5
MEDIA II			45,9	56,5
III	8	40	57,5	85,0
III	9	30	43,3	90,0
III	12	30	66,7	86,7
MEDIA III			58,0	87,0
IV	10	39	74,4	92,3
IV	11	21	95,2	100,0
MEDIA IV			81,7	95,0
V	13	54	44,4	64,8
	14	20	5,0	35,0
	15	25	44,4	76,0
MEDIA V			36,4	61,6
VI	17	65	60,0	69,2
VI	18	28	43,1	100,0
MEDIA VI			68,8	78,5
MEDIA TOTAL			57,2	73,6

Pearson entre las densidades relativas mostró que solo en siete de las comunas se presentaba una correlación estadísticamente significativa, independientemente de si se observaba diferencias significativas entre sus medias; esto podría indicar una tendencia a que ciertos sumideros presenten características ambientales igualmente buenas para ambas especies. En once de las comunas restantes posiblemente las características de los sumideros no solamente fueron más favorables para *C. quinquefasciatus*, si no que también su densidad no estuvo correlacionada con la de *A. aegypti*.

Varios autores han demostrado la adaptación de *C. quinquefasciatus* a aguas servidas o polutas (Hammerschmidt y Fitzgerald 2005; Farah *et al.* 2004). Laird (1988) plantea que la presencia de ciertas bacterias, e.g. *Pseudomonas*, aisladas del hábitat larval de mosquitos, produce tanto atracción como estímulo para la oviposición de esta especie. Es posible que esta situación, en sumideros con mayor carga orgánica, mayor proceso de oxidación y de consumo de oxígeno moderadamente alto, condiciones favorables para *C. quinquefasciatus* pero desfavorables para una alta densidad larval o el establecimiento exitoso de *A. aegypti* se presentara en once de las comunas restantes.

**Comparación en la producción de criaderos *A. aegypti*.** El IS para *A. aegypti*, en las 156 casas y 62 sumideros de las 10

manzanas inspeccionadas fue alto, con valores entre 57,1 y 100%. En tres de las manzanas el 100% de los sumideros muestreados fue positivo. En contraste, los índices de viviendas (IV) y criaderos (IC) del intra y peridomicilio fueron más bajos (Tabla 5). En promedio se presentaron 2,27 criaderos domiciliarios positivos por cada sumidero positivo, una relación relativamente baja con respecto a lo esperado. Cabe destacar que en el intradomicilio no se observó producción de pupas (Tabla 6) lo cual concuerda con lo expresado por Focks y Chadee (1997) y Focks *et al.* (1981) quienes aseveran que, algunos criaderos intradomiciliarios, positivos para larvas no llegan a producir adultos, como consecuencia de la manipulación de los recipientes por parte de los habitantes del domicilio. Por el contrario, los criaderos del peridomicilio, de mayor tamaño, contribuyen de manera notable con pupas. En consecuencia las medidas de control deben estar dirigidas hacia estas fuentes principales de producción de adultos. En nuestro análisis, a pesar de que no se sumaron las densidades observadas en los criaderos del peridomicilio a la de la producción observada en los sumideros, fue evidente la mayor productividad de pupas de *A. aegypti* en estos últimos (Tabla 6; Fig. 3). Es posible que las frecuentes campañas educativas dirigidas a reducir los criaderos caseros hayan surtido efecto. No obstante, los sumideros permanecieron relativamente sin observación, aspecto aprovechado por la especie para colonizar

**Tabla 2.** Densidad de larvas, ANOVA y coeficientes de correlación entre las densidades de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* en sumideros de 19 comunas de la ciudad de Cali (mayo de 1991).

SILOS No.	Comuna No.	Densidad de larvas/sumidero				Coeficiente correlación	ANOVA
		<i>A. aegypti</i>		<i>C. quinquefasciatus</i>			
		$\bar{X}$	D.S	$\bar{X}$	D.S		
I	1	0,20	0,30	0,18	0,40	0,35b	NS
	3	33,06	96,80	182,01	355,90	0,24b	S
	19	15,50	30,30	28,84	67,00	0,84a	NS
	20	0,94	2,29	16,14	29,90	0,03b	NS
II	2	0,64	2,23	0,54	1,41	0,92a	NS
	4	0,77	1,64	3,50	9,81	0,88a	NS
	5	1,65	3,08	7,34	11,56	0,16b	S
	6	6,10	13,53	20,11	37,74	0,65a	NS
	7	2,06	2,76	21,47	41,33	-0,01b	NS
III	8	2,47	3,00	15,44	23,78	0,23b	S
	9	3,32	6,09	10,71	12,65	0,61a	S
	12	2,30	3,77	16,13	11,25	0,31b	S
IV	10	2,93	2,98	10,97	16,79	-0,19b	S
	11	5,12	2,68	14,76	8,91	-0,21b	S
V	13	2,09	4,63	16,08	39,05	0,47a	S
	14	0,26	1,01	8,89	27,57	0,04b	NS
	15	5,47	10,58	20,00	33,53	0,21b	S
VI	17	7,27	15,70	14,78	42,00	0,08b	NS
	18	44,57	51,27	82,04	109,71	0,77a	NS

A = Significativamente diferente de 0 ( $P < 0,05$ ). B = No significativamente diferente de 0 ( $P > 0,1$ ). NS = Diferencia entre medias de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* no significativa.

**Tabla 3.** Frecuencia de ocurrencia de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* en sumideros de la ciudad de Cali (mayo de 1991).

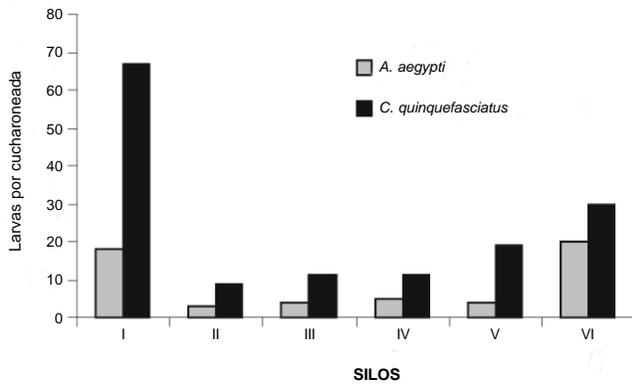
SILOS No.	<i>A. aegypti</i> y <i>C. quinquefasciatus</i>	<i>A. aegypti</i> Solo	<i>C. quinquefasciatus</i> Solo	Negativos	Total	Repulsión	$\chi^2$
I	51	11	18	20	100	(-)a	11,8
II	30	9	19	27	85	(-)a	9,6
III	58	2	32	8	100	(-)a	5,7
IV	49	0	11	0	60	(-)	b
V	32	3	33	30	98	(-)a	13,7
VI	59	5	18	11	93	(-)a	10,7
Total	<b>279</b>	<b>30</b>	<b>131</b>	<b>96</b>	<b>536</b>	<b>(-)a</b>	<b>75,5</b>

\* REPULSIÓN: Tendencia para que las dos especies ocurran más frecuentemente solas que en asociación, determinado por medio de un test de Chi cuadrado:  $P < 0,05$ . b: No es aplicable la prueba de Chi-cuadrado por que la frecuencia esperada en alguna de las celdas es menor que 1 y en más de dos celdas es menor que 5.

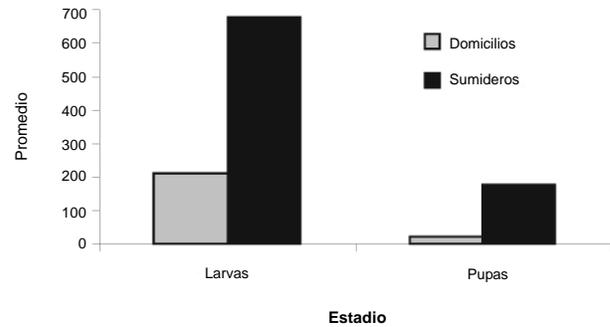
exitosamente este tipo de ambientes. Según Nelson (1986) esta especie es característicamente oportunista en lo que se refiere a la búsqueda de criaderos.

Se observó una gran variabilidad entre manzanas (Tabla 6), pero en general los promedios de larvas y pupas de los sumideros fueron significativamente mayores ( $P < 0,05000$ ) que los de los criaderos domiciliarios ( $P = 0,0125$ , larvas;  $P =$

$0,00506$ , pupas). Considerando los promedios de las tasas (sumideros/criaderos del domicilio) por manzana, para el total de las diez manzanas se produjo 30,3 pupas en los sumideros por cada pupa obtenida en los criaderos domiciliarios; sin embargo, cuando se comparó la tasa con relación a la densidad total de las diez manzanas, sin considerar separadamente cada manzana, este valor fue menor (8,9), es decir que la variabilidad de los datos entre manzanas es grande. En una de las manzanas



**Figura 2.** Número promedio de larvas por cucharoneada de *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*, en los diferentes Silos de la ciudad de Cali (mayo de 1991).



**Figura 3.** Promedios de larvas y pupas de *A. aegypti* por manzana, observadas en los sumideros y criaderos domiciliarios, en diez manzanas del sur de la ciudad de Cali.

**Tabla 4.** Tipo e índices de asociación entre *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* en sumideros de 19 comunas de la ciudad de Cali (mayo de 1991).

SILOS No.	Comuna No.	Repulsión	$\chi^2$	Corregido	Índices de asociación		
					Ochiai	Dice	Jaccard
I	1	Negativa	0,60	0,02	0,44	0,40	0,25
	3	Negativa	5,20	3,12	0,84	0,83	0,71
	19	Negativa	6,36	4,33	0,86	0,86	0,76
	20	Negativa	0,00	0,47	0,52	0,47	0,31
II	2	Negativa	8,74	5,10	0,78	0,75	0,60
	4	Negativa	0,00	0,28	0,47	0,44	0,29
	5	Negativa	2,93	1,65	0,70	0,70	0,53
	6	Negativa	0,32	0,00	0,76	0,76	0,80
	7	Negativa	1,74	0,32	0,80	0,80	0,67
III	8	Negativa	6,33	4,23	0,82	0,81	0,69
	9	Negativa	2,92	1,21	0,72	0,68	0,52
	12	Positiva	0,52	0,13	0,79	0,78	0,63
IV	10	Indeterminada	–	–	–	–	–
	11	Indeterminada	–	–	–	–	–
V	13	Negativa	12,66	10,74	0,75	0,74	0,58
	14	Negativa	1,95	0,10	0,38	0,25	0,14
	15	Negativa	6,20	4,08	0,76	0,73	0,58
VI	17	Negativa	10,83	9,10	0,79	0,79	0,65
	18	Indeterminada	–	–	–	–	–

esta relación llegó a 165,0, mientras que en otra fue apenas de 2,6; en el primer caso este valor estuvo influenciado por una alta presencia de pupas (495) en los sumideros de la manzana, mientras que en el segundo caso la densidad de pupas en el domicilio (111) estuvo influenciada por la presencia de llantas en el peridomicilio. Es decir que cuando en el peridomicilio se encuentran criaderos apropiados, como llantas y tanques abandonados, la producción de *A. aegypti* alcanza a ser comparable a la registrada en sumideros. Según Focks y Chadee (1997) a pesar de que los índices Stegómicos (IC, IV, IB) tradicionales siguen siendo una herramienta importante en la

vigilancia de muchos programas de control de dengue, son inadecuados para medir el riesgo de transmisión o la efectividad de las operaciones de control. De acuerdo con estos autores los tres índices tienen la desventaja de no considerar la cantidad variable de adultos producidos por cada criadero, algunos intradomiciliares que son encontrados con larvas no llegan a producir ningún imago, mientras que otros peridomiciliares independiente del tamaño contribuyen de manera notable con un mayor número de pupas. En el caso de *A. aegypti*, la producción de pupas puede ser tomada como indicador de los adultos producidos, ya que en este estado no se alimenta y en

**Tabla 5.** Índices de positividad de casas, criaderos y sumideros para *Aedes aegypti*, en diez manzanas del sur de la ciudad de Cali (1994).

Manzana No.	No. casas	Índice (%)	Domicilio				TOTAL DOMICILIO		Sumideros	
			Intradomicilio		Peridomicilio		N	IC (%)	N	IS (%)
			N	IC (%)	N	IC (%)				
M1	16	31,3	26	7,7	67	9,0	93	8,6	11	63,6
M2	18	44,4	9	44,4	76	11,8	85	15,3	7	71,4
M3	21	42,9	12	16,7	51	29,4	63	27,0	7	100,0
M4	17	35,3	11	9,1	25	24,0	36	19,4	5	80,0
M5	16	37,5	7	14,3	34	26,5	41	24,4	6	100,0
M6	16	37,5	7	42,9	18	27,8	25	32,0	6	83,3
M7	10	30,0	9	0,0	15	33,3	24	20,8	4	75,0
M8	17	35,3	16	25,0	34	11,8	50	16,0	5	100,0
M9	13	23,1	9	22,2	21	4,8	30	10,0	7	57,1
M10	12	58,3	5	60,0	28	21,4	33	27,3	4	75,0
<b>TOTALES</b>	<b>156</b>		<b>111</b>		<b>369</b>		<b>480</b>		<b>62</b>	
<b>MEDIAS</b>		<b>37,6</b>		<b>19,8</b>		<b>17,9</b>		<b>18,3</b>		<b>79,0</b>

**Tabla 6.** Variaciones del número de larvas y pupas de *A. aegypti* y tasa de pupas sumidero/criaderos domiciliarios, en diez manzanas de barrios del sur de la ciudad de Cali (1994). (L = Larvas, P = Pupas).

Manzana No.	Domicilio						Sumideros		Tasas Sumidero/Domicilio	
	Intra		Peri		Total		L	P	L	P
	L	P	L	P	L	P				
M10	12	58,3	5	60,0	28	21,4	33	27,3	4	75,0
M1	5	0	231	44	236	44	1628	115	6,9	2,6
M2	48	0	147	29	195	29	338	111	1,7	3,8
M3	28	0	152	16	180	16	1695	224	9,4	14,0
M4	32	0	229	62	261	62	197	133	0,8	2,1
M5	7	0	559	26	566	26	650	196	1,1	7,5
M6	19	0	116	3	135	3	841	495	6,2	165,0
M7	0	0	26	0	26	0	176	40	6,8	40,0*
M8	20	0	24	6	44	6	358	143	8,1	23,8
M9	4	0	56	4	60	4	38	72	0,6	18,0
M10	40	0	57	10	97	10	694	257	7,2	25,7
<b>Totales</b>	<b>203,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1597,0</b>	<b>200,0</b>	<b>1800,0</b>	<b>200,0</b>	<b>6615,0</b>	<b>1786,0</b>	<b>3,7</b>	<b>8,9</b>
<b>Promedios/manzana</b>	<b>20,3</b>	<b>0,0</b>	<b>159,7</b>	<b>20,0</b>	<b>180,0</b>	<b>20,0</b>	<b>661,5</b>	<b>178,6</b>	<b>4,9</b>	<b>30,3</b>

\* No se recolectaron pupas en las casas de esta manzana, para no hacer un cociente indeterminado se dividió el número de pupas de los sumideros de la manzana entre la unidad.

ausencia de factores externos como depredadores o parásitos su mortalidad es baja, es decir que aquellos que lleguen al estado pupal tienen una alta probabilidad de ser adultos.

Uno de los aspectos más relevantes del presente estudio es que demuestra que aunque *A. aegypti* se reproduce en sus ampliamente reconocidos criaderos, intra y peridomiciliares (matas en agua, floreros, sanitarios, botellas, platos de materas, llantas, huecos en árboles, etc.) también ha colonizado, en forma exitosa, los sumideros como sitio de cría y que, en ocasiones, desplaza a *C. quinquefasciatus*, la especie tradicionalmente dominante en estos ambientes. Este hallazgo tiene implicaciones prácticas en cuanto a la producción diaria

de mosquitos de los sumideros y la toma de decisiones por parte de los organismos sanitarios del estado y la comunidad.

Basados en los presentes resultados, en las condiciones urbanas, es previsible que los sumideros aporten de manera significativa y constante al incremento de la tasa de contacto del humano con el vector. Es válido estimar que, sumideros sin tratamiento, pueden aportar entre 40 y 495 pupas/manzana (Tabla 6). Asumiendo una tasa de supervivencia diaria de hembras ( $S_a$ ) de 0,8, la población absoluta por manzana aportada por los sumideros es considerablemente mayor a aquella del domicilio (Tabla 7) y, en consecuencia, la población absoluta variará entre 45 y 555 adultos por manzana, la cual

**Tabla 7.** Estimación de la producción absoluta de adultos hembras de *A. aegypti* por manzana ( $\int_0^{\infty} Sa' dt$ ) a partir de la producción de adultos hembras por día calculada para sumideros y criaderos del peridomicilio.

Manzana No.	Peridomicilio		Sumidero	
	No. de hembras*	$Sa = 0,8^{**}$	No. de hembras*	$Sa = 0,8^{**}$
M1	11,0	49	28,8	129
M2	7,3	32	27,8	124
M3	4,0	18	56,0	251
M4	15,5	69	33,3	149
M5	6,5	29	49,0	220
M6	0,8	3	123,8	555
M7	0,0	0	10,0	45
M8	1,5	7	35,8	160
M9	1,0	4	18,0	81
M10	2,5	11	64,3	288
<b>PROMEDIO</b>	<b>5</b>	<b>22</b>	<b>44,7</b>	<b>200</b>

\*Producción de hembras cada dos días, calculada de la fórmula  $\frac{(\text{Número de pupas}) (0,5)}{\text{dos días}}$

\*\*Producción absoluta de hembras/manzana considerando  $Sa = 0,8$

produce una relación por habitante (datos no calculados) importante para que ocurra y se mantenga la transmisión de dengue en la población humana susceptible que, según Focks *et al.* (2000), a partir de simulaciones matemáticas (CIMSIM DENSIM), el umbral requerido de *A. aegypti* está entre 0,5 y 1,5 pupas por persona a 28°C con una seroprevalencia inicial de 0 a 67%.

En conclusión, desde el punto de vista de control, a partir de los datos obtenidos sumados a otros no considerados en este estudio es posible realizar una simulación matemática para determinar el umbral de densidad de *Aedes* especialmente en sumideros y llantas de la ciudad de Cali y calcular, así, el grado de reducción de criaderos requerido para eliminar el umbral de transmisión de la enfermedad por cada comuna. Esto permitiría realizar un manejo selectivo del vector. Por otro lado este estudio confirma la importancia de evaluar el riesgo entomológico para dengue a partir de un índice de pupas, ya que permite valorar la importancia del criadero en términos de su capacidad de producir adultos, lo cual combinado con la información demográfica provee un estimado del número de pupas por persona de una comunidad.

### Agradecimientos

A la Universidad del Valle y al Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM), Seccional Cali en especial a su ex Directora, Dra. F. Vargas, y operarios por su gran apoyo logístico. A los señores, O. Méndez y H. Cruz, por su cooperación en la obtención de las muestras.

### Literatura Citada

ARÉVALO, D. P. (ed.). 1998. Agenda Ambiental: Comunas 17, 18 y 19. Departamento Administrativo de Gestión del medio ambiente. DAGMA. Alcaldía Santiago de Cali.

CAMACHO, R. 1991. Situación actual del dengue en Colombia, pp. 81-95. En: Ministerio de Salud Colombia O. P. S. III reunión de investigadores de malaria y otras enfermedades tropicales. Río Negro: 150 p.

CHADEE, D. D. 1984. An evaluation of Temephos in water drums in Trinidad. *W. I. Mosquito News* 44: 51-53.

CHADEE, D. D. 1992. Seasonal incidence and vertical distribution patterns oviposition by *Aedes aegypti* in an urban environment in Trinidad, W.I. *Journal of the American Mosquito Control Association* 8: 281-284.

CHADEE, D. D.; WARD, R. A.; NOVAK, R. 1998. Natural habitats of *Aedes aegypti* in the Caribbean – review. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14 (1): 5-11.

FARAH, M. A., ATEEQ, B., ALI, M. N., SABIR, R., AHMAD, W. 2004. Studies on lethal concentrations and toxicity stress of some xenobiotics on aquatic organisms. *Chemosphere* 55 (2): 257-265.

FOCKS, D. A.; CHADEE, D. D. 1997. Pupal survey: An epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: An example using data from Trinidad. *Journal of the American Mosquito Control Association* 56: 159-167.

FOCKS, D. A.; SACKETT, S. R.; BAILEY, D. L.; DAME, D. A. 1981. Observations on container-breeding mosquitoes in New Orleans, Louisiana with an estimate of the population's density of *Aedes aegypti* (L.). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30: 1329-1335.

FOCKS, D. A.; BRENNER, R. A.; DANIELS, E.; HAYES, J. 2000. Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 11-18.

GEERY, P. R.; HOLUB, R. E. 1989. Seasonal abundance and control of *Culex* spp. in catch basins in Illinois. *Journal of the American Mosquito Control Association* 5 (4): 537-540.

HAMMERSCHMIDT, C. R.; FITZGERALD, W. F. 2005. Methylmercury in mosquitoes related to atmospheric mercury deposition and contamination. *Environmental Science and Technology* 39 (9): 3034-3039.

LAIRD, M. 1988. The Natural history of larval mosquito habitats. Academic Press. Harcourt Brace Jaconovih, Publisher. N.Y. 555 p.

LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. 1988. *Statistical Ecology, a primer on methods and computing.* John Wiley & Sons. New York. 329 p.

NELSON, M. J. 1986. *Aedes aegypti: biology and ecology.* Pan-American. Health Organization Washington, D.C. PNSP/86-63. 50 p.

OPS. 1987. *Aedes albopictus* en las Américas. *Boletín Sanitaria Panamericana* 102 (6): 624-33.

- OPS. 1995. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: Guías para su prevención y control. Publicación Científica 548. 109 p.
- RAI, K. S. 1991. *Aedes albopictus* in the Americas. Annual Review of Entomology 36: 459-484.
- SAN MARTÍN, J. L.; PRADO, M. 2004. Percepción del riesgo y estrategias de comunicación social sobre el dengue en las Américas. Revista Panamericana de la Salud Pública 15 (2): 135-139.
- SIVIGILA (Sistema de Vigilancia en Salud Pública). 2004. Situación epidemiológica de las enfermedades. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana Epidemiológica No. 08 (<http://www.col.ops-oms.org/sivigila/IndiceBoletines2004.asp>).
- SOUTHWOOD, T. R. E. 1978. Ecological Methods. Chapman & Hall, Londres. 524 p.
- TINKER, M. E. 1974. *Aedes aegypti* larval habitats in Surinam. Bulletin of the Pan-American Health Organization 8: 293-301.
- TRAPIDO, H.; GALINDO, P. 1956. The epidemiology of yellow fever in Middle America. Experimental Parasitology 5: 285-323.
- TUN-LIN, W.; KAY, B. H.; BARNES, A. 1995a. The Premise Condition Index: a tool for streamlining surveys of *Aedes aegypti*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 53: 591-594.
- TUN-LIN, W.; KAY, B. H.; BARNES, A. 1995b. Understanding productivity, a key to *Aedes aegypti* surveillance. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 53: 595-601.

Recibido: 31-ago-2006 • Aceptado: 22-ago-2007

## Sección Morfología, Comportamiento, Ecología, Evolución y Sistemática

**Dinámica estacional de la estructura trófica de un ensamblaje de Coleoptera en la Amazonia Colombiana**

Seasonal dynamics of the trophic structure of an assemblage of Coleoptera in the Colombian Amazon

JORGE ARI NORIEGA A.<sup>1</sup>, JUAN PABLO BOTERO<sup>2</sup>, MARCELO VIOLA<sup>2</sup>, GIOVANNY FAGUA<sup>1</sup>

**Resumen:** Buscando entender los diferentes patrones de variación estacional de la estructura trófica del ensamblaje de coleópteros, se realizó un trabajo en la Amazonia Colombiana, durante tres años consecutivos en época de lluvia y de sequía, en bosque de tierra firme y várzea. Se realizaron transectos donde se instalaron trampas: de caída, Corner, Winkler, Malaise y adicionalmente se realizaron capturas manuales y zarandeo. El material se identificó a nivel de familia. Se capturaron 3.691 individuos, correspondientes a 32 familias. Las familias más abundantes en número de individuos fueron Scolytidae (31,7%), Scarabaeidae (22,2%) y Staphylinidae (18,1%). Los xilomicetófagos (32,1%) fueron el grupo dominante, seguido por los copro-necrófagos (22,3%), depredadores (21,7%) y herbívoros (11%). Al comparar entre años y entre hábitats se encontraron diferencias en la abundancia y composición de las familias, así como en el aporte de los roles tróficos. La época seca demuestra una tendencia al empobrecimiento. La marcada variación espacial y temporal entre estaciones y entre años, se asocia a la alta diversidad y estaría apoyando la hipótesis que el recambio estaría jugando un importante papel en la dilución de la competencia interespecífica por el recurso.

**Palabras clave:** Rol Trófico. Bosque Húmedo Tropical. Várzea. Xilomicetófagos. Scolytidae.

**Abstract:** To understand the different patterns of seasonal variation in the trophic structure of coleopteran assemblages, a study was conducted in the Colombian Amazon, over three consecutive years in wet and dry seasons, in both tropical rain forest and floodplains. Transect sampling was carried out with pitfall, Corner, Winkler, and Malaise traps as well as manual capture. The material was identified to family level. A total of 3,691 individuals was captured, corresponding to 32 families. The families most abundant in numbers of individuals were Scolytidae (31.7%), Scarabaeidae (22.2%), and Staphylinidae (18.1%). The xilomycetophages (32.1%) were the dominant group, followed by the copro-necrophages (22.3%), predators (21.7%) and herbivores (11%). A comparison among years and habitats revealed differences in the abundance and composition of the families, as well as in the contribution of the trophic roles. The dry season shows a tendency to impoverishment. The marked spatial and temporal variation among seasons and years is associated with high diversity and would support the hypothesis that seasonality plays an important role in diluting interspecific competition for resources.

**Key words:** Trophic role. Tropical Rain Forest. Floodplain. Xilomycetophages. Scolytidae.

**Introducción**

El orden Coleoptera presenta más de 400 mil especies descritas, las cuales se encuentran contenidas en cerca de 166 familias (Lawrence y Newton 1995), encontrándose en todos los ecosistemas y representando todos los roles tróficos (Crowson 1981). La mayoría de los coleópteros son considerados fitófagos, presentándose algunos roles poco comunes y muy especializados como los micetófagos o los queratinófagos (Arnett y Thomas 2000). A raíz de esta estrecha relación con algunos procesos al interior de los ecosistemas, muchas familias de coleópteros han sido utilizadas como bioindicadores (Brown 1991; Pearson 1994; Halfiter y Favila 1993), demostrando su importancia en planes de conservación como herramientas de monitoreo (Brown 1991; Kremen *et al.* 1993).

Trabajos realizados por Erwin (1982, 1983) en bosques neotropicales, proponen la existencia de una alta riqueza, que puede alcanzar el valor de ocho millones de especies de coleópteros. Adicionalmente a este valor hay que destacar la fuerte dinámica temporal y espacial, la cual en ciertas localidades puede ser marcada causando un importante incremento en la riqueza local (Erwin y Scott 1981). El

conocimiento de esta dinámica estacional en un determinado ecosistema puede ofrecer información importante para la generación de estrategias y planes de conservación enfocados a mantener la funcionalidad del mismo (Pimm 2002; Tilman y Downing 1994; Naeem *et al.* 1995; Johnson *et al.* 1996).

En este sentido son escasos los trabajos que han intentado acercarse al estudio de la estructura temporal del ensamblaje de coleópteros (Elton 1973; Krasnov y Ayal 1995; Zerm y Joachim 2001; Crouau-Roy *et al.* 1992; Blom *et al.* 2002), especialmente al análisis del efecto que los roles tróficos tienen en el funcionamiento de un ecosistema (Mikkelsen 1993; Lawton 1995; Escobar y Chacón de Ulloa 2000; Paarmann *et al.* 2001; Arias-Díaz *et al.* 2007). Algunos trabajos muy específicos en la amazonía, se han acercado al estudio de ciertas variables pero en grupos delimitados (Klein 1989; Pearson y Cassola 1992). El único trabajo que hasta la actualidad ha estudiado la estructura trófica del ensamblaje de coleópteros en la región amazónica (Brasil - Amazonia Central) es la investigación de Didham *et al.* (1998).

Desde mediados del siglo pasado diferentes investigadores han mostrado un profundo interés en estudiar la variación estacional en insectos (Davis 1945; Dobzhansky y Pavan 1950),

<sup>1</sup> Unidad de Ecología y Sistemática - UNESIS. Laboratorio de Entomología. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7a No. 40 - 62. Bogotá, Colombia. [jnorieg@hotmail.com](mailto:jnorieg@hotmail.com)

<sup>2</sup> Estudiantes de Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Dirección correspondencia: Cra. 7 No. 113-51 apto. 502. Bogotá - Colombia.

a pesar de ello, la mayoría de los trabajos en el caso específico de los coleópteros, solo han abarcado algunas pocas familias o se han centrado en aspectos comportamentales puntuales (New 1979; Krasnov y Shenbrot 1997; Yahiro y Yano 1997; Gök y Durán 2004; Boyer *et al.* 2003). Igualmente son pocos los trabajos realizados en la región tropical: África (Paarmann 1979), las Antillas (Gruner 1975), México (Montes de Oca y Halffter 1995), Costa Rica (Janzen 1983), Panamá (Wolda y Estribi 1985; Chandler y Wolda 1986), Ecuador (Peck y Forsyth 1982) y Brasil (Pinheiro *et al.* 2002).

Para el caso de Colombia y especialmente en la región amazónica, son pocos los estudios realizados acerca de la dinámica de insectos y menos en el orden Coleoptera. Vale la pena resaltar el trabajo efectuado por Howden y Nealis (1975) en Leticia (Amazonas - Colombia), los cuales trabajaron únicamente con la familia Scarabaeidae comparando los cambios entre dos años de muestreo y el trabajo de Martín Piera y Fernández (1996), quienes estudiaron la variación estacional de coleópteros en la región de Chiribiquete (Caquetá-Colombia).

Todo esto demuestra la escasa información acumulada, tanto de la composición y estructura, como de la dinámica espacial y temporal de esta provincia biogeográfica en el país, más aun si se resalta que en ninguno de los trabajos mencionados se ha incluido un análisis de la dinámica a nivel de los roles tróficos, por todo lo anterior este estudio se constituye en el primer trabajo de este tipo para la amazonia colombiana, donde se presenta por primera vez el acumulado de tres años de muestreo consecutivo.

### Materiales y Métodos

**Área de estudio.** El trabajo se llevó a cabo en la Amazonía Colombiana, en la Comunidad Monifue Amena (Resguardo Indígena Ticuna-Uitoto), a 71 msnm ( $4^{\circ}06'46,25''S$  -  $69^{\circ}55'52,11''W$ ), a 9,5 km de la ciudad de Leticia, Departamento del Amazonas - Colombia (Fig. 1). En esta zona se presenta un ciclo pluvial monomodal, con una época de sequía de junio a octubre. El muestreo se llevó a cabo en dos unidades de paisaje: Bosque de Tierra Firme (BTF) y Bosque Inundable o Várzea, en época de lluvias (marzo-mayo) y en época seca (septiembre-octubre), durante tres años consecutivos: 2002, 2003 y 2004.

**Muestreo.** Los muestreos se realizaron con diferentes métodos de captura: trampas Pitfall, trampas Winkler, trampas Malaise,



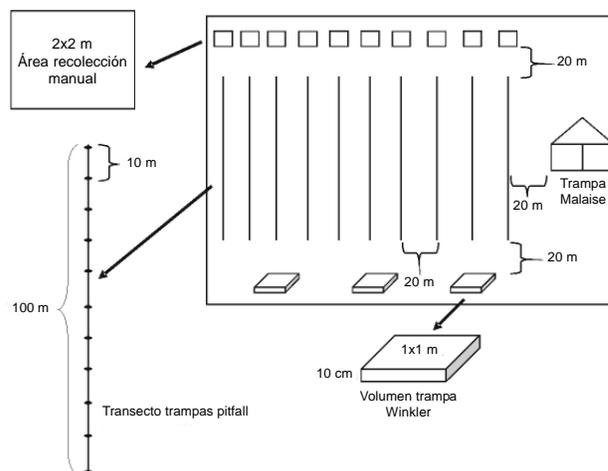
**Figura 1.** Localización de la zona de estudio, comunidad Monifue Amena, Leticia - Colombia.

recolección manual y zarandeo; usando 924 trampas Pitfall, 12 Malaise, 24 Winkler, para un total de 576 horas efectivas (Fig. 2).

Cada uno de los muestreos tuvo un periodo de 48 horas por trampa, para los dos hábitats. En cada época se realizó un muestreo consistente en la instalación de un promedio de 10 transectos ( $\pm 1$ , el número de transectos varió debido al número de personas que asistían a cada uno de los muestreos) de 100 m, separados 20 m, en cada uno de los dos tipos de bosques. Sobre el transecto se colocaron 11 trampas tipo pitfall de 9 onzas, separadas 10 m entre sí, cebadas con salchichón en descomposición y con alcohol como líquido preservante. Para cada unidad, adicionalmente se seleccionó un área de  $2 \times 2$  m, la cual fue muestreada por tres personas durante una hora con jamás y pinzas. Los muestreos y la colocación de las trampas se hicieron en horas de la mañana en BTF y en horas de la tarde en varzea.

Cerca de cada transecto, se seleccionaron cuatro árboles con un diámetro a la altura del pecho (DAP) de 8 cm, en los cuales se efectuaron tres episodios seguidos de zarandeo sobre una sabana blanca, en donde se recolectó todo lo que caía. Al final de tres transectos alternados a una distancia de 20 m se tomó un  $m^2$  de tierra para pasarlo por un saco Winkler, en cada uno de los bosques. Finalmente en cada unidad de paisaje, a un mínimo de 50 m de los transectos, se colocó una trampa Malaise de  $200 \times 100 \times 50$  cm, rasante al piso, que permaneció 48 horas activa.

**Identificación taxonómica.** Los ejemplares recolectados se mantuvieron en etanol al 70%, posteriormente se realizó un montaje en seco, con alfileres entomológicos, montando un ejemplar por cada morfotipo encontrado. Con el material montado se realizó la identificación a nivel de familia, utilizando claves generales y especializadas en este grupo (Costa Lima 1952; White 1983; Papp 1984; Bland y Jaques 1978; Arnett y Thomas 2000; Borror *et al.* 1989; Arnett *et al.* 1980; Arnett *et al.* 2002). El material finalmente fue etiquetado para ser depositado en la Colección Entomológica del Museo de la Pontificia Universidad Javeriana. Es importante anotar que en el muestreo de la época de lluvias del 2003, se presentó una pérdida de material, ocasionada por un mal transporte del mismo.



**Figura 2.** Disposición de los transectos, parcelas y trampas colocadas en cada unidad de muestreo, por cada época en cada año, en la comunidad Monifue Amena, Leticia - Colombia.

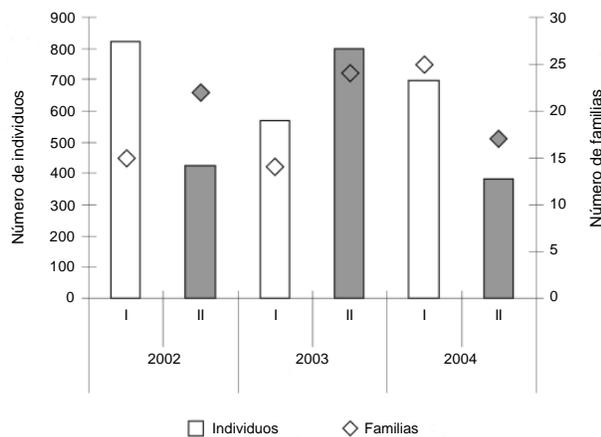
**Asignación de los grupos tróficos.** Para la caracterización de los roles tróficos de cada una de las familias, se realizó una revisión de la información de historia de vida y tendencias alimenticias a partir de diferentes trabajos (Crowson 1968, 1981; Paulian 1988; Lawrence y Newton 1995; Arnett y Thomas 2000; Arnett *et al.* 2002). A raíz de encontrar discrepancias entre los diferentes autores, especialmente relacionadas con variaciones tróficas al interior de algunas familias, se llegó a un consenso, tomando la tendencia general.

**Análisis estadístico.** Se realizó una prueba de ANOVA, para determinar la existencia de diferencias significativas entre los años, entre las épocas de muestreo, entre los hábitats y la combinación entre ellos, por medio del programa STATISTICA v. 6. Adicionalmente a esto, se calculó el Índice de Similitud entre años, épocas y unidades de paisaje, utilizando el índice de Sorensen como la medida de distancia para definir la similitud y como método de unión de grupos el promedio entre grupos (UPGMA). Para la ordenación de los muestreos se utilizó un Análisis de Correspondencia Rectificado (DCA), para evidenciar gráficamente la existencia de agrupamientos, por medio del programa PC-ORD v. 4.

## Resultados

**Abundancia y riqueza.** Se capturaron un total de 3.691 individuos, distribuidos en 32 familias (Anexo 1), de las cuales las más abundantes fueron Scolytidae (31,7%), Scarabaeidae (22,2%) y Staphylinidae (18,1%). Se encontraron familias con hábitos generalistas temporales, que fueron capturados durante todos los años independientemente de la época de muestreo, tales como Scolytidae, Staphylinidae, Scarabaeidae, Carabidae y Nitidulidae; especialistas espaciales que solo se encontraron en BTF como Cicindelidae o Noteridae y familias raras de las cuales solo se capturaron uno o dos individuos como Buprestidae, Coccinelidae, Dermestidae, Meloidae, Oedemeridae y Anobiidae, en un solo periodo y un hábitat específico.

El año que mayor abundancia presentó fue el 2003 con un total de 1366 individuos (37,01%), seguido del 2002 (1247, 33,78%) y el 2004 (1078, 29,21%). Con respecto a la riqueza,



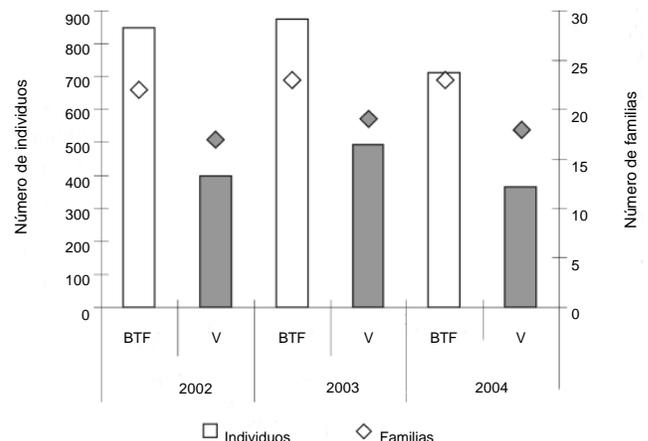
**Figura 3.** Número de individuos (barras) y de familias (rombos) en cada una de las dos estaciones (lluvias: I y seca: II), en los tres años de muestreo, en la comunidad Monifue Amena, Leticia - Colombia.

no se presentaron grandes diferencias en cuanto al número de familias; el promedio de familias fue de 24 para los tres años, siendo el 2002 el menor año con 23 familias y el 2004 el mayor con 25 familias. En cuanto a la abundancia se encontraron diferencias significativas entre los tres años ( $F = 0,987$ ;  $P < 0,009$ ).

Hubo mayor abundancia en la época de lluvias (2085, 56,49%), que en la época de sequía (1606, 43,51%), a excepción de lo encontrado en el año 2003 donde esta relación se invirtió (Fig. 3). Con respecto al número de familias, se presentó una tendencia a aumentar en época seca (Fig. 3) y en el hábitat BTF (Fig. 4). El porcentaje total de individuos fue mayor en BTF (2423, 65,9%) que en Várzea (1259, 34,1%), mostrando una tendencia a mantener la proporción a lo largo de los diferentes muestreos (Fig. 3). Se encontraron diferencias significativas entre las abundancias y las riquezas de los dos hábitats ( $F = 0,984$ ;  $P < 0,003$ ), así como entre las épocas al interior de los años ( $F = 0,987$ ;  $P < 0,001$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre las épocas de mayor o menor precipitación; entre los hábitats al interior de cada año y entre los hábitats y las épocas. El análisis de similitud muestra una relación ( $> 85\%$ ) entre las épocas de lluvias de los años 2003 y 2004, independientemente de la unidad de paisaje y también una relación (90%) entre las unidades de paisaje durante la época de lluvias del año 2002. El análisis de correspondencia tiende a agrupar los muestreos por años y dentro de estos por unidad de paisaje (Fig. 5).

**Estructura trófica.** Se establecieron ocho roles tróficos a partir de las familias recolectadas, dentro de las cuales el que presentó mayor abundancia correspondió a los xilomicetófagos (32,1%), seguido por los copro-necrófagos (22,3%) y los depredadores (21,7%), mientras el resto de roles presentaron números bajos de individuos (Fig. 6A). Con respecto a la riqueza de familias se encontraron valores diferentes reflejando una composición no consistente con la abundancia; el rol que mayor número de familias presentó fue el herbívoro con 13 (40,6%), seguido por los depredadores con ocho (25%) y los saprófagos con cuatro (12,5%), mientras el resto de roles presentaron un número bajo de familias (Fig. 6B). No se presentaron familias con hábitos parasitoides.



**Figura 4.** Número de individuos (barras) y de familias (rombos) en cada una de las unidades de paisaje (BTF y Várzea), en los tres años de muestreo, en la comunidad Monifue Amena, Leticia - Colombia.

### Estacionalidad

**Abundancia y Riqueza.** En cuanto a la variación de la abundancia por época/año, se observaron cambios en la proporción para el año 2002 y 2004 donde se presentó una mayor abundancia de individuos en la época de lluvias que en la época seca, mientras que para el muestreo del año 2003 la relación se invierte (Fig. 3). Para la variación estacional de la abundancia por unidad de paisaje/año no se presentan variaciones importantes; para los tres años de muestreo BTF siempre presenta una mayor abundancia de individuos que Várzea (Fig. 4).

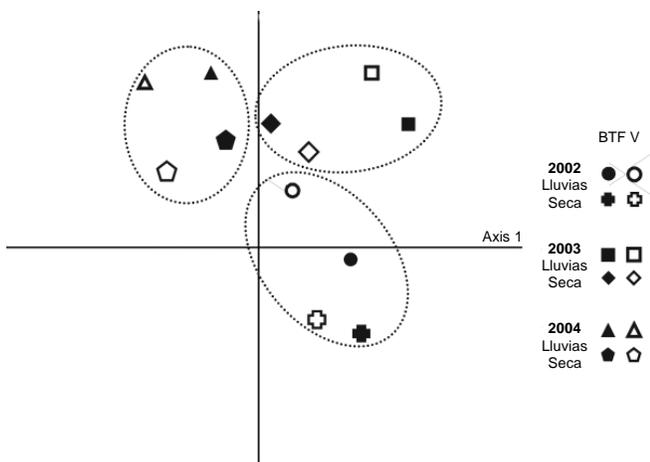
En la variación en la riqueza de familias por unidad de paisaje/año, BTF presenta una mayor riqueza de familias que Várzea (Fig. 4), mientras en el caso de las épocas de mayor precipitación no se presentó un patrón evidente (Fig. 3).

**Roles tróficos.** En cuanto a los roles tróficos y la estacionalidad, se observaron algunos cambios importantes entre los muestreos; para algunos roles como los xilomicetófagos y los copro-necrófagos se observó una marcada estacionalidad, mientras que para los demás roles los valores de abundancia fueron relativamente constantes (Fig. 7). Los roles raros como queratinófagos, xilófagos y micetófagos desaparecen para algunos muestreos, especialmente en el 2003 y en la época de lluvias (Fig. 7).

### Discusión

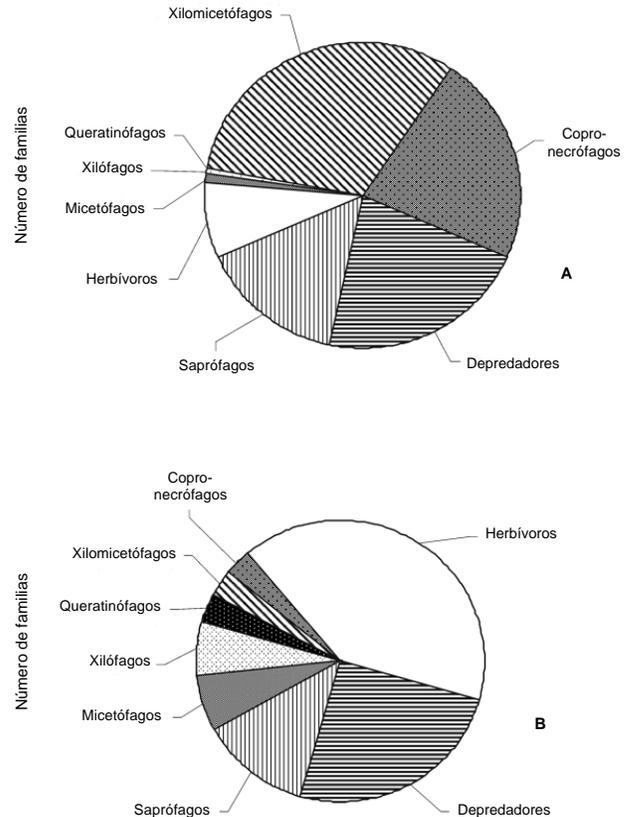
Los resultados concuerdan con varios estudios que evidencian una marcada estacionalidad de muchos grupos de insectos, especialmente en el caso de los coleópteros (Wolda 1978; Janzen 1983; Wolda 1988; Chandler y Wolda 1986; Montes de Oca y Halfiter 1995), pero adicionalmente plantea que la estacionalidad no solo está relacionada con la abundancia y riqueza de los ensamblajes sino con la funcionalidad de los mismos. Al presentarse cambios en la estructura trófica, es de esperar que determinados procesos funcionales se vean afectados de igual manera (Didham *et al.* 1998; Boyer *et al.* 2003).

La mayor abundancia de los individuos en la época de lluvias puede estar relacionada con una mayor oferta de



**Figura 5.** Análisis de correspondencia entre los años, las estaciones pluviométricas y los hábitats muestreados en la comunidad Monifue Amena, Leticia - Colombia.

recursos a nivel cualitativo y cuantitativo, que genera una mejor disponibilidad espacio-temporal (Huston 1996). De igual forma las condiciones climáticas son más favorables, como se demuestra en algunos estudios a nivel neotropical (Lauer 1992; Losos y CTFS Working Group 2004). Adicionalmente, otro factor que podría influir es la agregación espacial que se produce en época seca de ciertos recursos, lo cual aumentaría la competencia interespecifica (Foster 1996). A todo lo anterior hay que agregar la existencia de recursos específicos que solo



**Figura 6.** Proporción del número de individuos ( $n = 3691$ ) (A) y del número de familias ( $n = 32$ ) (B) para cada uno de los roles tróficos registrados en todo el muestreo en la comunidad Monifue Amena, Leticia - Colombia.

aparecen en época de lluvias, presentando una marcada estacionalidad y condicionando a las especies que han establecido relaciones estrechas a mantener estos mismos ciclos (Garwood 1996; Leigh y Windsor 1996).

Adis (1988) reporta una fuerte estacionalidad para los bosques de la amazonía central en Brasil, donde algunas familias de coleópteros aparecen solo en una determinada época del año, similar a lo encontrado en este estudio. Aunque algunos trabajos han arrojado una mayor riqueza y abundancia en época seca (Watanabe y Ruaysoongnerm 1989), es evidente que para el caso del neotrópico y los bosques de la amazonia la mayor abundancia y riqueza están estrechamente asociadas con la llegada de las lluvias (Holt y Spain 1986; Frith y Frith 1990; Krasnov y Shenbrot 1997; Gök y Durán 2004; Boyer *et al.* 2003).

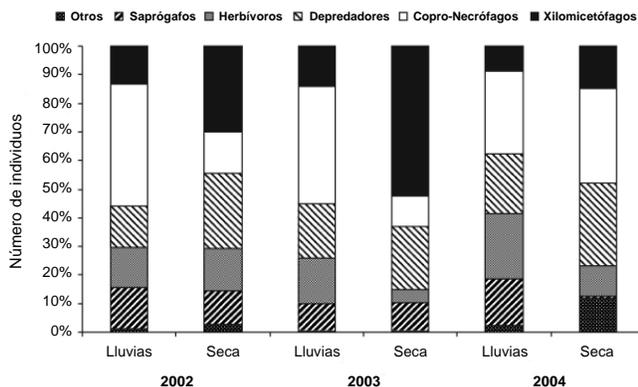
La baja riqueza de familias en la época seca puede estar obedeciendo a diversos factores como la existencia de grupos

especializados a estas condiciones o a recursos específicos de esta época (Losos 2004; Levings y Windsor 1996). También es posible considerar que las familias que aparecen en esta época sean malas competidoras, las cuales estarían optando por una estrategia subóptima en una época más difícil, pero con una menor competencia. Es interesante anotar que las familias presentes en esta época son herbívoras, beneficiándose del estrés hídrico que podría disminuir los mecanismos de defensa de algunas plantas (Waterman y McKey 1992), dándoles una ventaja sobre la calidad del recurso existente, aumentando la diversidad, pero manteniendo poblaciones bajas.

Las diferencias encontradas en el número de familias e individuos entre BTF y Várzea, responden a una mayor complejidad estructural a nivel vegetal presente en BTF (Duivenvoorden 1996), lo cual genera no solo una mayor cantidad y diversidad de recursos, sino microhábitats potenciales, en donde por ejemplo las presas pueden escapar de los depredadores (Prance 1992; Huston 1996; Losos y CTFS Working Group 2004). Es importante mencionar que el área de cobertura de BTF es mucho mayor que el área de la Várzea, lo cual puede llegar a afectar los valores encontrados, especialmente en el caso de las abundancias totales por hábitat.

Algunos trabajos han evidenciado que tanto la composición vegetal del bosque como la composición de los artrópodos puede verse afectada por las inundaciones (Beck 1972; Gasdorf y Goodnight 1963; Uetz *et al.* 1979), como se reporta para este estudio. A pesar de ello, algunas especies pueden escapar a las inundaciones, por medio de migraciones verticales, sobreviviendo debajo del agua, o coordinando sus ciclos para reproducirse cuando el suelo está seco (Irmiler 1979; Paarmann 1982; Adis 1988). También es posible que se presenten migraciones de Várzea a BTF en la época de inundaciones (Uetz *et al.* 1979).

Mientras menor sea la inundación y entre menos eventos de inundación existan en el año, mayor es la riqueza encontrada, por lo que los valores de riqueza fluctuarían más en zonas con fuertes inundaciones periódicas (Uetz *et al.* 1979). Algunas especies y familias pueden estar coordinadas con el inicio de la época de lluvias (Morais 1985; Adis 1988), mientras que otras pueden presentar rangos más amplios, especialmente aquellas especies con una alta capacidad de desplazamiento (Uetz *et al.* 1979), como sucedería en este estudio con la familia Scarabaeidae.



**Figura 7.** Porcentaje del número de individuos en cada uno de los roles tróficos del ensamblaje, en cada estación por año de muestreo, en la comunidad Monifue Amena, Leticia - Colombia.

Aunque algunos autores proponen que la presencia de disturbios intermedios periódicos puede aumentar la diversidad de un lugar (Connell y Slatyer 1977), la existencia de periodos de inundación en la Várzea, es sin duda un evento que impide su utilización por parte de los insectos, ya que son pocos los grupos que pueden adaptarse a este régimen, lo cual explicaría porqué la diversidad disminuye drásticamente en esta época (Uetz *et al.* 1979). Las diferencias entre años podrían atribuirse a variaciones climáticas, tanto por desplazamiento de los periodos de lluvias, como por la intensidad de los mismos (Lauer 1992). De igual manera, aunque los muestreos se realizaron en las mismas áreas, variaciones en la ubicación microespacial del muestreo pueden afectar la abundancia y riqueza de lo capturado (Melbourne 1999).

Otro aspecto que puede estar afectando las variaciones entre los años, es la existencia de ciclos ambientales o biológicos que trascienden la temporalidad anual, presentando intervalos más amplios de los tres años de muestreo. Igualmente es posible que con las fuertes dinámicas existentes en los bosques neotropicales (Losos y CTFS Working Group 2004; Leigh *et al.* 1996; Vallego *et al.* 1996), se hayan muestreado ensamblajes diferentes, tanto por la escogencia de microhábitats diferentes, como por eventos aleatorios que ocasionen una mayor heterogeneidad al interior de cada año.

En relación con los roles tróficos, se ha evidenciado una marcada estacionalidad de diferentes recursos (Leigh y Windsor 1996), como es el caso de la hojarasca y la madera, recursos que son más fáciles de degradar en época húmeda por hongos, mientras que en época seca los xilófagos y xilomicetófagos pueden dominar el recurso, generando una fuerte competencia y una dinámica marcada entre estos dos grupos (Bagyaray 1992; Brokaw 1996; Esser y Lieth 1992; Swift y Anderson 1992). En este sentido el rol menos afectado por la precipitación sería el de los depredadores, aunque a nivel general en época seca la mayoría de los roles disminuyen por la falta de una humedad adecuada para llevar a cabo algunas funciones, como en el caso de los coprófagos donde el excremento llega a ser inutilizable (Cambefort y Hanski 1991).

Existe un mayor número de individuos asociados a aquellos recursos que presentan mayor abundancia, por lo que los recursos efímeros en espacio y tiempo, presentan una mayor cantidad de roles pero pocos individuos (Hanski 1990; Hanski y Cambefort 1991). En este sentido podría pensarse que los roles dominantes, que no desaparecen en el tiempo, tienen una mayor importancia para el constante funcionamiento del ecosistema, aunque la desaparición de roles no tan comunes, podría afectar los procesos en una escala temporal a largo plazo.

Aquellos roles tróficos raros o asociados a recursos poco abundantes, tendrían una mayor posibilidad de presentar extinciones locales al ser más susceptibles (Larsen *et al.* 2005), por lo que deberían ser grupos bandera en estrategias de conservación. Algo similar estaría sucediendo con niveles tróficos superiores, los cuales presentan una mayor susceptibilidad a la extinción que grupos basales (Holt 1996). En este sentido debe plantearse el uso de especies funcionales, que aporten información más completa sobre el estado de conservación de un hábitat, ya que es posible que ciertas especies aparezcan o desaparezcan, sin afectar el equilibrio funcional, pero la desaparición de un rol puede ocasionar cambios en el ecosistema. Como propone Didham *et al.* (1998) los depredadores son un grupo que se incrementa con eventos de disturbio, siendo un interesante grupo de monitoreo.

**Lineamientos de investigación.** Es importante corroborar los resultados con otros grupos megadiversos como himenópteros, donde se puedan establecer roles tróficos semejantes, así como replicar este estudio a diferentes rangos latitudinales donde se comparen los resultados. Se sugiere igualmente el tener unidades de muestreo más específicas en el tiempo, realizando recolecciones mensuales, con el objetivo de verificar si las variaciones entre cada uno de los periodos escogidos obedecen a patrones generales o son eventos puntuales.

Deben seguirse acumulando datos de esta localidad, con el fin de poder detectar cambios a una escala temporal mayor. Otro aspecto que podría tenerse en cuenta es la asignación más específica de los roles tróficos, ya que en algunos grupos es algo general, presentándose variaciones a nivel específico como es el caso de Staphylinidae, Curculionidae y Tenebrionidae, por lo que en un análisis más detallado (morfoespecies, géneros o especies) podrían evidenciarse cambios más sutiles en las dinámicas estacionales.

Se recomienda incluir otros microhabitats no muestreados, que podrían estar albergando otra fauna, especialmente en la época de verano, como es el caso de las bromelias (Paoleiti *et al.* 1991), o del dosel, donde se ha demostrado su importante aporte a la estructura del ensamblaje (Erwin 1983; Watanabe y Ruaysoongnerm 1989, Lowman *et al.* 1996). Igualmente se deberían incluir otras áreas de muestreo como la Chagra, donde las dinámicas estacionales pueden diferir e implementar otros métodos de captura no utilizados.

**Anexo 1.** Familias de Coleoptera capturadas durante los tres años de muestreo en la comunidad Monifue Amena, Amazonas - Colombia (taxonomía según Arnett *et al.* 2002).

SUBORDEN	SUPERFAMILIA	FAMILIA
Adephaga	Carabaeoidea	Carabidae
		Cicindelidae
Polyphaga	Hydrophiloidea	Hydrophilidae
		Staphylinidae
	Staphylinidae	Leiodidae
		Staphylinidae
	Histeroidea	Histeridae
		Glareidae
	Scarabaeoidea	Melolonthidae
		Passalidae
	Buprestoidea	Scarabaeidae
		Buprestidae
Elateroidea	Cantharidae	
	Elateridae	
Bostrichoidea	Lampyridae	
	Lycidae	
	Anobiidae	
	Dermestidae	
Cucujoidea	Aderidae	
	Byturidae	
	Coccinellidae	
	Erotylidae	
	Nitidulidae	
	Phalacridae	
Tenebrionoidea	Meloidae	
	Oedemeridae	
Chrysomeloidea	Tenebrionidae	
	Cerambycidae	
	Chrysomelidae	
Curculionoidea	Brentidae	
	Curculionidae	
	Scolytidae	

Finalmente este estudio demuestra que existe una fuerte dinámica estacional en la riqueza de las familias encontradas, lo cual puede estar muy relacionado con la dinámica propia de los recursos o con un mecanismo de dilución de la competencia. A pesar de presentarse esta fuerte dinámica estacional, la estructura de los roles tróficos se mantiene relativamente estable, lo cual está señalando la importancia de la regulación de los mismos con respecto a la funcionalidad de un ecosistema; a pesar de aparecer y desaparecer diferentes familias del ensamblaje, siguen existiendo familias que cumplen con los roles necesarios para mantener esta funcionalidad en el ecosistema.

### Agradecimientos

A todos los estudiantes que contribuyeron en el trabajo de campo, durante los tres años de muestreo. A la comunidad indígena Monifue-Amena por la hospitalidad brindada durante la elaboración de los muestreos. A dos revisores anónimos y al editor de la revista por todos sus comentarios y aportes los cuales fueron sumamente valiosos para mejorar la calidad del manuscrito. Este trabajo se realizó bajo el convenio No. 1662, entre CorpoAmazonía, Comunidad Monifue-Amena y Pontificia Universidad Javeriana.

### Literatura Citada

- ADIS, J. 1988. Comparative ecological studies of the terrestrial arthropod fauna in central Amazonian inundation forests. *Amazoniana* 7: 87-173.
- ARIAS-DÍAZ, D. M.; REINOSO-FLOREZ, G.; GUEVARA-CARDONA, G.; VILLA-NAVARRO, F. A. 2007. Distribución espacial y temporal de los coleópteros acuáticos en la cuenca del río Coello (Tolima, Colombia). *Caldasia* 29 (1): 177-194.
- ARNETT, R. H.; DOWNIE, N. M.; JAQUES, H. E. 1980. How to know the beetles. 2<sup>a</sup> ed. Mc Graw Hill, Boston. 416 p.
- ARNETT Jr., R. H.; THOMAS, M. C. 2000. American beetles. Archostemata, Myxophaga, Adephaga, Polyphaga: Staphyliniformia. Vol. I. Lewis Publishers, London. 464 p.
- ARNETT Jr., R. H.; THOMAS, M. C.; SKELLEY, P. E.; FRANK, J. H. 2002. American beetles. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. Vol. II. CRC Press, Florida. 861 p.
- BAGYARAY, D. J. 1992. Mycorrhizas, pp. 537-546. En: Lieth, H.; Werger, M. J. A. Tropical rain forest ecosystems. Biogeographical and ecological studies. Elsevier, New York. 713 p.
- BECK, L. 1972. The influence of annual flooding on population changes of soil arthropods in the central amazon rain forest region. *Pedobiologia* 12: 133-148.
- BLAND, R. G.; JAQUES, H. E. 1978. How to know the insects. 3<sup>a</sup> ed. Wm. C. Brown Co., Iowa. 409 p.
- BLOM, P. E.; FLEISCHER, S. J.; SMILOWITZ, Z. 2002. Spatial and temporal dynamics of Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in fields with perimeter and spatially targeted insecticides. *Environmental Entomology* 31 (1): 149-159.
- BORROR, D. J.; TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. 1989. An Introduction to the Study of Insects. 6a ed. Saunders College Publishing, Philadelphia USA. 875 p.
- BOYER, A. G.; SWEARINGEN, R. E.; BLAHA, M. A.; FORTSON, C. T.; GREMILLION, S. K.; OSBORN, K. A.; MORAN, M. D. 2003. Seasonal variation in top-down and bottom-up processes in a grassland arthropod community. *Oecologia* 136: 309-316.
- BROKAW, N. V. L. 1996. Treefalls: frequency, timing, and consequences, pp. 101-108. En: Leight Jr., E. G.; Rand, A. S.; Windsor, D. M. (eds.). The Ecology of a tropical forest. Seasonal rhythms and long-term changes. Smithsonian Tropical Research Institution. 503 p.
- BROWN Jr., K. S. 1991. Conservation of neotropical environments: insects as indicators, pp. 449-504. En: Collins, N.; Thomas, J. (eds.). Conservation of insects and their environments. Academic Press, London.

- CAMBEFORT, Y.; HANSKI, I. 1991. Dung beetle population biology, pp. 36-50. En: Hanski, I.; Cambefort, Y. (eds.). *Dung Beetle Ecology*. Princeton University Press, New Jersey. 481 p.
- CHANDLER, D. S.; WOLDA, H. 1986. Seasonality and diversity of *Caccoplectus*, with a review of the genus and description of a new genus, *Caccoplectinus* (Coleoptera: Pselaphidae) *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere* 113: 469-524.
- CONNELL, J. H.; SLATYER, R. O. 1977. Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *American Naturalist* 111: 1119-1144.
- COSTA LIMA, A. D. 1952. Insetos do Brasil, Coleopteros Tomo 7, 8, 9 y 10. Escola Nacional de Agronomia, Brasil. 1392 p.
- CROUAU-ROY, B.; CROUAU, Y.; FERRE, C. 1992. Dynamic and temporal structure of the troglitic beetle *Speonomus hydrophilus* (Coleoptera: Bathysciinae). *Ecography* 15 (1): 12-18.
- CROWSON, R. A. 1968. The natural classification of the families of Coleoptera. Oxford, England, E.W. Classey. 195 p.
- CROWSON, R. A. 1981. The biology of Coleoptera. London: Academic Press. 802 p.
- DAVIS, D. E. 1945. The annual cycle of plants, mosquitos, birds, and mammals in two brazilian forests. *Ecological Monographs* 15: 243-295.
- DIDHAM, R. K.; LAWTON, J. H.; HAMMOND, P. M.; EGGLETON, P. 1998. Trophic structure stability and extinction dynamics of beetles (Coleoptera) in tropical forest fragments. *Philosophical Transactions of The Royal Society, London, Biological Sciences* 353 (1367): 437-451.
- DOBZHANSKY, T.; PAVAN, C. 1950. Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. *Journal of Animal Ecology* 19: 1-14.
- DUIVENVOORDEN, J. 1996. Patterns of tree species richness in rain forest of the Middle Caquetá Area, Colombia, NW Amazonia. *Biotropica* 28 (2): 142-158.
- ELTON, C. S. 1973. The structure of invertebrate populations inside neotropical rain forest. *The Journal of Animal Ecology* 42 (1): 55-104.
- ERWIN, T. L. 1982. Tropical forests: their richness in Coleoptera and other arthropod species. *Coleoptera Bulletin* 36: 74-75.
- ERWIN, T. L. 1983. Beetles and other arthropods of the tropical forest canopies at Manaus, Brasil, sampled with insecticidal fogging techniques, pp. 59-75. En: Sutton, S. L.; Whitmore, T. C., Chadwick, A. C. (eds.). *Tropical Rain Forest: Ecology and Management*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
- ERWIN, T. L.; SCOTT, J. C. 1981. Seasonal and size patterns, trophic structure, and richness of Coleoptera in the tropical arboreal ecosystems: The fauna of the tree *Luehea seemannii* Triana and Planch in the Canal Zone of Panama. *The Coleopterist Bulletin* 34 (3): 305-322.
- ESCOBAR, S. F.; CHACÓN DE ULLOA, P. 2000. Distribución espacial y temporal en un gradiente de sucesión de la fauna de coleópteros coprófagos (Scarabaeinae, Aphodiinae) en un bosque tropical montano, Nariño - Colombia. *Revista de Biología Tropical* 48 (4): 961-975.
- ESSER, G.; LIETH, H. 1992. Decomposition in tropical rain forests compared with other parts of the world, pp. 571-580. En: Lieth, H.; Werger, M. J. A. *Tropical rain forest ecosystems. Biogeographical and ecological studies*. Elsevier, New York. 713 p.
- FOSTER, R. B. 1996. The seasonal rhythm of fruitfall on Barro Colorado Island, pp. 151-172. En: Leight Jr., E. G.; Rand, A. S.; Windsor, D. M. (eds.). *The Ecology of a tropical forest. Seasonal rhythms and long-term changes*. Smithsonian Tropical Research Institution. 503 p.
- FRITH, D.; FRITH, C. 1990. Seasonality of litter invertebrate populations in an Australian upland tropical rain forest. *Biotropica* 22 (2): 181-190.
- GARWOOD, N. C. 1996. Seasonal rhythm of seed germination in a semideciduous tropical forest, pp. 173-185. En: Leight, E. G. Jr.; Rand, A. S.; Windsor, D. M. (eds.). *The Ecology of a tropical forest. Seasonal rhythms and long-term changes*. Smithsonian Tropical Research Institution. 503 p.
- GASDORF, E. C.; GOODNIGHT, C. J. 1963. Studies on the ecology of soil arachnids. *Ecology* 44: 261-268.
- GÖK, A.; DURÁN, E. 2004. A survey of the subfamily Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae) of Isparta Province (Turkey), with two new records. *Journal of the Entomological Research Society* 6 (2): 15-24.
- GRUNER, L. 1975. Étude de l'activité des adultes de divers Scarabaeides Antillais au moyen de piégeages lumineux et chimiques. *Annales de Zoologie Ecologie Animale* 7: 399-423.
- HALFFTER, G.; FAVILA, M. E. 1993. The Scarabaeinae (Insecta: Coleoptera) and animal group for analyzing, inventorying and monitoring biodiversity in tropical rain forest and modified landscape. *Biology Internacional* 27: 15-21.
- HANSKI, I. 1990. Dung and carrion insects, pp. 127-145. En: Shorrocks, B.; Swingland, I. R. (eds.). *Living in a patchy environment*. Oxford Science Publications, Oxford. 246 p.
- HANSKI, I.; CAMBEFORT, Y. 1991. Resource partitioning, pp. 330-349. En: Hanski, I.; Cambefort, Y. (eds.). *Dung Beetle Ecology*. Princeton University Press, New Jersey. 481 p.
- HOLT, R. D. 1996. Food webs in space: an island biogeographic perspective, pp. 313-323. En: Polis, G. A.; Winemiller, K. O. (eds.). *Food webs: integration of patterns and dynamics*. Chapman & Hall, New York.
- HOLT, J.; SPAIN, A. V. 1986. Some biological and chemical changes in a north Queensland soil following replacement of rain forest with *Araucaria cunninghamii* (Coniferae: Araucariaceae). *Journal of Applied Ecology* 23: 227-237.
- HOWDEN, H. F.; NEALIS, V. G. 1975. Effects of clearing in a tropical rain forest on the composition of the coprophagous scarab fauna (Coleoptera). *Biotropica* 7 (2): 77-83.
- HUSTON, M. A. 1996. Biological diversity. The coexistence of species on changing landscapes. Cambridge University Press, Cambridge. 681 p.
- IRMLER, U. 1979. Abundance fluctuations and habitat changes in soil beetles in central Amazonian inundations forests (Coleoptera: Carabidae, Staphylinidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 14: 1-16.
- JANZEN, D. H. 1983. Seasonal changes in abundance of large nocturnal dung-beetles (Scarabaeidae) in a Costa Rican deciduous forest and adjacent horse pasture. *Oikos* 41: 274-283.
- JOHNSON, K. H.; VOGT, K. A.; CLARK, H. J.; SCHMITZ, O. J.; VOGT, D. J. 1996. Biodiversity and the productivity and stability of ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 372-377.
- KLEIN, B. C. 1989. Effects of forest fragmentation on dung and carrion beetle communities in central amazonia. *Ecology* 70 (6): 1715-1725.
- KRASNOV, B.; AYAL, Y. 1995. Seasonal changes in darkling beetle communities (Coleoptera: Tenebrionidae) in the Ramon erosion cirque, Negev Highlands, Israel. *Journal of Arid Environments* 31: 335-347.
- KRASNOV, B.; SHENBROT, G. 1997. Seasonal variation in spatial organization of a darkling beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) community. *Environmental Entomology* 26 (2): 178-190.
- KREMEN, C.; COLLWELL, T.; ERWIN, D.; MURPHY, D.; NOSS, R.; SANJAYAN, M. 1993. Terrestrial Arthropod Assemblages: Their use in conservation planning. *Conservation Biology* 7 (4): 796-808.
- LARSEN, T. H.; WILLIAMS, N. M.; KREMEN, C. 2005. Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. *Ecology Letters* 8: 538-547.
- LAUER, W. 1992. Climate and weather, pp. 7-53. En: Lieth, H.; Werger, M. J. A. *Tropical rain forest ecosystems. Biogeographical and ecological studies*. Elsevier, New York. 713 p.
- LAWRENCE, J. F.; NEWTON Jr., A. F. 1995. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, and references and data on family-group names), pp. 779-1006. En: Pakaluk, J.; Slipinski, S. A. (eds.). *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera. Papers celebrating the 80<sup>th</sup> birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum I Instytut Zoologii PAN, Warsaw, Poland.
- LAWTON, J. H. 1995. Population dynamic principles, pp. 147-163. En: Lawton, J. H.; May, R. M. (eds.). *Extinction rates*. Oxford University Press, Oxford.
- LEIGH Jr., E. G.; LOO DE LAO, S.; CONDIT, R.; HUBBELL, S. P.; FOSTER, R. B.; PEREZ, R. 1996. Barro Colorado island forest dynamics plot, Panama, pp. 451-463. En: Leight, E. G. Jr.; Rand, A. S.; Windsor, D. M. (eds.). *The Ecology of a tropical forest. Seasonal rhythms and long-term changes*. Smithsonian Tropical Research Institution. 503 p.

- LEIGH Jr., E. G.; WINDSOR, D. M. 1996. Forest production and regulation of primary consumers on Barro Colorado Island, pp. 111-122. En: Leight Jr., E. G.; Rand, A. S.; Windsor, D. M. (eds.). The ecology of a tropical forest. Seasonal rhythms and long-term changes. Smithsonian Tropical Research Institution. 503 p.
- LEVINGS, S.C.; WINDSOR, D.M. 1996. Seasonal and annual variation in litter arthropod populations, pp. 355-387. En: Leight, E. G. Jr.; Rand, A. S.; Windsor, D. M. (eds.). The ecology of a tropical forest. Seasonal rhythms and long-term changes. Smithsonian Tropical Research Institution. 503 p.
- LOSOS, E. C. 2004. Habitat specialization and species rarity in forest dynamics plots. Introduction, pp. 103-106. En: Losos, E. C.; Egbert Jr., G. L. (eds.). Tropical forest diversity and dynamism. Findings from a large-scale plot network. The University Chicago Press, Chicago. 645 p.
- LOSOS, E. C.; CTFS WORKING GROUP. 2004. The structure of tropical forests, pp. 69-78. En: Losos, E. C.; Egbert Jr., G. L. (eds.). Tropical forest diversity and dynamism. Findings from a large-scale plot network. The University Chicago Press, Chicago. 645 p.
- LOWMAN, M. D.; WITTMAN, P. K.; MURRAY, D. 1996. Herbivory in a bromeliad of the Peruvian rain forest canopy. Journal of Bromeliad Society 46: 52-55.
- MARTÍN PIERA, F.; FERNÁNDEZ, T. A. 1996. Coleópteros de la Sierra de Chiribiquete. Elytron 10: 23-50.
- MELBOURNE, B. A. 1999. Bias in the effect of habitat structure on pitfall traps: an experimental evaluation. Australian Journal of Ecology 24: 228-239.
- MIKKELSON, G. M. 1993. How do food webs fall apart? A study of changes in trophic structure during relaxation on habitat fragments. Oikos 67: 539-547.
- MONTES DE OCA, E. T.; HALFFTER, G. 1995. Daily and seasonal activities of a guild of the coprophagous, burrowing beetle (Coleoptera Scarabaeidae Scarabaeinae) in tropical grassland. Tropical Zoology 8: 159-180.
- MORAIS, J. W. 1985. Abundância e distribuição vertical de Arthropoda de solo numa floresta primária não inundada. Dissertação de Mestrado, INPA/FUA, Manaus, Amazonas. 92 p.
- NAEEM, S.; THOMPSON, L. J.; LAWLER, S. P.; LAWTON, J. H.; WOODFIN, R. M. 1995. Empirical evidence that declining species diversity may alter the performance of terrestrial ecosystems. Philosophical Transactions of The Royal Society, London, Biological Sciences 347: 249-262.
- NEW, T. R. 1979. Phenology and relative abundance of Coleoptera on some Australian acacias. Australian Journal of Zoology 27 (1): 9-16.
- PAARMANN, W. 1979. Ideas about the evolution of the various annual, reproduction rhythms in carabid beetles of the different climatic zones, pp. 119-132. En: Den Boer, P. J.; Thiele, H. U.; Weber, F. (eds.). On the evolution of behaviour in carabid beetles. Veenman, Wagen-ingen, Netherlands. 222 p.
- PAARMANN, W. 1982. *Pentacomia egregia* Chaud. (Coleoptera, Cicindelidae), a univoltine species in the Amazonian inundation forest. The Coleopterist Bulletin 36: 183-188.
- PAARMANN, W.; JOACHIM, A.; NIGEL, S.; BURKHARD, G.; STUMPE, P.; STARITZ, B.; BOLTE, H.; KÜPPERS, S.; HOLZKAMP, K.; NIESS, C.; DA FONSECA, C. R. V. 2001. The structure of ground beetle assemblages (Coleoptera: Carabidae) at fig fruit falls (Moraceae) in a terra firme rain forest near Manaus (Brazil). Journal of Tropical Ecology 17: 549-561
- PAULIAN, R. 1988. Biologie des Coleopteres. Editions Lechevalier, Paris. 719 p.
- PAOLEITI, M. G.; TAYL, R. A. J.; INNER, B. R.; STINNER, D. H.; BENZING, D. H. 1991. Diversity of soil fauna in the canopy and forest floor of a Venezuelan cloud forest. Journal of Tropical Ecology 7: 373-383.
- PAPP, C. S. 1984. Introduction to North American Beetles. Entomography Publications, Sacramento. 335 p.
- PEARSON, D. 1994. Selection indicator taxa for the quantitative assessment of biodiversity. Philosophical Transactions of The Royal Society, London, Biological Sciences 345: 75-79.
- PEARSON, D.; CASSOLA, F. 1992. World-Wide species richness patterns of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): indicator taxon for biodiversity and conservation studies. Conservation Biology 6 (3): 376-391.
- PECK, S. B.; FORSYTH, A. 1982. Composition, structure, and competitive behaviour in a guild of ecuadorian rain forest dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). Canadian Journal of Zoology 60: 1624-1634.
- PIMM, S. L. 2002. Food webs. University of Chicago Press, Chicago. 219 p.
- PINHEIRO, F.; DINIZ, I. R.; COELHO, D.; BANDEIRA, M. P. S. 2002. Seasonal pattern of insect abundance in the Brazilian cerrado. Austral Ecology 27: 132-136.
- PRANCE, G.T. 1992. American tropical forests, pp. 99-132. En: Lieth, H.; Werger, M. J. A. Tropical
- SWIFT, M. J.; ANDERSON, J. M. 1992. Decomposition, pp. 547-569. En: Lieth, H.; Werger, M. J. A. Tropical rain forest ecosystems. Biogeographical and ecological studies. Elsevier, New York.
- TILMAN, D.; DOWNING, J. A. 1994. Biodiversity and stability in grasslands. Nature 367: 362-365.
- UETZ, G. W.; VAN DER LAAN, K. L.; SUMMERS, G. F.; GIBSON, P. A. K.; GETZ, L. L. 1979. The effects of flooding on floodplain arthropod distribution, abundance and community structure. American Midland Naturalist 101 (2): 286-299.
- VALLEGO, M. I.; SAMPER, C.; MENDOZA, H.; OTERO, J. T. 1996. La Planada forest dynamics plot, Colombia, pp. 517-526. En: Leight Jr., E. G.; Rand, A. S.; Windsor, D. M. (eds.). The ecology of a tropical forest. Seasonal rhythms and long-term changes. Smithsonian Tropical Research Institution. 503 p.
- WATANABE, H.; RUAYSOONGNERM, S. 1989. Estimation of arboreal arthropod density in a dry evergreen forest in northeastern Thailand. Journal of Tropical Ecology 5 (2): 151-158.
- WATERMAN, P. G.; McKEY, D. 1992. Herbivory and secondary compounds in rain-forest plants, pp. 513-536. En: Lieth, H.; Werger, M. J. A. Tropical rain forest ecosystems. Biogeographical and ecological studies. Elsevier, New York.
- WHITE, R. E. 1983. Beetles. Peterson Field Guides, Houghton, Boston. 368 p.
- WOLDA, H. 1978. Fluctuations in abundance of tropical insects. The American Naturalist 112 (988): 1017-1045.
- WOLDA, H. 1988. Insect seasonality: why?. Annual Review of Ecology and Systematics 19: 1-18.
- WOLDA, H.; ESTRIBI, M. 1985. Seasonal distribution of the large sloth beetle *Uroxys gorgon* Arrow (Scarabaeidae, Scarabaeinae) in light-traps in Panama, pp. 319-322. En: Montgomery, G. G. (ed.). The evolution and ecology of armadillos, sloth and vermilinguas (Mammalian, Xenarthra-Edentata. Smithsonian Institute Press, Washington
- YAHIRO, K.; YANO, K. 1997. Ground beetles (Coleoptera: Carabaeoidea) caught by a light trap during ten years. ESAKIA 37: 57-69.
- ZERM, M.; JOACHIM, A. 2001. Spatio-temporal distribution of larval and adult tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae) from open areas in Central Amazonian floodplains (Brazil). Studies on Neotropical Fauna and Environment 36 (3): 185-198.

Recibido: 3-nov-2006 • Aceptado: 5-nov-2007

## Avispas no polinizadoras asociadas a *Ficus andicola* (Moraceae) en la Cordillera Central de Colombia

Non-pollinating fig wasps associated with *Ficus andicola* (Moraceae) in the Central Andes of Colombia

WILLIAM CARDONA<sup>1</sup>, PATRICIA CHACÓN DE ULLOA<sup>2</sup>, GUSTAVO KATTAN<sup>3</sup>

**Resumen:** En el interior de las inflorescencias (síconos) de los *Ficus* se pueden encontrar varias especies de avispas que se desarrollan. Entre estos insectos se encuentra el polinizador, que por lo general es una sola especie, mientras que las otras avispas no ofrecen ningún beneficio al árbol y por el contrario pueden producir efectos negativos sobre el número de semillas y polinizadores producidos. En este trabajo se estudió la composición de la fauna de avispas no polinizadoras asociadas a *Ficus andicola* en la Cordillera Central de Colombia. Se examinaron 418 síconos que fueron recolectados de 12 árboles; las avispas que emergieron de cada uno de ellos se contaron y separaron por morfoespecies. El 46,5% de las flores de *F. andicola* produjeron semillas y el 53,5% avispas. Se encontraron 22 morfoespecies de avispas no polinizadoras emergiendo de los síconos de *F. andicola*. Las ocho más frecuentes fueron identificadas a nivel de género. Las morfoespecies más abundantes, la cuales estuvieron presentes en más del 40% de los síconos, fueron en su orden, *Idarnes* sp.1, *Heterandrium* sp. e *Idarnes* sp.2. La mayoría de las morfoespecies fueron encontradas en menos del 10% de los síconos. Basados en curvas de acumulación de especies las 22 morfoespecies encontradas representan el 88% de las esperadas para *F. andicola*.

**Palabras clave:** Avispas de los *Ficus*. Agaonidae. *Pegoscapus*. *Idarnes*. *Heterandrium*.

**Abstract:** Several species of wasps may develop inside the inflorescences (figs) of *Ficus* spp. These species include the pollinator, usually a single species, while the other species do not provide any benefits to the tree; instead, they may affect negatively the number of seeds and pollinators produced. In this work we studied the composition of the non-pollinating fig wasp fauna associated with *Ficus andicola* in the Central Cordillera of the Colombian Andes. We examined 418 figs that were collected from 12 trees; the wasps that emerged from each one were counted and separated into morphospecies. A total of 46.5% of flowers produced seeds and 53.5% produced wasps. Twenty-two morphospecies were found emerging from figs of *F. andicola*. The eight most abundant were identified to genus. The most abundant morphospecies, which were present in more than 40% of figs, were *Idarnes* sp1, *Heterandrium* sp. and *Idarnes* sp2. Most wasp species were found in less than 10% of figs. Based on species accumulation curves, the 22 morphospecies found represent 88% of the expected number of species for *F. andicola*.

**Key words:** Fig wasps. Agaonidae. *Pegoscapus*. *Idarnes*. *Heterandrium*.

### Introducción

Entre los árboles del género *Ficus* y las avispas de la familia Agaonidae existe una relación mutualista de tipo obligado. Esta situación se presenta porque dichas avispas son las únicas que pueden polinizar las flores de los *Ficus*; las avispas a su vez solo pueden desarrollarse en el interior de las flores femeninas de estos árboles (Janzen 1979; Wiebes 1979; Ramírez 1974, 1976). La inflorescencia de los *Ficus* es un receptáculo cerrado en forma globular denominado sícono. Solo hay una vía de acceso a su interior, a través de un pequeño túnel formado por escamas estrechamente superpuestas, que se encuentran en su parte apical formando el ostiolo (Berg 1989; Galil y Eisikowitch 1968). Los únicos insectos con adaptaciones estructurales y morfológicas que les permiten pasar a través del ostiolo son las avispas de la subfamilia Agaoninae, por lo tanto son las únicas que pueden tener contacto directo con las flores y polinizarlas (Janzen 1979; Wiebes 1979; Ramírez 1976, 1974). Anteriormente se creía que la relación entre *Ficus* y agaonidos era altamente específica, de tal manera que, por cada especie de *Ficus* había una especie de agaonido (Ramírez

1970). Sin embargo, nuevos estudios han encontrado algunas excepciones y actualmente se conocen varios casos en los que una especie de *Ficus* puede ser polinizada por más de una especie de avispa, y una avispa puede polinizar más de una especie de *Ficus*, aunque es más frecuente el primer caso (Cook y Rasplus 2003; Molbo *et al.* 2003; Michaloud *et al.* 1996; Kerdelhue *et al.* 1997).

La polinización del árbol y la reproducción de las avispas se da a través de un ciclo sincronizado (Galil y Eisikowitch 1968). Cuando las flores femeninas están receptivas, las avispas hembras entran cargadas de polen, pasando a través del ostiolo, proceso en el cual pierden sus alas, partes de las patas y las antenas (Ramírez 1976; Wiebes 1979). Las flores femeninas de los *Ficus* presentan una gradación continua en el tamaño del estilo (Bronstein 1988; Otero y Ackerman 2002), las avispas ponen sus huevos introduciendo su ovipositor a través de este, pero solo pueden poner huevos en las que tienen el estilo más corto que sus ovipositores; las flores en las que no pueden poner los huevos, por tener el estilo largo, son las que producen las semillas (Ramírez 1976; Wiebes 1979; Herre 1989; Nefdt y Compton 1996). Después de la oviposición, las hembras

<sup>1</sup> Autor para correspondencia: Biólogo, Universidad del Valle. Fundación EcoAndina/WCS - Programa Colombia. Apartado Aéreo 25527 Cali, Colombia. [williamcardona@gmail.com](mailto:williamcardona@gmail.com)

<sup>2</sup> Bióloga, Ph. D. Departamento de Biología, Universidad del Valle. Apartado Aéreo 25360 Cali, Colombia. [pachacon@uniweb.net.co](mailto:pachacon@uniweb.net.co)

<sup>3</sup> Biólogo, Ph. D. Fundación EcoAndina/WCS - Programa Colombia. Apartado Aéreo 25527 Cali, Colombia. [gtkattan@wcs.org](mailto:gtkattan@wcs.org)

mueren en el interior del sícono. Las larvas inducen agallas en los ovarios, allí llevan a cabo la fase de desarrollo alimentándose del tejido de los óvulos (Galil y Eisikowitch 1968). Cuando las semillas y las avispas han culminado su fase de desarrollo, los machos emergen, fertilizan a las hembras y abren huecos en la pared del sícono por donde las hembras pueden salir. A continuación emergen las hembras, para este momento las flores masculinas están maduras, por lo tanto las hembras tienen contacto con el polen antes de abandonar el sícono en busca de otro que esté receptivo para empezar de nuevo el ciclo (Herre 1989; Galil y Eisikowitch 1968).

Dentro de los síconos se desarrollan otras avispas que nunca tienen contacto directo con las flores femeninas y por lo tanto no las polinizan (Janzen 1979). Estas avispas pertenecen a las familias Agaonidae, Eurytomidae, Orymidae, Pteromalidae y Torymidae y se les conoce como avispas no polinizadoras de los *Ficus* (Boucek 1993). Pueden ser desde simples comensales, hasta parásitos que afectan el número de semillas y avispas polinizadoras que se desarrollan en los síconos. El número de especies de avispas asociadas a una especie de *Ficus* puede variar entre 3 y 30 especies (Bronstein 1991; Compton y Nefdt 1990; Compton y Hawkins 1992; Kerdelhue y Rasplus 1996; Boucek *et al.* 1981). Estas avispas dependen de la presencia del polinizador para su desarrollo ya que por lo general los síconos en los que no están presentes son abortados por el árbol. Además, la mayoría de las avispas usan los huecos abiertos en la pared del sícono por el polinizador para poder abandonarlo (Bronstein 1991; Kerdelhue y Rasplus 1996; West *et al.* 1996). Las avispas no polinizadoras de los *Ficus* pueden ser ubicadas en tres grupos funcionales (Cook y Rasplus 2003): 1) avispas que inducen agallas grandes y sus parasitoides, estas avispas son mucho más grandes que los polinizadores y ovipositan desde afuera, durante o antes de la polinización. Algunas inducen agallas grandes en la pared interna del sícono y las otras son parasitoides de estas. Se presentan en pocos síconos y en baja cantidad. 2) avispas que inducen agallas pequeñas, también ovipositan desde afuera durante o después de la polinización. Inducen agallas en las flores femeninas y están presentes en la mayoría de los síconos en medianas a grandes cantidades. 3) parásitos internos: están presentes sólo en el viejo mundo y entran a través del ostiolo al tiempo que lo hace el polinizador. Ovipositan en las flores femeninas y son encontradas en pocos síconos, pero pueden ser muy abundantes.

Existen aproximadamente 750 especies de *Ficus* en el mundo, de las cuales cerca de 125 se encuentran en América; la mayoría de los *Ficus* de la región neotropical están asociados con bosques húmedos de tierras bajas (Berg 1989). La mayoría de los estudios han sido enfocados sobre esas especies y solo se conoce la fauna asociada a una fracción de ellas (Wiebes 1995; Herre 1996; Schiffler 2002; West y Herre 1994; West *et al.* 1996). En Colombia no se conoce la fauna de avispas asociadas a ninguna especie de *Ficus*, pues hasta el momento los trabajos realizados en el país se han enfocado en su biología floral (Martínez 1981; Ramos 1985; Largacha 1997). *Ficus andicola* Standl, es una especie de tamaño mediano que crece principalmente en los bordes del bosque y en zonas abiertas, la máxima altura que alcanza es de aproximadamente 15m y es una especie de *Ficus* muy abundante (L. Valenzuela datos sin publ.). Los síconos de *F. andicola* son pedunculados, con brácteas basales carnosas las cuales permanecen hasta que el fruto madura (Ramos 1985); su especie polinizadora es *Pegoscapus aff. silvestre*, la cual presenta un marcado dimorfismo sexual, las hembras son de color negro, con alas

transparentes y cabeza en forma de pala, mientras que los machos son de color amarillo pálido transparente, carecen de alas, poseen órgano copulador retráctil, cabeza grande, mandíbulas fuertes, el primer par de patas es cavador y el segundo par casi vestigial (Ramos 1985; Jansen y Sarmiento en prensa). El objetivo de este trabajo fue determinar la composición de la fauna de avispas no polinizadoras asociadas a *F. andicola* como un aporte al conocimiento de este sistema para futuros estudios sobre su ecología y relaciones.

### Materiales y Métodos

El trabajo se llevó a cabo entre los meses de febrero y octubre de 2004 en el Santuario de Fauna y Flora Otún Quimbaya (4°43'43"N, 75°34'42"W), localizado en el municipio de Pereira, Risaralda, en la vertiente occidental de la Cordillera Central, a elevaciones entre los 1.800 y 2.100 m (Londoño 1994). El régimen de lluvias es bimodal, con valores máximos en abril y octubre y promedio anual de 2.500 mm; la temperatura promedio anual es de 15°C (Aguilar y Rangel 1994). El área se encuentra cubierta por un mosaico de bosque natural maduro poco intervenido, bosque secundario formado por regeneración natural y plantaciones monoespecíficas de urupán (*Fraxinus chinensis*) y roble (*Quercus humboldtii*) (Galeano y Bernal 1994).

Inicialmente se buscaron y marcaron los individuos de *F. andicola* en la zona de estudio y se les hizo seguimiento para observar la producción de frutos. Se colectaron entre 31 y 35 síconos de cada árbol en la fase en la que las avispas habían empezado a emerger, pero que aún no abandonaban el sícono. Los síconos colectados se llevaron al laboratorio, se abrieron longitudinalmente y posteriormente se pusieron en frascos plásticos individuales tapados con una malla de tela, que a su vez estaba sujeta al frasco con una banda elástica.

Una vez las avispas habían terminado de emerger (dos o tres días después) se colectaron y conservaron en etanol al 70%. Posteriormente las avispas se separaron y se identificaron a género las más frecuentes, utilizando la clave de Boucek (1993). Las morfoespecies fueron separadas usando las características más evidentes, como por ejemplo tamaño, longitud del ovipositor y patrones de coloración. Las semillas se separaron raspando la pared del sícono, se dejaron secar por 24 horas y posteriormente se contaron en su totalidad a través de un microscopio estereoscópico.

Se evaluó la eficiencia del muestreo mediante la obtención de curvas de acumulación de especies, usando el programa EstimateS 6.0b1 (Colwell 2000), con 100 aleatorizaciones. Aunque todos los estimadores presentaron un comportamiento similar se utilizó el no paramétrico Chao 2 por ser considerado uno de los menos sesgados (Colwell y Coddington 1994). Éste estima el número de especies esperadas considerando la relación entre el número de especies únicas y el número de especies duplicadas (Moreno 2001).

### Resultados

De 96 árboles de *F. andicola* registrados en la zona de estudio durante 10 meses, se muestrearon 12 que produjeron síconos. En total se colectaron 418 síconos, con un promedio de 35 por árbol. De todos los síconos recolectados emergieron avispas.

El 53,5% de las flores de *F. andicola* desarrollaron avispas, mientras que el 46,5% restante produjeron semillas. El número promedio de avispas polinizadoras no difirió significativamente

del número de semillas producidas por cada sícono ( $t = -0,86$ , g. l. = 417,  $P > 0,05$ ). Por otra parte, el número total de avispas (polinizadoras y no polinizadoras) fue significativamente mayor que el número de semillas producidas ( $t = -4,16$ , g. l. = 417,  $P < 0,001$ ) (Tabla 1).

Las avispas no polinizadoras estuvieron presentes en 11 de los 12 árboles estudiados y en el 73% de los síconos. El número promedio de avispas no polinizadoras por árbol fue altamente variable (Tabla 2). Se encontraron algunos árboles con alto número de avispas no polinizadoras (hasta 44 individuos), mientras que otros presentaron números muy bajos (un individuo).

Se encontraron 22 morfoespecies de avispas en los síconos de *F. andicola*, pertenecientes a tres subfamilias de Agaonidae y a las familias Torymidae y Pteromalidae. Las ocho morfoespecies más frecuentes fueron identificadas hasta el nivel de género (Tabla 3), estas representan el 99% de todas las avispas no polinizadoras encontradas y en conjunto estuvieron presentes en el 73% de los síconos, es decir en todos los que produjeron avispas no polinizadoras. Sólo cuatro morfoespecies de avispas no polinizadoras estuvieron presentes en más del 10% de los síconos. De estas sólo *Idarnes* sp. 1, *Idarnes* sp. 2 y *Heterandrium* sp. emergieron de más del 40% de los síconos. La única morfoespecie que emergió de más del 50% de los síconos fue *Idarnes* sp. 1 (Fig. 1). De acuerdo al grupo funcional, el mayor número de avispas no polinizadoras fueron las que inducen agallas pequeñas, presentes en aproximadamente el 70% de los síconos. Las avispas que inducen agallas grandes estuvieron presentes en el 19% y sus parasitoides, en este caso *Physothorax* sp., solo en el 7%. La curva de acumulación de especies muestra que se encontró aproximadamente el 88% de las morfoespecies esperadas para *F. andicola* (Fig. 2).

### Discusión

Se encontraron 22 morfoespecies de avispas no polinizadoras desarrollándose en una alta proporción de los síconos de *F. andicola*. Este número se refiere a las morfoespecies y es posible que representen un número menor de especies. De cualquier manera esta cantidad está dentro del intervalo conocido de avispas asociadas a una especie de *Ficus*. Compton y Hawkins (1992) encontraron que el número puede variar entre tres y 30 para 24 especies de *Ficus* estudiados en África. Compton y Nefdt (1990) reportan cinco especies asociadas a *F. burtt-davyi* en Sur África, mientras que en Costa de Marfil, Kerdelhue y Rasplus (1996) encontraron en *F. sur* y *F. vallis-choudae* 10 y cuatro especies respectivamente. Boucek *et al.* (1981) encontraron 28 especies de avispas no polinizadoras asociadas a los síconos de *F. thonningii* en Zimbabue. Bronstein (1991) registró tres especies en los síconos de *F. pertusa* en Costa Rica, mientras que en Brasil se encontraron

**Tabla 1.** Número de avispas asociadas y semillas producidas en síconos ( $n = 418$ ) de *F. andicola*. EE = Error estándar.

	Promedio $\pm$ EE	Intervalo
Avispas polinizadoras	90 $\pm$ 2,8	0 - 298
Avispas no polinizadoras	17 $\pm$ 0,8	0 - 85
Total de avispas	107 $\pm$ 2,5	8 - 298
Semillas	93 $\pm$ 2,7	0 - 330

tres géneros de avispas asociados a *F. mexiae* (Schiffler 2002). Es posible que el alto número de morfoespecies encontradas en este estudio se deba al esfuerzo de muestreo, que como lo muestra la figura 2, permitió registrar el 88% de las esperadas. La mayoría de las morfoespecies encontradas, solo estuvieron presentes en menos del 4% de los síconos. Esto podría implicar que estas solo sean oportunistas y que no dependen únicamente de *F. andicola* para su reproducción. Las morfoespecies más comunes, probablemente si tengan un mayor grado de especificidad y de dependencia sobre esta especie. Dentro del género *Ficus* existen tanto especies monoicas como ginodioicas, estas últimas desarrollan flores masculinas y femeninas en algunos árboles y sólo flores femeninas en los otros (Janzen 1979; Wiebes 1979). En el Neotrópico únicamente se encuentran especies de *Ficus* monoicos (Berg 1989). En general se ha encontrado que las especies de *Ficus* monoicas presentan un mayor número de especies de avispas no polinizadoras y una mayor tasa de parasitismo (Patel 1998; Weiblen *et al.* 2001).

Se encontró un alto número de avispas del género *Idarnes*, que ha sido reportado como el más común de las avispas no polinizadoras en los *Ficus* del subgénero *Urostigma*, al cual pertenece *F. andicola* (Gordh 1975; West y Herre 1994; West *et al.* 1996). El género *Heterandrium* ha sido encontrado con poca frecuencia en los *Ficus* del subgénero *Urostigma* y es poco lo que se conoce de su biología y del efecto que puede causar sobre los miembros del mutualismo (West *et al.* 1996). Otras especies menos abundantes son las formadoras de agallas grandes y sus parasitoides (*Aepocerus*, *Physothorax* y *Ficicola*), las cuales fueron encontradas en bajas proporciones en este estudio. El grupo funcional al cual pertenece cada morfoespecie de avispa no polinizadora, juega un importante papel en las relaciones y ecología del sistema. Por ejemplo las avispas del género *Idarnes* (grupo *carne*) son formadoras de agallas en las flores femeninas, estas por lo tanto compiten con los polinizadores por lugares de oviposición y se ha encontrado que pueden afectar negativamente su número (West y Herre 1994). Las avispas del género *Heterandrium*, utilizan el mismo recurso pero no suelen ser abundantes. En este caso fue la segunda morfoespecie más frecuente y por lo tanto es posible que pueda causar un efecto similar a las avispas del género *Idarnes*. Las formadoras de agallas grandes, en este

**Tabla 2.** Abundancia de avispas no polinizadoras en síconos de *F. andicola*. EE = Error estándar.

Árbol	N° de síconos	Avispas no polinizadoras		
		Promedio	$\pm$ EE	Intervalo
1	34	0	0	0
2	36	34	2,11	10 - 71
3	36	7	1,18	0 - 26
4	36	19	2,22	4 - 52
5	31	30	3,52	1 - 73
6	36	23	2,73	3 - 85
7	37	1	0,05	0 - 1
8	34	44	1,68	23 - 73
9	35	1	0,69	0 - 18
10	35	8	1,98	0 - 51
11	34	16	1,72	4 - 46
12	35	27	2,01	5 - 63

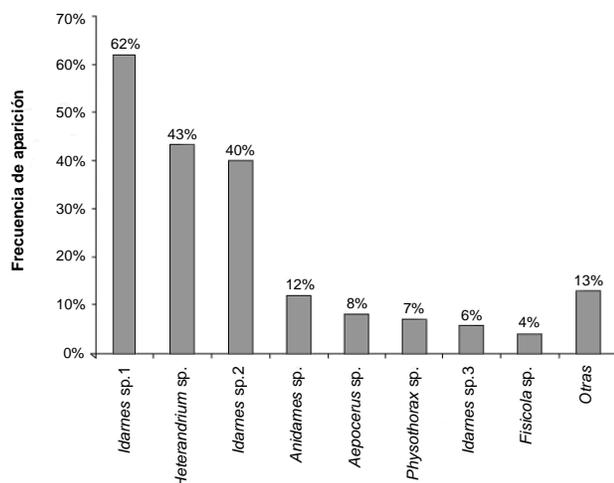
**Tabla 3.** Avispas más comunes que se desarrollan en los síconos de *F. andicola*.

Familia y subfamilia	Género (grupo)	Forma de los machos*	Recurso utilizado*
Agaonidae			
Agaoninae	<i>Pegoscapus</i> sp.	Ápteros	Induce agallas en las flores femeninas
Sycophaginae	<i>Idarnes</i> sp. 1 ( <i>carne</i> )	Ápteros	Induce agallas en las flores femeninas
	<i>Idarnes</i> sp. 2 ( <i>flavicollis</i> )	Ápteros	Induce agallas en las flores femeninas
	<i>Idarnes</i> sp. 3 ( <i>incerta</i> )	Alados	Induce agallas en la pared del sícono
	<i>Anidarnes</i> sp.	Alados	Induce agallas en la pared del sícono
Otitesellinae	<i>Aepocerus</i> sp.	Dimórficos:	Induce agallas en la pared del sícono
	alados de dos tamaños.		
	<i>Heterandrium</i> sp.	Dimórficos: ápteros y alados	Induce agallas en las flores femeninas
Torymidae	<i>Physothorax</i> sp.	Alados	Parasitoides de <i>Aepocerus</i> spp.
Pteromalidae	<i>Ficicola</i> sp.	Alados	Desconocido

\* Adaptado de West *et al.* (1996).

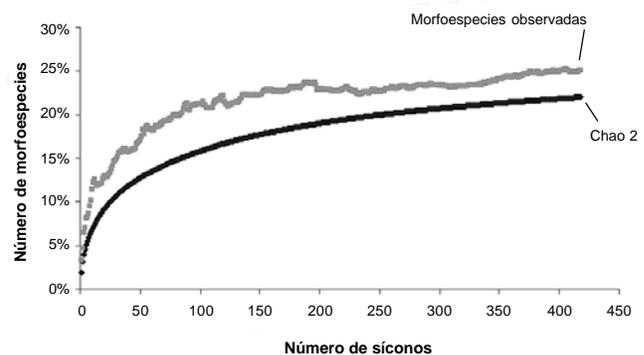
caso las del género *Aepocerus*, *Idarnes* (grupo *incerta*) y *Anidarnes*, cuando están presentes en grandes números pueden también tener efecto negativo sobre las semillas o los polinizadores. Para el caso de *Aepocerus*, cuando ha sido encontrado en cantidades importantes, los resultados sugieren que pueden tener efectos negativos sobre el número de semillas y polinizadores (West *et al.* 1996). Los parasitoides de las formadoras de agallas grandes, pueden tener importancia en la dinámica poblacional de sus hospederos pero no necesariamente tendrían un efecto directo sobre los polinizadores o las semillas. En este caso se encontró una baja proporción de avispas del género *Physothorax*, las cuales son parasitoides de *Aepocerus* spp.

Normalmente los síconos en los cuales las flores no han sido polinizadas son abortados por el árbol, pero se ha observado que algunas especies de avispas no polinizadoras pueden inducir la maduración de los frutos (Bronstein 1991; Kerdelhue y Rasplus 1996; West *et al.* 1996). En el presente estudio se encontraron dos síconos en los que, a pesar de que no habían ingresado avispas polinizadoras, fueron retenidos y se desarrollaron avispas no polinizadoras dentro de ellos. Estos

**Figura 1.** Frecuencia de aparición de las avispas no polinizadoras en los síconos de *F. andicola*.

dos síconos tenían en común a *Anidarnes* sp., *Ficicola* sp. y *Aepocerus* sp., lo que sugiere que una de estas tres morfoespecies puede inducir la maduración del fruto. Por lo observado en otros estudios, se esperaría que dicha morfoespecie sea *Aepocerus* sp., puesto que otras especies de este género inducen la maduración de los síconos no polinizados en *F. popenoei*, *F. dugandi* y *F. trigonata* en Panamá (West *et al.* 1996). Por el método utilizado no se pudo saber si estas avispas hubieran podido abandonar el sícono sin la presencia de polinizadores. Sin embargo, se pudo observar, como ya había sido sospechado por West *et al.* (1996), que los machos de *Aepocerus* sp. pueden abrir huecos en la pared del sícono. Además, se observó que estos huecos son abiertos desde el interior de la agalla en la que se desarrollaron.

Una de las preguntas centrales en el estudio del sistema *Ficus* - Agaonidae es cómo éste ha podido perdurar a través del tiempo a pesar de que entre los miembros del mutualismo existe un conflicto de intereses (Machado *et al.* 2001). Este conflicto se da porque las avispas se desarrollan en las flores femeninas a expensas de las semillas, por lo tanto, un aumento en el número de polinizadores disminuye el número de semillas producidas (Herre y West 1997). Sin embargo, este sistema que surgió hace aproximadamente 90 millones de años (Machado *et al.* 2001) aún perdura, lo que indica que existen

**Figura 2.** Curva de acumulación de morfoespecies observadas y estimadas por Chao 2 para las avispas no polinizadoras que se desarrollan en síconos de *F. andicola*.

mecanismos que regulan la producción de avispas, evitando que el sistema colapse (West y Herre 1994; Nefdt y Compton 1996). El patrón general observado en especies de *Ficus* de tierras bajas, es que la proporción de flores de las que emergen polinizadores está entre 0,45 y 0,55 (Herre 1989). Para *F. andicola* la proporción también fue de 0,45, es decir, que de alguna manera el árbol conserva aproximadamente la mitad de las flores para la producción de semillas. Las flores en las que se desarrollan las hembras polinizadoras pueden verse como una inversión, ya que estas son las encargadas de dispersar el polen y por lo tanto representan la función masculina del árbol. El verdadero costo está representado por la potencial pérdida de semillas o hembras polinizadoras, debida a la producción de machos polinizadores y especies de avispas que no proveen el servicio de polinización (Herre 1989).

El número de avispas no polinizadoras tiene una alta variación entre árboles, esta variación es común y se ha encontrado en otras especies de *Ficus* (West *et al.* 1996). Dicho patrón podría ser explicado por variaciones locales en la abundancia de avispas no polinizadoras y de síconos receptivos y por la fenología de fructificación de sus árboles hospederos (Patel 1998; Nefdt y Compton 1996; West *et al.* 1996). Para el caso de *F. andicola* estas variaciones locales también estarían controlando dichas diferencias. Por ejemplo, si hay muchos árboles en los que estén emergiendo las avispas (fase masculina), entonces habrá un mayor número de avispas disponibles para ovipositar en los síconos que se encuentren receptivos (fase femenina). Por otra parte, el número de síconos receptivos también tendría un efecto determinante, si hay muy pocos en un momento en el que haya un alto número de avispas, entonces habrá una mayor cantidad ovipositando en los síconos. La alta variación en el número de avispas no polinizadoras podría ser una explicación para que las avispas polinizadoras mantengan una población viable. En este caso, los árboles que no reciben avispas no polinizadoras estarían actuando como fuente de polinizadores, mientras que los árboles con alto número de no polinizadores lo harían como sumidero.

A pesar de que el sistema *Ficus* - Agaonidae ha sido muy estudiado en algunas localidades, todavía quedan muchos aspectos por explorar, sobre todo acerca del papel que las avispas no polinizadoras juegan. *Ficus andicola* representa un buen modelo para futuros estudios ya que es una especie abundante y de fácil acceso, además posee una amplia fauna de avispas de la que se podría estudiar la dinámica de sus interacciones. También ofrece la oportunidad de conocer más sobre la biología de las especies de avispas no polinizadoras, como por ejemplo la del género *Heterandrium*, que ha sido poco frecuente en los estudios anteriores, pero en este caso resultó ser la segunda morfoespecie más abundante.

### Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero de US Fish and Wildlife Service y John D. and Catherine T. MacArthur Foundation. Agradecemos a la Unidad de Parques Nacionales Naturales por su apoyo logístico en el Santuario de Fauna y Flora Otún Quimbaya.

### Literatura Citada

AGUILAR, M.; RANGEL, J. O. 1994. Clima del Parque Regional Natural Ucumarí y sectores aledaños, pp. 59-84. En: Rangel, J.

- O. (ed.). Ucumarí un caso típico de la diversidad biótica Andina. Pereira: Corporación Autónoma Regional de Risaralda (CARDER). 451 p.
- BERG, C. C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* 45: 605-611.
- BOUCEK, Z.; WATSHAM, A.; WIEBES, J. T. 1981. The fig wasp fauna of the receptacles of *Ficus thoningii* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Tijdschrift Voor Entomologie* 124: 149-234.
- BOUCEK, Z. 1993. The genera of chalcidoid wasps from *Ficus* fruit in the New World. *Journal of Natural History* 27: 173-217.
- BRONSTEIN, J. L. 1988. Mutualism antagonism and the fig pollinator interaction. *Ecology* 69: 1298-1302.
- BRONSTEIN, J. L. 1991. The nonpollinating wasp fauna of *Ficus pertusa*: exploitation of a mutualism? *Oikos* 61: 175-186.
- COLWELL, R. K.; CODDINGTON, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 345: 101-118.
- COLWELL, R. K. 2000. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 6.0b1. <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- COMPTON, S. G.; NEFDT, R. J. C. 1990. The figs and fig wasps of *Ficus burtt-davyi*. *Mitteilungen aus den Institut für Allgemeine Botanik Hamburg* 23: 441-450.
- COMPTON, S. G.; HAWKINS, B. A. 1992. Determinants of species richness in southern African fig wasp assemblages. *Oecologia* 91: 68-74.
- COOK, J. M.; RASPLUS, J.-Y. 2003. Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (5): 241-248.
- GALEANO, M.; BERNAL, J. 1994. Composición florística del Parque Regional Natural Ucumarí, pp. 141-187. En: Rangel, J. O. (ed.). Ucumarí un caso típico de la diversidad biótica andina. Pereira: Corporación Autónoma Regional de Risaralda (CARDER). 451 p.
- GALIL, J.; EISIKOWITCH, D. 1968. On the pollination ecology of *Ficus sycomorus* in East Africa. *Ecology* 49 (2): 259-269.
- GORDH, G. 1975. The comparative external morphology and systematics of the neotropical parasitic fig wasp genus *Idarnes* (Hymenoptera: Torymidae). *The University of Kansas Science Bulletin* 50 (9): 389-455.
- HERRE, E. A. 1989. Coevolution of reproductive characteristics in 12 species of New World figs and their pollinator wasps. *Experientia* 45: 637-647.
- HERRE, E. A. 1996. An overview of studies on a community of Panamanian figs. *Journal of Biogeography* 23: 593-607.
- HERRE, E. A.; WEST S. A. 1997. Conflict of interest in a mutualism: documenting the elusive fig wasp-seed trade-off. *Proceedings of the Royal Society of London* 264: 1501-1507.
- JANSEN-G., S.; SARMIENTO C. E. (en prensa). A new species of high mountain Andean fig wasp (Hymenoptera: Agaonidae: Agaoninae) with a detailed description of its life cycle. *Symbiosis* 45.
- JANZEN, D. H. 1979. How to be a fig? *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 13-51.
- KERDELHUE, C.; RASPLUS, J.-Y. 1996. Non-pollinating Afrotropical fig wasps affect the fig pollinator mutualism in *Ficus* within the subgenus *Sycomorus*. *Oikos* 75: 3-14.
- KERDELHUE, C.; HOCHBERG, M. E.; RASPLUS, J.-Y. 1997. Active pollination of *Ficus sur* by two sympatric fig wasp species in West Africa. *Biotropica* 29 (1): 69-75.
- LARGACHA, A. 1997. Biología floral de *Ficus insipida* Willd (Moraceae). Trabajo de grado, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- LONDOÑO, E. 1994. Parque Regional Natural Ucumarí. Un vistazo histórico, pp. 13-21. En: Rangel, J. O. (ed.). Ucumarí un caso típico de la diversidad biótica andina. Pereira: Corporación Autónoma Regional de Risaralda (CARDER). 451 p.
- MACHADO, C. A.; JOUSSELIN, E.; KJELLBERG, F.; COMPTON, S. G.; HERRE, E. A. 2001. Phylogenetic relationships, historical

- biogeography, and character evolution of fig pollinating wasps. Proc. R. Soc. Lond. B 268: 685-694.
- MARTÍNEZ, L. 1981. Aspectos biológicos y químicos del sícono de *Ficus gigantosyce* Dugand. Trabajo de grado, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.
- MICHALOUD, G.; CARRIERE, S.; KOBBI, M. 1996. Exceptions to the one: one relationship between African fig trees and their fig wasp pollinators: possible evolutionary scenarios. Journal of Biogeography 23: 513-520.
- MOLBO, D.; MACHADO, C. A.; SEVENSTER, J. G.; KELLER, L.; HERRE, E. A. 2003. Cryptic species of fig-pollinating wasps: Implications for the evolution of the fig-wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. Evolution 100 (10): 5867-5872.
- MORENO, C. E. 2001. Manual de métodos para medir la diversidad. Universidad Veracruzana. Xalapa, México. 49 p.
- NEFDT, R. J. C.; COMPTON, S. G. 1996. Regulation of seed and pollinator production in the fig - fig wasp mutualism. Journal of Animal Ecology 65: 170-182.
- OTERO, J. T.; ACKERMAN, J. D. 2002. Flower style length and seed production in two species of *Ficus* (Moraceae) in Puerto Rico. Caribbean Journal of Science 38 (3-4): 249-251.
- PATEL, A. 1998. Wasp composition in inflorescences of two dioecious fig species-implications for the fig-wasp mutualism. Biotropica 30 (3): 474-480.
- RAMÍREZ, W. 1970. Host specificity of fig wasps (Agaonidae). Evolution 24 (4): 680-691.
- RAMÍREZ, W. 1974. Coevolution of *Ficus* and Agaonidae. Annals of the Missouri Botanical Garden 61: 770-780.
- RAMÍREZ, W. 1976. Evolution of blastophagy. Brenesia 9: 1-13.
- RAMOS, J. 1985. Biología floral de *Ficus andicola* Standl., *Ficus schippi* Standl. y *Ficus velutina* H. B. ex Willd (Moraceae) en el Valle del Cauca. M. S. Tesis. Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.
- SCHIFFLER, G. 2002. Fig wasps (Hymenoptera: Agaonidae) associated to *Ficus mexiae* Standl (Moraceae) in Lavras, Minas Gerais, Brazil. Neotropical Entomology 31 (4): 653-655.
- WEIBLEN, G. D.; YU, D. W.; WEST, S. A. 2001. Pollination and parasitism in functionally dioecious figs. Proceedings of the Royal Society of London 268: 651-659.
- WEST, S. A.; HERRE, E. A. 1994. The ecology of the New World fig-parasitizing wasps *Idarnes* and implications for the evolution of the fig pollinator mutualism. Proceedings of the Royal Society of London 258: 67-72.
- WEST, S. A.; HERRE, E. A.; WINDSOR, D. M.; GREEN, P. R. S. 1996. The ecology and evolution of the New World non-pollinating fig wasp communities. Journal of Biogeography 23: 447-458.
- WIEBES, J. T. 1979. Co-evolution of figs and their insect pollinators. Annual Review of Ecology and Systematics 10: 1-12.
- WIEBES, J. T. 1995. The New World Agaoninae (pollinators of figs). Verhandelingen Koninklijke Nederlandse Akademie Wetenschappen 94: 1-60.

Recibido: 4-ene-2007 • Aceptado: 18-oct-2007

## Diferenciación morfológica y molecular de especies de crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae)

Morphological and molecular differentiation of lacewing species (Neuroptera: Chrysopidae)

PATRICIA CADENA<sup>1</sup>, FERNANDO ÁNGEL<sup>2</sup>, LUIS A. GÓMEZ<sup>3</sup>, RANULFO GONZÁLEZ<sup>4</sup>

**Resumen:** En el Valle del Cauca (Colombia), se estudió la distribución e identificación de las especies más abundantes de crisópidos en zonas donde se cultiva la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) con mayor intensidad. Así, se han determinado las especies que podrían ser utilizadas para contrarrestar el efecto del pulgón amarillo *Sipha flava* (Hemiptera: Aphididae) sobre la producción total de la caña de azúcar. Aunque las especies y morfotipos del presente estudio son separados utilizando caracteres morfológicos, se evaluó la validez de dichos caracteres. Para esto, se realizó una diferenciación morfológica mediante genitalia interna y una diferenciación molecular, empleando la técnica PCR-RFLP sobre la región 18S del ADN ribosomal, de 11 especies de tres géneros de la familia Chrysopidae (*Ceraeochrysa*, *Chrysoperla* y *Leucochrysa*), algunas de las cuales podrían ser importantes como agentes de control biológico del pulgón amarillo de la caña de azúcar, *S. flava*. Los caracteres empleados resultaron ser útiles para distinguir las especies. En el caso de la genitalia interna, mostraron diferentes patrones de las estructuras. En el caso de los datos moleculares, las especies fueron diferenciadas utilizando solo una combinación de iniciadores NS para la amplificación del ADN y la digestión del amplificado producida con una enzima de restricción (NS5-NS6+DrI). Esta información se adiciona al conocimiento taxonómico que se tiene sobre la familia, además puede ayudar a resolver problemas sistemáticos al interior de los géneros.

**Palabras clave:** Genitalia. ADN ribosomal. Taxonomía. Subunidad 18S.

**Abstract:** In the Cauca Valley (Colombia), the distribution and identification of the most abundant lacewing species were studied in zones where sugar cane (*Saccharum* spp.) is cultivated. It has therefore been possible to determine the species that could be used to counter the effect of the yellow aphid *Sipha flava* (Hemiptera: Aphididae) on the overall production of sugar cane. Although the lacewing species and morphotypes in the current study can be separated using morphological characters, the validity of those characters was studied. To do that, we established a morphological differentiation using internal genitalia and a molecular differentiation using a PCR-RFLP analysis of the 18S rDNA region of 11 species from three genera of the family Chrysopidae (*Ceraeochrysa*, *Chrysoperla*, and *Leucochrysa*), some of whom could be important biological control agents of the yellow sugar cane aphid *S. flava*. The characters used proved to be useful for distinguishing the species. In the case of internal genitalia, there were different patterns of the structures. In the case of molecular data, the species were differentiated using only one combination of NS primers for the DNA amplification, followed by digestion of fragments with a restriction enzyme (NS5-NS6+DrI). These results add to the taxonomic understanding of the family, and may help resolve systematic problems within the genera.

**Key words:** Genitalia. ribosomal DNA. Taxonomy. 18S rDNA region.

### Introducción

El pulgón amarillo *Sipha flava* (Forbes, 1884) (Hemiptera: Aphididae) es una plaga de alta incidencia en el rendimiento total de la caña de azúcar. De acuerdo con el uso de diferentes alternativas para su manejo, se han considerado depredadores de la familia Chrysopidae, algunos de los cuales se encuentran en la caña de azúcar, mientras que otros se localizan en diferentes cultivos.

Chrysopidae es una de las familias más grandes del orden Neuroptera y de las más importantes en términos económicos. En los bosques tropicales húmedos, los crisópidos sobrepasan a los mirmeleóntidos en riqueza de especies, mientras que estos últimos presentan más especies en zonas áridas (Penny 2002). Brooks y Barnard (1990) citaron cerca de 1200 especies y subespecies reconocidas, clasificadas en 86 géneros y subgéneros. Este grupo de insectos se encuentran dentro de

los más eficaces depredadores, debido a que la larva se alimenta de huevos, larvas y adultos de una gran diversidad de hemípteros fitófagos y de otros insectos relativamente sedentarios (Penny 2002). Algunas larvas de esta familia presentan proyecciones torácicas y setas largas, que usa para sujetar a los exoesqueletos secos de su presa y desechos sobre su cuerpo, lo cual le sirve para protegerse de predadores y parásitos. Los adultos se alimentan de otros insectos, néctar y polen (Penny 2002). Se ha registrado que las larvas de *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1861) y *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) se alimenta agresivamente de 13 y 21 plagas de cultivos importantes respectivamente. De los ocho géneros de crisópidos que se han encontrado en los trópicos, *Chrysoperla* y *Ceraeochrysa*, parecen ser los que poseen el potencial más grande para usarse en control biológico (Albuquerque *et al.* 2001).

<sup>1</sup> Autor por correspondencia: Cenicaña, Programa de Variedades, calle norte #3BN -110 Apartado Aéreo 9138 Cali, Colombia, tel: 2 60 66 11 ext. 5151. A.A. 9138, Cali, Colombia. [pcgoyes@yahoo.com](mailto:pcgoyes@yahoo.com)

<sup>2</sup> Biotecnólogo. Cenicaña, Programa de Variedades. Apartado Aéreo 9138 Cali, Colombia. [fangel@cenicana.org](mailto:fangel@cenicana.org)

<sup>3</sup> Entomólogo. Cenicaña, Programa de Variedades. Apartado Aéreo 9138 Cali, Colombia. [lagomez@cenicana.org](mailto:lagomez@cenicana.org)

<sup>4</sup> Entomólogo. Universidad del Valle, Departamento de Biología. Apartado Aéreo 25360 Cali, Colombia [ranulfo@univalle.edu.co](mailto:ranulfo@univalle.edu.co)

La taxonomía de esta familia no es muy estable ya que muchas especies constantemente son descritas y las especies previamente descritas son reexaminadas, facilitando asignaciones genéricas y reconociendo sinonimias. En la región Neotropical, la gran mayoría de especies fueron descritas por Banks y Navás, sin utilizar genitalia; además muchas de sus especies, se describieron con base sólo en hembras, o sobre un espécimen tipo que carecía de abdomen (Adams y Penny 1987). Ramírez (2002) estableció que las especies de Chrysopidae más frecuentes y más ampliamente distribuidas en el zona de estudio en el Valle del Cauca fueron *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911), *Ceraeochrysa cubana*, *Chrysoperla externa*; las especies nativas con mayor capacidad de depredación de individuos de pulgón amarillo fueron *Ceraeochrysa cubana*, *Ceraeochrysa claveri*, *Chrysoperla externa* y *Leucochrysa* sp. 2.

Aunque existen claves de determinación taxonómica para la familia Chrysopidae, la diferenciación de las especies requiere un examen cuidadoso pues algunos géneros son muy uniformes morfológicamente, pero su eficiencia en el manejo de determinada plaga puede ser tal que se presenten diferencias significativas que determinen el éxito de un programa de control. La introducción de especies determinadas incorrectamente puede constituir un serio problema si el insecto a controlar en el programa de control biológico no está asociado con la especie usada o no se adapta a las condiciones locales del sitio de liberación (De Almeida y Stouthamer 2003).

Dado que las especies de Chrysopidae encontradas en el Valle del Cauca poseen características morfológicas externas variables, se consideraron otros métodos de diferenciación, tales como marcadores moleculares y marcadores morfológicos como la genitalia interna, con miras a corroborar la validez de los caracteres morfológicos externos, además para esclarecer la determinación de algunos morfotipos que no han sido reconocidos hasta especie, contribuyendo al conocimiento taxonómico de la familia.

Comparada con la morfología externa, la variabilidad interespecífica de la genitalia es tan grande y característica, que algunos autores no han ilustrado otras partes del cuerpo. La gran divergencia en la morfología de la genitalia entre las especies es la regla en insectos, y en la mayoría de los grupos; los taxónomos usan la genitalia (especialmente la genitalia del macho) para la determinación de las especies y su clasificación. Un artículo de la revista alemana de entomología *Tijdschrift voor Entomologie*, mostró que de 26 artículos taxonómicos, la genitalia juega un papel prominente en 23 (Schilthuizen 2003).

Por otro lado, la utilización de marcadores moleculares es ampliamente usada para diferenciar especies muy relacionadas y en muchos casos sólo una región del ADN es usada, dependiendo de los propósitos de la investigación (Caldeira *et al.* 2003). Recientemente, diferentes regiones del ADN ribosomal han sido propuestas para ser usadas en estudios moleculares como una herramienta adicional a la caracterización morfológica. Este método incluye el análisis de la región 18S, y las regiones ITS1 (Internal Transcribed Spacer) e ITS2 del ADN ribosomal a través de la reacción en cadena de la polimerasa, la cual utiliza iniciadores que amplifican estas regiones. Sin embargo, debido al alto polimorfismo intraespecífico y a los patrones complejos que se producen con este método, se puede ver restringido su uso (Vidigal *et al.* 2002).

Combinada con el uso del ADN ribosomal, la técnica PCR-RFLP permite diferenciar especies muy cercanas y en ocasiones prácticamente indistinguibles con un análisis morfológico (Luchetti *et al.* 2005). Esta es una técnica simple y rápida, que puede ser usada como una herramienta auxiliar en la determinación de las especies (Vidigal *et al.* 2002). Estas técnicas pueden ser más útiles al momento de diferenciar entre especies de un grupo particular de cierta zona, cuando se pretende evaluar la dispersión de un parasitoide liberado y estudiar el parasitismo siguiendo las liberaciones, estudiar la composición de especies hermanas, y para diferenciar especies muy relacionadas (Silva *et al.* 1999).

Se planteó la necesidad de realizar una diferenciación molecular dada su utilidad como un medio rápido y eficaz para encontrar marcadores específicos (Arnold *et al.* 1991; Wilkerson 1995), así como una diferenciación morfológica a partir de genitalia interna, con miras a establecer marcadores diagnósticos de las especies, para luego evaluar que tanto se correlacionan estos datos con los obtenidos a partir de la morfología externa; esta aproximación podría arrojar resultados más confiables sobre el estatus de las especies de estudio. El conocimiento que se obtenga, contribuye a la información que sobre el manejo de plagas se está generando y, en este caso, sobre el manejo del pulgón amarillo, buscando un tratamiento integral que conlleve una reducción de su incidencia en la producción comercial de la caña de azúcar.

## Materiales y Métodos

**Material de estudio.** Se trabajó tanto con especies criadas en el laboratorio de entomología del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia CENICAÑA, como especies recolectadas en el campo. Se realizaron recolecciones manuales de crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae) en lotes de caña de azúcar, yuca y cítricos en CENICAÑA (3°21'51"N; 76°18'1"W) y en lotes de maíz en sitios aledaños, en lotes de caña en el ingenio MAYAGÜEZ (3°23'40"N; 76°19'54"W), y en lotes de maíz y yuca ubicados en el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT (3°30'27"N; 76°21'26"W). Las recolecciones se hicieron entre julio de 2004 y julio de 2005.

El estudio se realizó con 11 especies: *Ceraeochrysa* sp. 1, *Ceraeochrysa* sp. 2, *Ceraeochrysa* sp. 3, *Ceraeochrysa cubana*, *Ceraeochrysa claveri*, *Chrysoperla* sp. 1, *Chrysoperla carnea* (exótica), *Chrysoperla rufilabris* (exótica), *Leucochrysa* sp. 1, *Leucochrysa* sp. 2, y *Leucochrysa* sp. 3 y se analizaron ejemplares tanto de campo como de laboratorio. Se usaron diez ejemplares por especie (cinco machos y cinco hembras), para un total de 110. Debido a que la abundancia relativa de algunas especies no era suficiente para obtener todos los individuos que se necesitaban tanto para la estandarización como para el análisis final, fue necesario criar algunas especies.

**Determinación de las especies a partir de caracteres morfológicos.** Se diferenciaron las especies a partir de caracteres de la morfología externa, usando la clave de Ramírez (2002). Antes de realizar las pruebas moleculares, también se verificó la diferenciación de las especies y morfotipos, usando los dibujos de las estructuras de genitalia interna de machos disponibles, tanto los de la literatura como los realizados durante el estudio.

## Análisis molecular

**Extracción de ADN.** Para la extracción de ADN se utilizó el tórax y parte del abdomen (aproximadamente siete segmentos) de cada uno de los ejemplares. Se siguió el método de extracción de Cheung *et al.* (1993) y se modificó de acuerdo con la cantidad de tejido a utilizar, que en este caso dependía del tamaño del insecto. El tejido se maceró en 300 µl de tampón de extracción frío, y se adicionaron 75 µl de solución Sarcosyl 5% para precipitar polisacáridos (Sharma *et al.* 2002). La suspensión se incubó por una hora en un baño maría a una temperatura de 65°C, invirtiéndose cada 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm por seis minutos a 20°C. Se pasó el sobrenadante a otro tubo y se le adicionó 168,75 µl de acetato de amonio 10M y 300 µl de isopropanol frío, invirtiéndose varias veces y dejándolo a -20°C por dos horas, para precipitar el ADN. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos a 20°C, se descartó el sobrenadante dejando el botón (ADN) y se lavó con 300 µl de etanol 70% (-20°C), invirtiendo el tubo varias veces, teniendo cuidado de no desprender el precipitado. Se dejó secar por 20 minutos aproximadamente a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporara y se resuspendió en 100 µl de tampón TE. Finalmente se agregó a cada muestra 1,5 µl de ribonucleasa A (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 20 minutos. El ADN se conservó a -20°C hasta su utilización.

**Condiciones de la PCR.** La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (Programmable Thermal Controller) de MJ Research, utilizando un volumen total de 12,5 µl, 17,5 ng de ADN, Tampón 1X, dNTPs 0,2 mM, Iniciador A 0,5 µM, Iniciador B 0,5 µM, BSA 0,1 µg, Taq polimerasa 1U, ajustado a 12,5 µl con H<sub>2</sub>O. Las condiciones para realizar la amplificación del ADN ribosomal fueron: un paso de denaturación inicial a 94°C de 2 minutos, 40 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 57°C por 1 minuto, 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos, después del último ciclo. En este caso se realizó un ajuste en el perfil térmico de la PCR en el paso de hibridación.

**Selección de combinación de iniciadores NS.** Para amplificar diferentes regiones de la subunidad 18S del ADN ribosomal, se evaluaron 52 combinaciones de iniciadores NS (Nuclear Small rDNA) y digestiones usando varias enzimas de restricción, en 11 muestras de ADN de los crisópidos (una por especie). De las 52 combinaciones, finalmente se seleccionaron seis para evaluar la diferenciación entre todas las especies, utilizando 10 muestras de ADN por especie (Tabla 1). Los amplificadores de ADN ribosomal se separaron por electroforesis

**Tabla 1.** Combinaciones de iniciadores NS y enzimas de restricción seleccionadas.

Combinación de iniciadores	Enzima de restricción
NS5-NS6	<i>MspI</i>
NS5-NS6	<i>HindI</i>
NS5-NS6	<i>DraI</i>
NS5-NS6	<i>HaeIII</i>
NS3-NS4	<i>HindI</i>
NS3-NS4	<i>DraI</i>

en geles de agarosa al 1,2% y las digestiones posteriores fueron separadas en geles de agarosa al 1,7% utilizando un voltaje de 100V en tampón TAE 1X; los geles se prepararon en tampón TAE 1X (Tris-ácido glacial acético 0.04M; EDTA 0.001M), usando Bromuro de Etidio (0,4 µg/ml para la tinción) (Sambrook *et al.* 1989). La longitud de los productos de amplificación se estimó por comparación con un marcador Lambda (ϕ) digerido con la enzima *PstI*. Las electroforesis se realizaron en una cámara horizontal Marca Gibco BRL, modelo Horizon 20-25.

**Análisis morfológico.** Se siguió el método propuesto por Henry *et al.* (1993), pero utilizando el mismo tratamiento para machos y hembras. La porción de tejido se colocó en KOH (10%), y se dejó en ebullición de cinco a 10 minutos. Después se lavó con bastante agua destilada y se tiñó con dos gotas de chlorazol black E (Sigma) (5%) dejándolo de dos a tres minutos. Finalmente se lavó con agua destilada y se disectó. Las genitalias se conservaron en viales con glicerina.

**Identificación y esquematización de las estructuras de la genitalia interna.** Se emplearon estructuras de la genitalia interna, tanto de machos como de hembras, fáciles de observar y reconocer, es decir que permitieran una determinación rápida de las especies; *gonarcus* y *gonopsis/tignum* en el caso de los machos, y *espermateca* para las hembras.

Se realizaron ilustraciones de todas las estructuras empleando un microscopio SWIFT con un aumento 100X y un micrómetro ocular. La identificación de las estructuras y su posterior esquematización se hicieron empleando como guía diferentes artículos (Adams 1977; Henry 1983; Nuñez 1988; Penny 2002; De Freitas 2003; Brooks y Barnard 1990; Henry *et al.* 1993; Tauber *et al.* 2000; Kang-Zhen *et al.* 2004) que se refieren a la genitalia interna de algunos géneros de la familia Chrysopidae.

## Resultados y Discusión

### Análisis molecular

**Extracción de ADN.** El método de extracción usado permitió obtener la cantidad necesaria de ADN, tanto para la estandarización como para el análisis final con una cantidad total promedio de 28,9 µg. Este método, también ha sido empleado exitosamente para la extracción de ADN de otros artrópodos como avispas del género *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Landry *et al.* 1993) y varias especies de arañas de diferentes familias (Linyphiidae, Theridiidae y Clubionidae) (A'Hara *et al.* 1998).

**Amplificación de ADN ribosomal y selección de iniciadores NS.** Las diferentes combinaciones de iniciadores NS permitieron la amplificación de regiones específicas de la subunidad 18S del ADN ribosomal de las especies de crisópodos. Aunque las combinaciones de iniciadores mostraban bandas intensas y reproducibles, casi todas las combinaciones mostraron un patrón monomórfico, una o dos bandas de igual tamaño para todas las especies utilizando una combinación de iniciadores. Las regiones codificantes del ADN ribosomal se encuentran altamente conservadas, por lo cual se recomiendan cuando se pretende realizar estudios taxonómicos o sistemáticos en un nivel superior de clasificación (Hoy 1994; Navajas *et al.* 1992).

Con una de las combinaciones y el amplificado digerido con enzimas de restricción (NS5-NS6+*DraI*), se logró discriminar todas las especies utilizando sólo los fragmentos específicos, por lo cual, este ensayo es útil para arrojar un diagnóstico molecular en la zona de muestreo. Dado lo anterior, se construyó una clave molecular para la determinación de las especies del estudio. El ensayo NS5-NS6+*DraI* mostró en total 10 bandas para todas las especies (tres bandas en promedio por especie). De las 10 bandas, sólo una se presentó en todas las especies (500 pb), cinco fueron únicas por especie y las cuatro restantes fueron variablemente compartidas por varias especies. Estos resultados muestran el poder discriminante de este ensayo y la utilidad para reconocer las especies estudiadas.

**Clave molecular para la determinación de 11 especies de crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae), presentes en la zona de muestreo.** Información a partir de fragmentos digeridos con la enzima *DraI* procedentes del ADN ribosomal amplificado utilizando iniciadores NS5-NS6.

1. Presencia de banda de 100 pb .....	2
1'. Ausencia de banda de 100 pb .....	6
2. Presencia de banda de 340 pb.....	<i>Chrysoperla rufilabris</i>
2'. Ausencia de banda de 340 pb° .....	3
3. Presencia de banda de 412 pb .....	<i>Ceraeochrysa</i> sp. 1
3'. Ausencia de banda de 412 pb .....	4
4. Presencia de banda de 430 pb .....	<i>Ceraeochrysa</i> sp. 3
4'. Ausencia de banda de 430 pb .....	5
5. Presencia de bandas de 310 y 200 pb .....	<i>Ceraeochrysa</i> sp. 2
5'. Presencia de banda de 200 pb .....	<i>Ceraeochrysa cubana</i>
6. Presencia de banda de 310 pb .....	7
6'. Ausencia de banda de 310 pb .....	9
7. Presencia de banda de 382 pb .....	<i>Ceraeochrysa claveri</i>
7'. Ausencia de banda de 382 pb .....	8
8. Presencia de bandas de 310 y 200 pb .....	<i>Leucochrysa</i> sp. 3
8'. Presencia de banda de 310 pb .....	<i>Leucochrysa</i> sp. 1
9. Presencia de bandas de 400 y 160 pb .....	<i>Chrysoperla</i> sp. 1
9'. Ausencia de bandas de 400 y 160 pb .....	10
10. Presencia de banda de 556 pb .....	<i>Leucochrysa</i> sp. 2
10'. Con una sola banda, de 500 pb .....	<i>Chrysoperla carnea</i>

Se obtuvieron en total 57 bandas, en un rango de tamaños entre 100 y 800 pb. De éstas, 47 fueron polimórficas y 25 fueron únicas. Ninguna especie presentó gran cantidad de bandas para todos los ensayos, lo cual demuestra que el uso de los seis ensayos provee un alto polimorfismo para diferenciar las especies de crisópidos evaluadas. En general, se obtuvo un alto poder discriminante, a excepción de uno (NS3-NS4+*HinfI*) con el que se logró que sólo el 83,6 % de las combinaciones posibles de especies se diferenciaron (el porcentaje se calculó de acuerdo con el número de combinaciones de especies posibles [(n-1) (n)/2=55]). Para probar que el patrón fuera reproducible, se varió la cantidad de amplificado digerido (se redujo a la mitad) utilizando la misma concentración de enzima; los resultados coincidieron con los obtenidos inicialmente.

### Análisis morfológico

**Extracción e ilustración de la genitalia interna de machos y hembras.** El método de extracción permitió diferenciar las

estructuras que hacen parte de la genitalia interna de las especies. Para el género *Ceraeochrysa* se observaron estructuras de la genitalia interna como el *gonarcus* (gc) y la *gonapsis* (gps). Para el género *Chrysoperla* se observaron estructuras como el *gonarcus* (gc), y el *tignum* (tg), y para el género *Leucochrysa* la estructura presente es el *gonarcus* (gc). La forma de estas estructuras permite una caracterización y diferenciación de cada una de las especies.

La genitalia de machos ofrece una mayor diferenciación de especies que la de hembras. Los géneros del estudio pueden ser fácilmente separados de acuerdo con la presencia de la *gonapsis*, que distingue al género *Ceraeochrysa* y de acuerdo a la presencia del *tignum*, que distingue al género *Chrysoperla*. En el género *Leucochrysa* no se observó ni *gonapsis* ni *tignum*. En el género *Ceraeochrysa*, el *gonarcus* es bastante variable y permite distinguir cada una de las especies. De las estructuras presentes en el *gonarcus*, dos son las más útiles para separar las especies, la *gonocornua* y el *entoprocessus*, de acuerdo con su forma, la primera permite distinguir a *Ceraeochrysa* sp. 1 de *Ceraeochrysa cubana*, y el segundo permite distinguir a *Ceraeochrysa* sp. 2, *Ceraeochrysa* sp. 3 y *C. claveri*.

En el caso del *tignum*, aunque presenta un patrón muy parecido entre las especies del género *Chrysoperla*, con un análisis cuidadoso de la estructura, es útil para diferenciar las especies. Al caracterizar el *tignum* es fácil separar a *Chrysoperla* sp. 1 de *C. carnea* y *C. rufilabris*, y estas dos especies pueden ser distinguidas al caracterizar el *gonarcus*, haciendo especial énfasis en los *brazos laterales* y el *entoprocessus*. Con la información generada a partir de las estructuras de la genitalia se construyó una clave dicotómica de determinación específica dentro de los tres géneros.

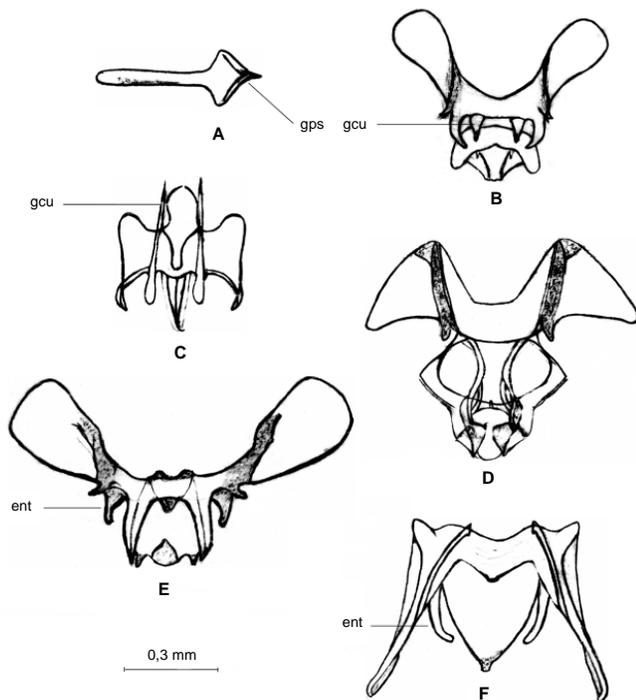
### Clave morfológica para la determinación de 11 especies de crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae), en la zona de muestreo

1. Presencia de <i>gonapsis</i> (gps) (Fig. 1A) ..	Género <i>Ceraeochrysa</i> , 2
1'. Ausencia de <i>gonapsis</i> .....	6
2 (1). <i>Gonocornua</i> (gcu) .....	3
2'. <i>Gonocornua</i> no visibles .....	4
3 (2). <i>Gonocornua</i> cortas (Fig. 1B) .....	<i>Ceraeochrysa</i> sp. 1
3'. <i>Gonocornua</i> largas, proyectadas dorso-caudalmente, con los extremos en punta (Fig. 1C) .....	<i>Ceraeochrysa cubana</i>
4 (2'). <i>Entoprocessus</i> (ent) visibles .....	5
4'. <i>Entoprocessus</i> no visibles (Fig. 1D) .....	<i>Ceraeochrysa</i> sp. 2
5 (4). <i>Entoprocessus</i> en forma de cuerno, mas cortos que la mitad del brazo lateral (1a) (Fig. 1E) .....	<i>Ceraeochrysa</i> sp. 3
5'. <i>Entoprocessus</i> bastante largos, redondeados en la punta (Fig. 1F) <i>Ceraeochrysa claveri</i> .....	
6 (1'). Presencia de <i>tignum</i> (tg) .....	Género <i>Chrysoperla</i> , 7
6'. Ausencia de <i>tignum</i> .....	Género <i>Leucochrysa</i> , 9
7 (6). <i>Tignum</i> delgado .....	8
7'. <i>Tignum</i> grueso y bastante arqueado con <i>acumen</i> redondeado tan grueso como los <i>brazos laterales</i> (Fig. 2A) .....	<i>Chrysoperla</i> sp. 1
8 (7). <i>Gonarcus</i> (gc) arqueado con <i>entoprocessus</i> cortos en forma de medialuna (Fig. 2B) .....	<i>Chrysoperla carnea</i>
8'. <i>Gonarcus</i> largo, amplio en forma de V con <i>entoprocessus</i> largos en forma de medialuna y <i>mediuncus</i> (mu) estrecho hacia el ápice (Fig. 2C) .....	<i>Chrysoperla rufilabris</i>

- 9 (6'). Hembras con *vela* (**vel**) corta y *espermateca* (**esp**) de forma ondulada, no esclerotizada (Fig. 3A)° ..... *Leucochrysa* sp. 1  
 9'. Hembras con *vela* larga ..... 10  
 10 (9'). *Gonarcus* bastante arqueado con los *brazos laterales* alargados dorso ventralmente; *mediuncus* (**mu**) grueso, largo y bifurcado, con ápice triangular (Fig. 3B) ..... *Leucochrysa* sp. 2  
 10'. *Gonarcus* estrecho y arqueado (en forma de U) con los *brazos laterales* alargados, proyectados ventralmente; *mediuncus* grueso, bifurcado y con digitaciones hacia el ápice (Fig. 3C) ..... *Leucochrysa* sp. 3

Al observar las estructuras de los géneros *Ceraeochrysa* y *Leucochrysa*, es evidente la variación, en comparación con la variación de los caracteres de morfología externa usados normalmente, para determinar especies. Aunque en ocasiones se registró variación intraespecífica en las estructuras, debido seguramente a diferentes factores tales como la edad o el tipo de alimentación, en general se conservó un patrón básico que permitió determinar un espécimen dentro de un grupo dado. De los tres morfotipos de *Ceraeochrysa*, según la morfología de genitalia, *Ceraeochrysa* sp. 1 muestra el mismo patrón que *Ceraeochrysa cincta* (Schneider, 1851) y al revisar la morfología externa se presenta la misma descripción, con la variación del número de manchas en el escapo. Para el caso de *Ceraeochrysa* sp. 3, la morfología de genitalia interna es bastante similar a la descrita para *Ceraeochrysa caligata* (Banks, 1946), pero no se realizó una revisión de caracteres de morfología externa que corroboren la determinación de la especie.

**Diferenciación morfológica y molecular.** Se observó una relación más estrecha entre los géneros *Chrysoperla* y



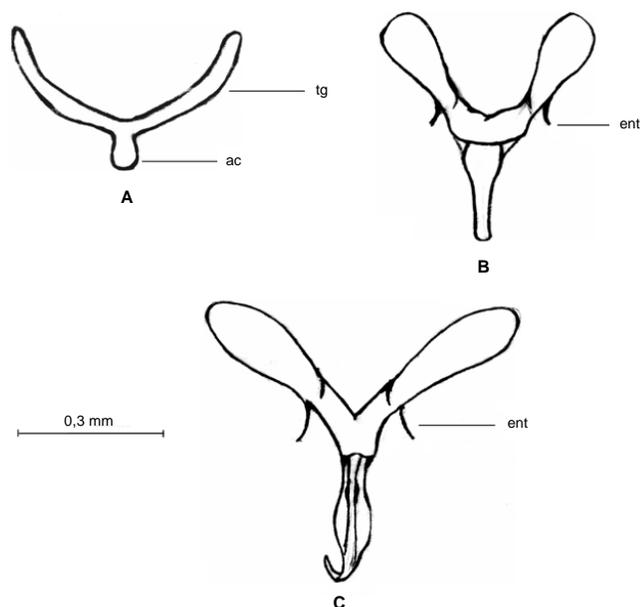
**Figura 1.** Estructuras de la genitalia de las especies del género *Ceraeochrysa*. **A.** *gonapsis* (**gps**) de *Ceraeochrysa* sp.2. **B.** *Ceraeochrysa* sp.1. **C.** *Ceraeochrysa cubana*. **D.** *Ceraeochrysa* sp.2. **E.** *Ceraeochrysa* sp.3. **F.** *Ceraeochrysa claveri*.

*Leucochrysa* debido a que las estructuras como *entoprocessus* y *mediuncus* son más frecuentes en los primeros géneros. Es importante exponer que en la literatura existe cierta confusión en cuanto a la identificación o a la designación del nombre de una estructura, específicamente refiriéndose a estas dos. Brooks y Barnard (1990) no consideraron la existencia *mediuncus* en el género *Chrysoperla*, mientras Henry *et al.* (1993) lo identificaron y describieron para tres especies de este género. De Freitas (2003) describió el *arcessus* para otras tres especies del género, pero no se refirió al *mediuncus*. Adams (1977) se refiere a estas dos estructuras como sinónimas (*mediuncus* = *arcessus*). Brooks y Barnard (1990) no describieron la existencia de *mediuncus* en el género *Leucochrysa*, mientras que Tauber (2004) reporta el *mediuncus* para este género, mas no el *arcessus*. De acuerdo con esta situación, para el análisis se decidió dejar la descripción hecha por Henry *et al.* (1993) y trabajar con el *mediuncus* para el género *Chrysoperla*, dada la descripción que hacen de la estructura; en el caso de *Leucochrysa* se decidió dejar la designación expuesta por Tauber (2004) de *mediuncus* para este género.

Las estructuras de genitalia para las especies del género *Ceraeochrysa* muestran mayor diferenciación interespecífica, que la que se observó en las especies de los otros géneros. Esto se explica ya que en el género *Ceraeochrysa* existe una mayor variación de formas, dimensiones y presencia o visualización de estructuras. Para el género *Chrysoperla*, las especies *Chrysoperla* sp. 1 y *Chrysoperla rufilabris* mostraron estructuras de genitalia bastante similares, mientras que la genitalia de *C. carnea* está más diferenciada. En general este género presentó poca variación interespecífica, en contraste con las especies de los otros dos géneros. Es necesario revisar con detenimiento los caracteres de genitalia interna al momento de examinar especímenes, a partir de los cuales se puede elucidar más fácilmente la determinación de una especie.

De los tres géneros evaluados, *Leucochrysa* presentó la menor variación intraespecífica en el análisis molecular, conservándose las bandas específicas de especie y mostrando menos ocurrencia de bandas no específicas (Fig. 4). Este resultado puede ser de gran utilidad, ya que el género ha sido reportado con problemas significativos en su sistemática. Tanto los machos como las hembras exhiben una variación geográfica substancial tanto en el color como en la morfología (Adams 1977). Además, muchos especímenes están esparcidos en las colecciones de la mayoría de los museos y muchas especies recientemente nombradas fueron descritas a partir especímenes únicos. De acuerdo con esto, el género presenta numerosas sinonimias e identificaciones erróneas, que confunden su sistemática notablemente (Tauber 2004).

El género *Chrysoperla*, al igual que *Leucochrysa*, presentó baja variación intraespecífica en relación con las bandas no específicas, que no son informativas en el análisis. Esto pudo haber sido influenciado por el hecho de que todos los individuos de dos especies proceden de la cría de laboratorio, encontrándose una fuerte endogamia que puede mostrar un bajo polimorfismo entre las muestras. Sin embargo, para la *Chrysoperla* sp. 1, aunque se realizó cría, los especímenes estudiados se obtuvieron de la descendencia de varios padres recolectados en el campo, estando poco tiempo sometida a los efectos de endogamia de una cría artificial. La diferenciación morfológica y molecular sirve de diagnóstico en este grupo, en donde se ratifica la baja variación de caracteres morfológicos externos, pero se encuentran nuevos elementos de discriminación entre las especies.

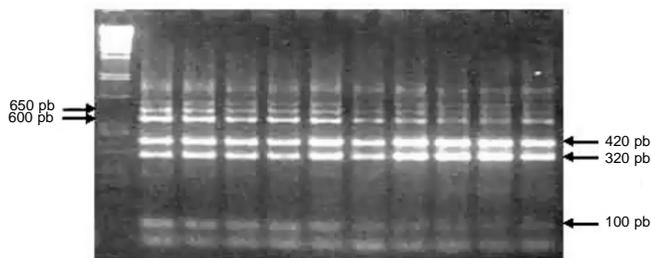


**Figura 2.** Estructuras de la genitalia de las especies del género *Chrysoperla*. **A.** *Chrysoperla* sp.1. **B.** *Chrysoperla carnea*. **C.** *Chrysoperla rufilabris*.

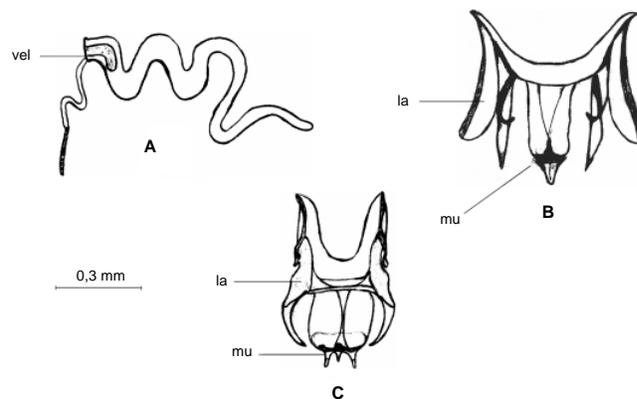
La diferenciación molecular puede ser bastante útil, teniendo en cuenta, que aunque estas especies presentan una baja diferenciación morfológica, se logran separar por técnicas moleculares, que se pueden aplicar sobre un mayor número de especies de este género, y utilizar una muestra que represente poblaciones naturales. Además, teniendo en cuenta que se seleccionaron fragmentos específicos, bien definidos, que se presentaron en todos los individuos de cada especie, no se registró la variación intraespecífica entre las poblaciones.

Todos los resultados en el presente estudio son de suma importancia debido a la poca información que se tiene sobre especies de la familia Chrysopidae para la zona. De 11 especies del estudio, sólo cuatro han sido determinadas hasta especie, y las siete restantes, algunas de las cuales han sido evaluadas por especialistas, permanecen sin determinar.

Se probó la validez de los caracteres de morfología externa usados para separar las especies. Sin embargo, los caracteres de morfología externa pueden no ser siempre ventajosos. Casos como el ya citado de *Ceraeochrysa* sp. 1, o el de *Chrysoperla* sp. 1 en la cual no se pudo determinar con seguridad la especie (posiblemente *Chrysoperla externa*) dadas las variaciones en



**Figura 4.** Digestiones con *HinfI* de las amplificaciones generadas por los iniciadores NS3-NS4, separadas en gel de agarosa al 1,7%, de 10 muestras de ADN de *Leucochrysa* sp. 2. Abreviaturas usadas: pb-pares de bases, M-marcador de peso.



**Figura 3.** Estructuras de la genitalia de las especies del género *Leucochrysa*. **A.** *Leucochrysa* sp.1. **B.** *Leucochrysa* sp.2. **C.** *Leucochrysa* sp.3.

la coloración del adulto, muestran que en los casos en los que se presente confusión, la información de morfología externa debe ser apoyada por otro tipo de información en este caso la de genitalia interna y la molecular.

En forma general, se puede decir que los caracteres utilizados para distinguir las especies del estudio son útiles, teniendo en cuenta que los datos de morfología de genitalia interna y los datos moleculares mostraron la diferenciación de los once grupos, en el caso de la genitalia interna, con diferentes patrones de las estructuras y en el caso de los datos moleculares, con la utilización de solo una combinación de iniciadores NS y la digestión del amplificado producido con una enzima de restricción (NS5-NS6+*DraI*). Con la información generada se contribuye a enriquecer el conocimiento taxonómico que sobre la familia se tiene, además de ayudar a resolver los problemas sistemáticos dentro de los géneros.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Doctora Marta Martínez Wells de la Universidad de Connecticut y al Doctor John Ewer de la Universidad de Cornell por toda la documentación suministrada, y al Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia CENICAÑA por la financiación de este trabajo.

### Literatura Citada

- A'HARA, S.; HARLING, R.; MCKINLAY, R.; TOPPING, C. 1998. RAPD profiling of spider (Aranae) DNA. *The Journal of Arachnology* 26: 397-400.
- ADAMS, P. A. 1977. Taxonomy of United States *Leucochrysa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Psyche* 84: 92-102.
- ADAMS, P. A.; PENNY, N. D. 1987. Neuroptera of the Amazon basin. Parte 11a. Introduction and Chrysopini. *Acta Amazonica* 15 (1985): 413-479.
- ALBUQUERQUE, G. S.; TAUBER, C. A.; TAUBER, M. J. 2001. *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa* spp.: potential for biological control in the New World tropics and subtropics. Cap. 21, pp. 408-423. En: McEwen, P.; New, T.; Whittington, A. (eds.). *Lacewings in the crop environment*. Cambridge University Press, USA. 564 p.
- ARNOLD, M. L.; BUCKNER, C. M.; ROBINSON, J. L. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid separation in Louisiana irises. *Proceedings of the National Academy of Science of America* 88: 1398-1402.

- BROOKS, S. J.; BARNARD, P. C. 1990. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). Bulletin British Museum Natural History (Entomology) 59: 117-286.
- CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.; MENDONÇA, C.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SILVA, M.; BEN, R.; MAURER, R.; LIMA, W.; LENZI, H. 2003. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98 (8): 1039-1043.
- CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B. S. 1993. A simple and rapid DNA extraction method for plant, animal, and insects suitable for RAPD and other PCR analysis. PCR Methods and Applications 3: 69-70.
- DE ALMEIDA, R. P.; STOUTHAMER, R. 2003. Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae): A new record for Peru. Neotropical Entomology 32: 269-272.
- DE FREITAS, S. 2003. *Chrysoperla* Steinmann, 1964 (Neuroptera: Chrysopidae): Descrição de uma nova espécie do Brasil. Revista Brasileira de Entomologia 47 (3): 385-387.
- HENRY, C. S. 1983. Acoustic recognition of sibling species within the holartic lacewing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Systematic Entomology 8: 293-301.
- HENRY, C. S.; WELLS, M. M.; PUPEDIS, R. J. 1993. Hidden taxonomic diversity within *Chrysoperla plorabunda* (Neuroptera: Chrysopidae): two new species based on courtship songs. Annals of the Entomological Society of America 86 (1): 1-13.
- HOY, M. A. 1994. Insect molecular genetics. An introduction to principles and applications. Academic Press, Inc. San Diego, California. 546 p.
- KANG-ZHEN, D.; WEN-ZHU, L.; JUN-ZHI, C.; XING-KE, Y. 2004. Three new species of *Dichochrysa* (Insecta: Neuroptera: Chrysopidae) from China with a checklist of Chinese *Dichochrysa*. The Raffles Bulletin of Zoology 52 (1): 67-74.
- LANDRY, B. S.; DEXTRAZE, L.; BOIVIN, G. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. Genome 36: 580-587.
- LUCHETTI, A.; MANTOVANI, B.; TRENTINI, M. 2005. Rapid identification of non-neosomic *Tunga penetrans* and *Tunga trimamillata* (Insecta: Siphonaptera) specimens through PCR-RFLP method. Bulletin of Insectology 58 (1): 15-18.
- NAVAJAS, M.; COTTON, D.; KREITER, S.; GUTIÉRREZ, J. 1992. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. Experimental and Applied Acarology 15: 211-218.
- NUÑEZ, E. 1988. Chrysopidae (Neuroptera) del Perú y sus especies más comunes. Revista Peruana de Entomología 31: 69-75.
- PENNY, N. D. 2002. A guide to the lacewings (Neuroptera) of Costa Rica. Proceedings of the California Academy of Sciences 53 (12): 161-457.
- RAMÍREZ, D. 2002. Reconocimiento y evaluación del uso de especies de la familia Chrysopidae para el manejo del pulgón amarillo *Sipha flava* (Homoptera: Aphididae) en caña de azúcar. Tesis de pregrado. Cali-Colombia. Universidad Nacional. Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 137 p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, C. R.; MANIATIS, T. 1989. Preparation and examination of agarose gels, pp. 6.9-6.19. En: Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. 2da Ed. Molecular cloning: A laboratory manual.
- SCHILTHUIZEN, M. 2003. Shape matters: the evolution of insect Genitalia. Proceedings of the Section Applied and Experimental Entomology of the Netherlands Entomological Society 14: 9-15.
- SHARMA, A. D.; GILL, P. K.; SINGH, P. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. Plant Molecular Biology Reporter 20: 415a-415f.
- SILVA, I.; HONDA, J.; VAN KAN, F.; HU, J.; NETO, L.; PINTUREAU, B.; STOUTHAMER, R. 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. Biological Control 16: 177-184.
- TAUBER, C. A. 2004. A systematic review of the genus *Leucochrysa* (Neuroptera: Chrysopidae) in the United States. Annals of the Entomological Society of America 97 (6): 1129-1158.
- TAUBER, C. A.; DE LEÓN, T.; PENNY, N. D.; TAUBER, M. J. 2000. The genus *Ceraeochrysa* (Neuroptera: Chrysopidae) of America North of Mexico: larvae, adults, and comparative biology. Annals of the Entomological Society of America 93 (6): 1195-1221.
- VIDIGAL, T.; MONTESOR, L.; SIMPSON, A.; CARVALHO, O. 2002. Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism of Cytochrome Oxidase Subunit I Used for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* species intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97 (1): 47-52.
- WILKERSON, R. C.; GAFFIGAN, T. V.; LIMA, J. 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 90 (6): 1-12.

Recibido: 18-ene-2007 • Aceptado: 3-nov-2007

## Immature Stages of *Aspidolea singularis* (Coleoptera: Scarabaeidae: Cyclocephalini)

Estados inmaduros de *Aspidolea singularis* (Coleoptera: Scarabaeidae: Cyclocephalini)

JHON CÉSAR NEITA MORENO<sup>1</sup>, BRETT RATCLIFFE<sup>2</sup>, GERMAN CALBERTO<sup>3</sup>

**Abstract:** The larva and pupa of *Aspidolea singularis* (Scarabaeidae: Dynastinae: Cyclocephalini) are described for first time based on specimens from Colombia. A key to the known third instar larvae of genera in the tribe Cyclocephalini is included. Data on the larval biology of *Aspidolea singularis* are provided.

**Key words:** Dynastinae. Larvae. Pupa. Key. Biology.

**Resumen:** Se describen por primera vez la larva y la pupa de *Aspidolea singularis* (Scarabaeidae: Dynastinae: Cyclocephalini) con base en especímenes procedentes de Colombia. Se incluye una clave para las larvas de tercer instar conocidas de los géneros de la tribu Cyclocephalini. Se proveen datos de la biología larval de la especie *Aspidolea singularis*.

**Palabras clave:** Dynastinae. Larvas. Pupa. Clave. Biología.

### Introduction

The tribe Cyclocephalini contains 14 genera that occur in the New World except for one species of *Cyclocephala* introduced into Australia and *Ruteloryctes morio* (Fabricius, 1798), which occurs in western Africa from Guinea to Angola (Endrödi 1985; Jameson *et al.* 2002). Although species in the tribe Cyclocephalini are well-represented in collections, the larvae have been described for only a few species, and most of those were Nearctic. Accordingly, it is not yet possible to characterize larvae at the tribe level. Larvae of 11 species in three genera in the tribe Cyclocephalini have been previously described (Ritcher 1966; Morelli 1991; Morelli and Alzugaray 1994; Vincini *et al.* 2000; Ramírez *et al.* 2004). Our results show that the larvae of Cyclocephalini are distinguished from other American dynastine larvae by the following combination of characters: epipharynx with haptomeral process not entire (but entire in all species of *Dyscinetus* and in *Ancognatha manca* LeConte, 1866); plegmatia absent (except wide in *Cyclocephala testacea* Burmeister, 1847 and narrow in *Aspidolea singularis* Bates, 1888); dorsal surface of last antennal segment with two sensory spots; ocelli present and often pigmented (all species of *Cyclocephala*); each tarsal claw with two setae; raster without palidia (with palidia in *C. modesta* Burmeister, 1847 and *C. testacea*). The genus *Aspidolea* Bates contains 25 species that occur from Mexico to Argentina (Endrödi 1985; Ratcliffe 1977, 2003; Martínez 1975; Dechambre 1992). The aims of study were to: 1.) Describe the immature stages of genus *Aspidolea* (Based on *A. singularis* Bates, 1888). 2.) Contribute to the knowledge of the larval biology and life cycle of specie *A. singularis* 3.) provide a key to know third-stage larvae of genera in the tribe Cyclocephalini.

### Materials and Methods

Terms and characters used in the description are those of Ritcher (1966), Morón (1987), and Morón and Ratcliffe (1990). Specimens were deposited at the Universidad Nacional de Colombia, Museo Entomológico, Facultad de Agronomía, Bogotá, Colombia (UNAB).

### Results

*Aspidolea singularis* Bates, 1888.  
(Figs. 1-14) Third-Instar

This description is based on four first-instar, three second-instar, five third-instar, two cast skins of the third-instar larvae and five pupae reared to the adult stage from: COLOMBIA, Cauca, Caldono. 2°47'50"N; 76°29'00"W. 1920 m. In soil of crop (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae). 12 Nov 2005. Calvert G. and Neita J. (UNAB).

**Head** (Fig. 1). Maximum width of head capsule 4.3 mm. Surface of cranium yellowish, finely punctate. **Frons.** Each side with 2 posterior frontal setae, 1 anterior frontal seta, and 3-2 anterior angle frontal setae; cranial surface with 3 dorsoepicranial setae, 3 epicranial setae, and 7 paraocellar setae on each side. Clypeus with 1 exterior clypeal seta and 2 anterior clypeal setae. Labrum slightly asymmetrical with 2 anterior labral setae, 4 posterior lateral setae on each side, apex with 3 setae, posterior setae absent. Ocelli present, not pigmented. **Epipharynx** (Fig. 2). Haptomeral process notched forming 2 teeth; heli absent; plegmatia narrow, formed by 14-15 plegmata; right chaetoparia with 67 spine-like setae; left chaetoparia with 55 spine-like setae, without any sensillae; acroparia each with

<sup>1</sup> Maestría en Entomología, Grupo de Sistemática de Insectos-Agronomía. Museo Entomología UNAB. Universidad Nacional de Colombia. Ciudadela Universitaria Bloque 500, Museo de Entomología 220, Bogotá, Colombia. Autor para correspondencia: Calle 76 bis, No. 94 A 10 Barrio Santa Rosita, Bogotá, Colombia. [cneitaj@unal.edu.co](mailto:cneitaj@unal.edu.co)

<sup>2</sup> Systematics Research Collections, University of Nebraska State Museum, W-436 Nebraska Hall, University of Nebraska, Lincoln, NE 68588-0514, USA. [bratcliffe1@unl.edu](mailto:bratcliffe1@unl.edu)

<sup>3</sup> Asistente de Investigación-Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, Laboratorio de Manejo Integrado de Plaga, Recta Cali-Palmira, Palmira, Valle del Cauca, Colombia. [gcalberto@yahoo.com](mailto:gcalberto@yahoo.com)

11 straight, long, thick setae; each acanthoparia with 15 short, curved, spine-like setae; pedium short, ovate. Dexiotorma narrow and elongate; laeotorma slightly shorter than dexiotorma and elongated toward apex, pternotorma rounded. Dexiophoba absent; laeophoba well-developed between haptolachus and inner side of laeotorma, formed by nine slightly slender setae. Sclerotized plate of right nesium long, elongated and truncate at apex; sense cone on left nesium represented by longitudinal, well-sclerotised plate, apex with two sensilla. Crepis not defined. **Mandibles.** *Right mandible* (Fig. 3A-C): scissorial area with blade-like apical tooth ( $S_1 + S_2$ ) and 1 rounded tooth ( $S_3$ ) after scissorial notch; scrobe with 6 slender, long setae. Dorsal surface with line of 7 slender, long setae. Ventral surface with elongate-oval stridulatory area formed by 48 narrowly separated ridges; ventral process well-developed, rounded, with many asperites. Brustia with 6 stout, long setae. Calyx large, basolateral setae absent. Molar area with 3 wide, convex, ridged lobes ( $M_{1-3}$ ) and with 7 slender, long setae. *Left mandible* (Fig. 4A-C): scissorial area with sinuate, blade-like apical tooth ( $S_1 + S_2$ ) and 1 rounded tooth ( $S_3$ ) after scissorial notch. Scrobe with 6 slender, long setae. Dorsal surface with line of about 10 slender, moderately long setae; acia well-developed, sharp, with 4 setae at apex. Basolateral setae absent. Ventral surface with elongate-oval stridulatory area formed by 46, narrowly separated ridges; ventral process well-developed, rounded, with many asperites; dorsomolar area with row of 6 stout, slender, moderately long setae; brustia with 12 stout, long setae. Molar area with 3 lobes, first molar lobe ( $M_1$ ) large. **Maxila** (Fig. 5A-B). Cardio subrectangular. Stipes larger than wide. Galea with many stout setae and 1 well-developed uncus

at apex. Lacinia with many stout setae and 3 unci (middle uncus shorter than others), base fused. Maxillary palpus 4-segmented, segments 1 and 3 subequal in length, segment 4 slightly longer than segment 2. Stridulatory area with 7 blunt, truncate ridges (Fig. 6) and anterior truncate process. **Hypopharynx** (Fig. 7). Glossa with 55 slender, long setae and 14 stout, short setae. Hypopharyngeal sclerome asymmetrical, concave medially, sharp process produced dorsally; left lateral lobe with 15 slender, moderately long setae; right lateral lobe with 10 slender, moderately long setae. Left margin of sclerome with row of 28 stout, moderately long setae. **Antennae.** Dorsal surface of last segment with 2 irregularly-shaped, dorsal sensory spots (Fig. 8). Ventral surface of last segment with 2 irregularly-shaped sensory spots (Fig. 9).

**Thorax.** Prothoracic spiracle (Fig. 10) 0.28 mm long, 0.18 mm wide; respiratory plate yellowish, regularly shaped as a closed "C", bulla not prominent; distance between respiratory lobes less than diameter of bulla; plate with 21 holes across diameter at middle, holes with irregular edges (Fig. 11). Dorsum of prothorax with transverse row of 9 long, slender setae. Mesoprescutum with transverse, irregular row of 6 long, slender setae; mesoscutellum with transverse row of 4 long, slender setae and 2 stout, spine-like setae. Metaprescutum with 10 long, slender setae and 4 stout, spine-like setae; metaescutellum with 4 long, slender setae and 2 stout, spine-like setae. **Legs** (Fig. 12A-B): Tarsal claws with enlarged apical process, 1 basoexternal seta, and 1 internal, preapical seta. Tarsal claw on pro- and metathoracic legs shorter than those of mesothoracic legs. Coxa, trochanter, and tibiotarsus of all legs with many fine, stout setae.

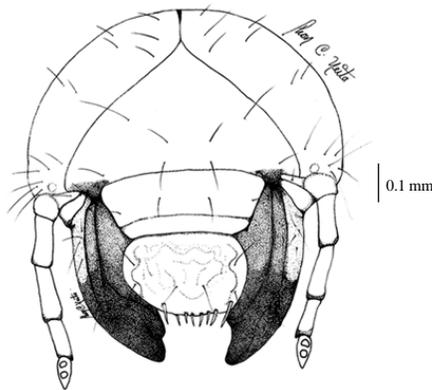


Figure 1. Head, frontal view.

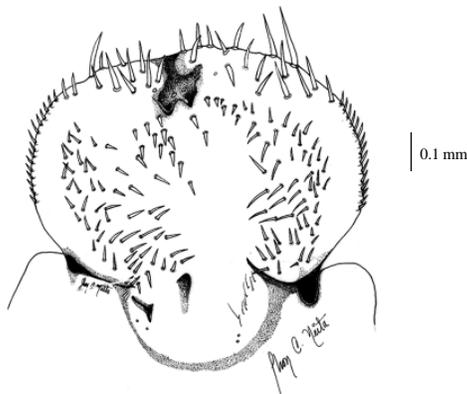


Figure 2. Epipharynx.

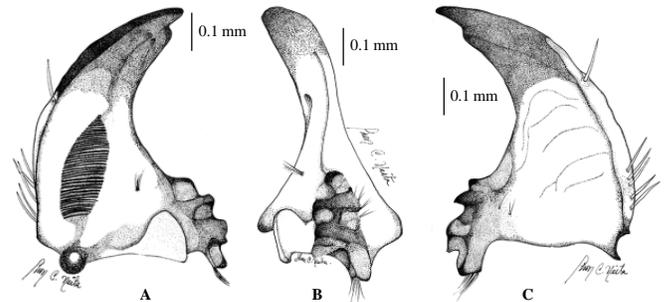


Figure 3. Right mandible. A. ventral view. B. inner view. C. dorsal view.

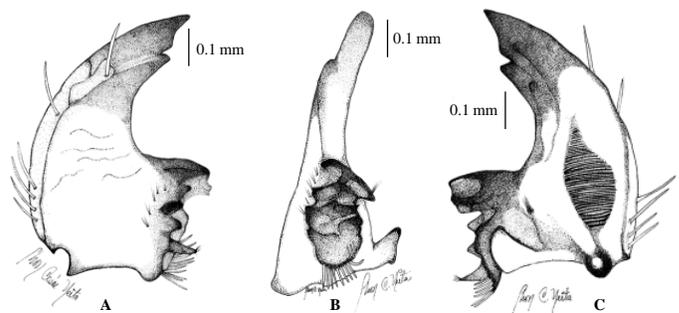


Figure 4. Left mandible. A. dorsal view. B. inner view. C. ventral view.

**Abdomen.** Abdominal spiracles I 0.18 mm long and 0.12 mm wide, shorter than spiracles II-VIII. Spiracles on segments II and IV equal in size (0.19 mm long and 0.13 mm wide); spiracles on segments V and VI equal in size (0.19 mm long and 0.19 mm wide); spiracle of segments VII and VIII larger than preceding spiracles (0.2 mm long and 0.22 mm wide). Chaetotaxia on abdominal segments (Table 1).

**Raster.** Surface without palidia; campus with 8 slender, long setae; teges with 53-55 short setae, barbula with 18 long, slender setae. Anal slit transverse. Approximate dorsal body length 19.5-20.5 mm (Fig. 13).

**First-instar.** Description based on 6 first-instar larvae taken in soil surrounding cassava crop (*Manihot esculenta* Crantz. Euphorbiaceae). Similar to second and third-instar larvae, except width of head capsule 1.9-2.3 mm) and body size smaller. Larvae of first and second-instars lack the anterior frontal setae.

**Second-instar.** Description based on 5 second-instar larvae reared from the first-instar larvae. Similar to third-instar, except width of head capsule 3.5-3.7 mm and body size smaller.

**Table 1.** Chaetotaxia on abdominal segments.

Organ	Long, slender setae	Short, spine-like setae
Abdominal segment I		
Prescutum	4	2
Subscutum	Absent	Absent
Scutum	8	16
Scutellum	10	10
Abdominal segment II		
Prescutum	4	16
Subscutum	1	3
Scutum	10	35
Scutellum	7	28
Abdominal segment III		
Prescutum	4	22
Subscutum	1	3
Scutum	8	44
Scutellum	8	31
Abdominal segment IV		
Prescutum	24	4
Subscutum	1	3
Scutum	8	39
Scutellum	10	33
Abdominal segment V		
Prescutum	4	25
Subscutum	1	3
Scutum	19	40
Scutellum	10	34
Abdominal segment VI		
Prescutum	4	33
Subscutum	1	3
Scutum	19	28
Scutellum	10	15
Abdominal segment VII		
(2 row).	8	13
Abdominal segment VIII (2 row)	10-13	Absent
Abdominal segment IX (2 row)	10	Absent

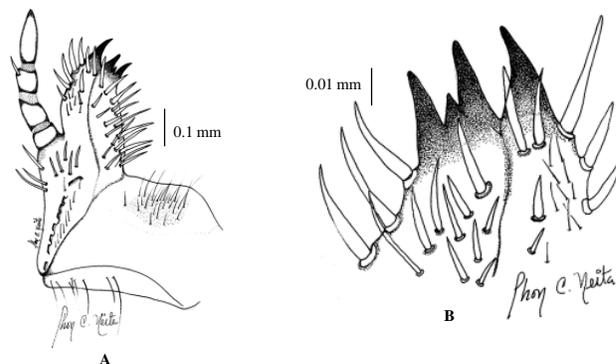
\* Note: Abdominal segment X with approximately 80 moderate to long, slender setae.  
All spiracular areas with 3 long, slender setae and 1 short, spine-like seta.  
Pleural lobes with 5 long, slender setae and 2 stout, short setae.

**Pupa** (Fig. 14A-B).

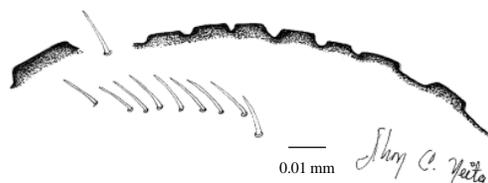
**Description** Female (Fig. 14 A-B). Length 15 mm. Widest width 7.5 mm. **Head.** Surface glabrous, strongly deflexed; antennae, labrum, mandibles, maxillae and palps discernible; antennal tecae expanded, stout with apex rounded. **Thorax.** Surface glabrous. Pronotum convex, anterior and posterior angles clearly defined. Meso- and metanotum well-differentiated. Elytral and posterior wing tecae closely appressed, curved ventrally around body; elytral tecae extending to middle of abdominal segment IV; posterior wing tecae extending to middle of abdominal segment V. Protibia with 3 distinct teeth on external edge. Meso- and metatibiae with inner and external spines well-developed at apex. **Abdomen.** Segments I-VII (ventral view) well-defined. Segment VII and VIII separated; segments VII and IX fused. Segment X with genital ampulla small (male) and slightly prominent. Segments I-VII (dorsal view) with well-defined, dioneiform organs, the first very sclerotized. Pleural lobes rounded. Spiracle I elongate, with fine peritreme and covered by wing thecae; spiracles II-IV ovate, prominent, with strongly sclerotized peritreme; spiracle V-VIII closed. Abdominal apex rounded, with fine, short setae.

**Remarks.** The following characters will separate *A. singularis* from other known Cyclocephalini larvae: Frons with 2 posterior frontal setae, 1 anterior frontal seta, and 2-3 anterior angle frontal setae. Ocelli not pigmented. Epipharynx without sensillae among setae. Tarsal claw on pro- and metathoracic legs shorter than those of mesothoracic legs. Abdominal spiracles I shorter than spiracles II-VIII; spiracles on segments II and IV equal in size; spiracles on segments V and VI equal in size; spiracle of segments VII and VIII larger than preceding spiracles.

**Biological data.** The adults of both sexes were found in the soil during March and April. Adults are attracted to lights at



**Figure 5.** Maxilla. A. ventral view. B. uncu and unci.



**Figure 6.** Detail of maxillary stridulatory area.

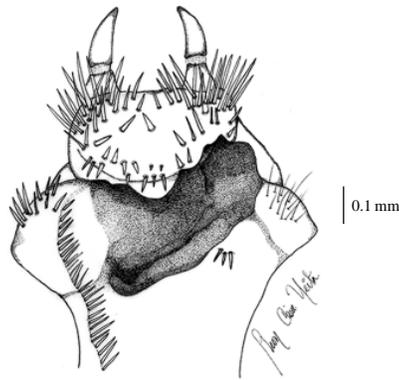


Figure 7. Hypopharynx.

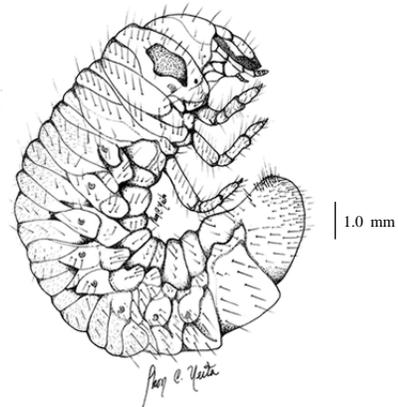


Figure 13. Third instar, lateral view.

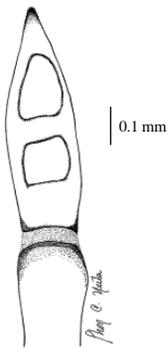


Figure 8. Last antennal segment, dorsal surface.

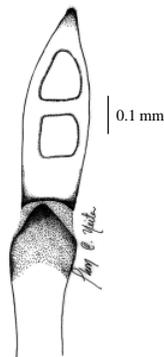


Figure 9. Last antennal segment, ventral surface.

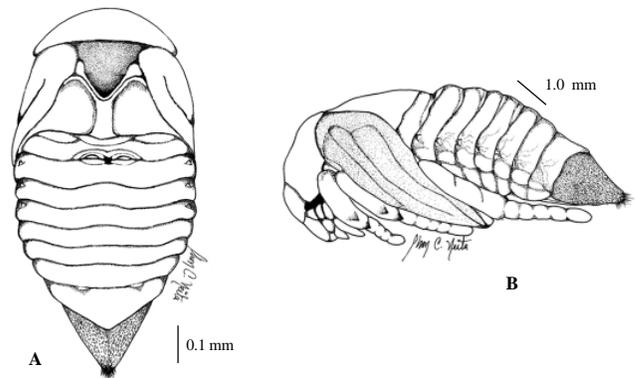


Figure 14. Pupa Female. A. Dorsal view. B. Lateral view.

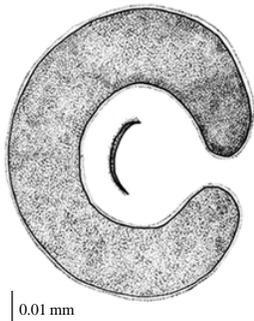


Figure 10. Prothoracic spiracle.



Figure 11. Microstructure of respiratory plate.

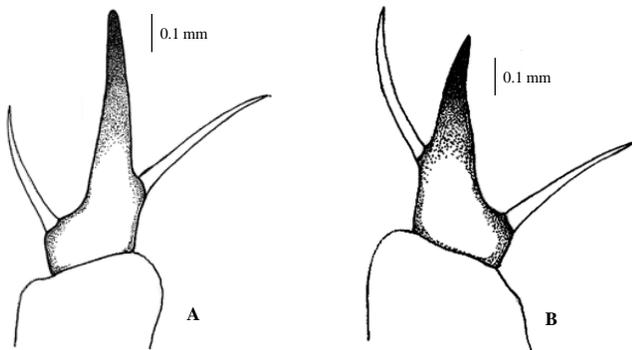


Figure 12. A. Mesothoracic claws, external view. B. Metathoracic claws, external view.

night, especially from May to June. The larvae are saprophagous and live in soil with organic matter. First-instar larvae were collected in July. From January to February, pupae form weak cells within the soil. This species has a one-year life cycle.

**Distribution.** *Aspidolea singularis* is broadly distributed from Mexico to Venezuela, Colombia and Ecuador (Ratcliffe 2003).

**Key to the Known Third-instar Larvae of Cyclocephalini**

(Modified from Ritcher 1966)

- 1. Left mandible lacking 4<sup>th</sup> scissorial tooth..... 3
- 1'. Left mandible with 4 scissorial teeth ..... 2
- 2. Cranium with posterior frontal seta present. Haptomeral process of epipharynx prominent and entire ..... *Dyscinetus* Harold
- 2'. Cranium with posterior frontal seta absent. Haptomeral process of epipharynx notched, forming 2 teeth (entire in *Ancognatha manca* LeConte) ..... *Ancognatha* Erichson
- 3. Ocelli not pigmented. Epipharynx without sensillae among setae ..... *Aspidolea* Bates
- 3'. Ocelli pigmented. Epipharynx with many sensillae among setae ..... *Cyclocephala* Dejean

### Acknowledgments

We thank Dr. Andreas Gaigl for his collaboration during field work. This project was supported, in part, by grants from the Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Germany) and International Center for Tropical Agriculture-“Soil Pests” (Colombia) to Jhon César Neita and Germán Calberto. We thank Juan Carlos Pinzón (Entomology Laboratory Assistant) and Edison Torrado (Head of the Laboratory of Entomology, Agronomy College, National University of Colombia). This project was supported by an NSF Biotic Surveys and Inventory grant (DEB 9870202) to B. C. Ratcliffe and R. D. Cave, and a NSF PEET grant (DEB 0118669) to M. L. Jameson and B. C. Ratcliffe.

### Literature Cited

- DECHAMBRE, R. P. 1992. Nouveaux Cyclocephalini des genres *Cyclocephala* et *Aspidolea* (Col. Dynastidae), pp. 57-76. En: Lachaume, G. (eds.). Les Coleopteres du Monde 14 : Dynastidae Américains. Sciences Nat., Venette, France. 87 p., 13 plates.
- ENDRÖDI, S. 1985. The Dynastinae of the World. Dr. W. Junk Publ., Dordrecht. 800 pp., 46 plates.
- JAMESON, M. L.; RATCLIFFE, B. C.; MALY, V. 2002. Review of the genus *Acrobolbia* Ohaus with remarks on its classification and key to the world genera of Cyclocephalini (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). Folia Heyrovskyana 10: 1-15.
- MARTÍNEZ, A. 1975. Una nueva especie de *Aspidolea* del Ecuador (Col. Scarabaeidae: Dynastinae). Entomologische Arbeiten aus dem Museum G. Frey 26: 307-313.
- MORELLI, E. 1991. Descripción de la larva y pupa de *Cyclocephala signaticollis* Burmeister, 1847 (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) y observaciones sobre su biología. Elytron, Supplement 5 (1): 189-195.
- MORELLI, E.; ALZUGARAY, R. 1994. Descripción de la larva de *Cyclocephala testacea* Burmeister, 1847 y clave para la determinación de larvas de cuatro especies del género *Cyclocephala* en el Uruguay (Coleoptera: Dynastinae). Revista Brasileira de Biología 54 (1): 77-84.
- MORÓN, M. A. 1987. Los estados inmaduros de *Dynastes hullys* Chevrolat (Coleoptera: Melolonthidae: Dynastinae); con observaciones sobre su biología y el crecimiento alométrico del imago. Folia Entomológica Mexicana 73: 33-74.
- MORÓN, M. A.; RATCLIFFE, B. C. 1990. Description of *Strategus* larvae with a new key to species based on the larvae (Coleoptera: Melolonthidae: Dynastinae). Elytron 4: 53-66.
- RAMÍREZ, C.; MORÓN, M. A.; CASTRO, A. 2004. Descripción de los estados inmaduros de tres especies de *Anomala*, *Ancognatha* y *Ligyryus* (Coleoptera: Melolonthidae: Rutelinae y Dynastinae) con observaciones de su biología. Acta Zoológica Mexicana (n.s) 20 (3): 67-82.
- RATCLIFFE, B. C. 1977. Four new species of Neotropical Cyclocephalini (Coleoptera: Scarabaeidae). Acta Amazónica 7: 429-434.
- RATCLIFFE, B. C. 2003. The dynastine scarab beetles of Costa Rica and Panama (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). Bulletin of the University Nebraska State Museum 16: 1-506.
- RITCHER, P. O. 1966. White grubs and their allies: a study of North American scarabaeoid larvae. Oregon State University Press, Corvallis, OR. 219 p.
- VINCINI, A. M.; LÓPEZ, A. N.; MANETTI, P- L.; ÁLVAREZ-CASTILLO, H.; CARMIONA, D. M. 2000. Descripción de los estados inmaduros de *Dyscinetus rugifrons* (Burmeister, 1847) (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). Elytron 14: 91-98.

Recibido: 22-oct-2006 • Aceptado: 31-oct-2007

## Morfología del tracto digestivo y sistema reproductor femenino de *Compsus* sp. (Coleoptera: Curculionidae)

Morphology of the digestive tract and female reproductive system of *Compsus* sp. (Coleoptera: Curculionidae).

JOSÉ DAVID RUBIO G.<sup>1</sup> y JOSÉ RICARDO ACUÑA Z.<sup>2</sup>

**Resumen:** Se realizó el estudio morfológico del tracto digestivo y sistema reproductor femenino del picudo de los cítricos, *Compsus* sp. (Coleoptera: Curculionidae). El tracto digestivo presentó un arreglo típico descrito para otros insectos. Se encontraron diferencias morfológicas, sin embargo, en el buche en donde se observan unas estructuras espinosas. A nivel del mesenterón, se observó que el ventrículo anterior se encuentra dividido en sacos de tamaño medio y en el ventrículo posterior se proyectan numerosos ciegos gástricos. El sistema reproductor de la hembra mostró un arreglo estructural común a especímenes de la familia Curculionidae.

**Palabras clave:** Anatomía. Picudo cítricos. Plaga cítricos. Morfología interna.

**Abstract:** A morphological examination was conducted on the digestive tract and the female reproductive system of the citrus weevil, *Compsus* sp. (Coleoptera: Curculionidae). The digestive tract of *Compsus* sp. showed a typical arrangement as described for other insects. Morphological differences, however, were found in the crop of the foregut, which exhibited several spine-like structures. At the midgut level, the anterior ventricle was divided into medium-size sacs and numerous gastric caecae projected into the posterior ventricle. The female reproductive system showed a structural arrangement common to individuals of the family Curculionidae.

**Key words:** Anatomy. Citrus weevil. Citrus pest. Internal morphology.

### Introducción

En Colombia los cítricos se encuentran en toda la geografía nacional, cultivándose desde el nivel del mar hasta los 2.200 msnm, en diversas condiciones de clima y suelos (ICA 2002). Este cultivo ha tomado en la última década una destacada importancia social y económica; sin embargo, su rendimiento se ha visto afectado por el daño que ocasiona un escarabajo de la familia Curculionidae, provocando una disminución en el vigor, en la productividad y un aumento en la susceptibilidad al ataque de hongos radiculares y en muchos casos, la muerte de los árboles (Corrales 2002).

La familia Curculionidae agrupa más de 60.000 especies distribuidas a través del mundo (Thompson 1992). La gran mayoría son de hábitos fitófagos y pueden ser plagas de importancia económica. En el continente Americano se han registrado 13 géneros de picudos que afectan a los cítricos; entre los de mayor importancia están *Artipus*, *Diaprepes*, *Exophthalmus*, *Pachnaeus*, *Pantomorus*, *Otiorrhynchus*, *Naupactus*, *Teratopactus*, *Litostylus* y *Compsus* (Woodruff 1985; Davies y Albrigo 1994; Guedes *et al.* 2005).

El género *Compsus*, se encontró en Colombia causando daño en plantaciones de cítricos por primera vez en 1936 (Cano *et al.* 2002b). La especie que está atacando los cítricos fue identificada como *Compsus viridilineatus* Jekel por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en Tibaitatá; posteriormente, la especie *C. viridilineatus* fue denominada como "*nomen nudum*" debido a que fue publicado sin la suficiente información descriptiva para satisfacer los criterios de

disponibilidad o de publicación, por esta razón se denominó como "*Compsus* pos. n. sp." (Cano *et al.* 2002a).

A finales de 1995, un incremento en sus poblaciones causó daños graves en el sistema radicular y en el follaje de algunos cultivos cítricos del Quindío y Norte del Tolima. Infestaciones de este insecto han sido detectadas también en los departamentos de Caldas, Valle, Antioquia, Cundinamarca, Risaralda, Boyacá, Meta y Casanare; esta situación ha urgido la necesidad de implementar medidas para evitar su dispersión y prevenir el daño económico que amenaza los huertos cítricos del país (ICA 2002; Cano *et al.* 2002a).

El género *Compsus* pertenece la tribu Eustylini, subfamilia Entiminae (Arnett *et al.* 2002). Los adultos causan daño a las hojas, flores y frutos y las larvas dañan las raíces, por lo que es considerada una plaga de doble acción. Su alta capacidad de reproducción hace que se considere un grave problema para la citricultura Colombiana (Cano *et al.* 2002b).

El adulto de *Compsus* sp. es color blanco hueso, cada élitro tiene una línea subdorsal y una lateral verde o azul iridiscente, que se une en el extremo posterior del insecto. Los daños son causados al alimentarse de brotes y frutos tiernos, siendo éste último el más significativo en plantaciones cuyas frutas tienen como destino el consumo fresco (ICA 2002; Cano *et al.* 2002b). El estado larval es más dañino debido a que caen al suelo y se entierran rápidamente procediendo a alimentarse de raíces y pelos absorbentes. El número de larvas por árbol varía con la época de incidencia de la plaga; para el Tolima se encontraron hasta 35 y en Quindío 54 por árbol (ICA 2002).

<sup>1</sup> Autor para correspondencia. I. A. Estudiante Maestría Entomología Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Disciplina de Mejoramiento Genético y Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia. [josed.rubio@cafedecolombia.com](mailto:josed.rubio@cafedecolombia.com)

<sup>2</sup> Biólogo, Ph. D., Investigador Científico III, Mejoramiento Genético y Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia. [ricardo.acuna@cafedecolombia.com](mailto:ricardo.acuna@cafedecolombia.com)

Debido al escaso conocimiento del sistema digestivo y reproductor de este insecto se inició la descripción morfológica de los órganos que comprenden estos dos sistemas, determinando la forma y tamaño. En este trabajo se registra la primera descripción detallada de los órganos internos de *Compsus* sp., y busca proporcionar herramientas a biólogos y científicos en la morfología interna de esta especie.

### Materiales y Métodos

**Localización.** Esta investigación se llevó a cabo en los Laboratorios del Centro Nacional de Investigaciones de Café-Cenicafé “Pedro Uribe Mejía” de la Federación Nacional de Cafeteros (05° Norte, 75°36’W) a 1.310m de altitud en el municipio de Chinchiná (Caldas).

**Material Biológico.** Los adultos de *Compsus* sp. fueron suministrados por el Laboratorio de Parasitoides para el Control del Picudo de los Cítricos ubicado en la finca citrícola “La Indiana” (Chinchiná - Caldas). Estos insectos fueron alimentados con hojas de cítricos hasta el momento de su disección.

**Disección.** Para la extracción del sistema digestivo y reproductor se disecaron 12 hembras de *Compsus* sp. en cajas de petri, a las cuales se les adicionó 10ml de solución Ringer, pH 7,0 (Martínez 2000).

La disección de los insectos se inició con el desprendimiento de los élitros y alas posteriores, procediendo a separar las placas dorsales y ventrales del meso y metatórax, así como los tergitos y esternitos abdominales, dejando expuesta la zona comprendida desde el proventrículo hasta el ano, a continuación se apartó el sistema reproductor del digestivo, extrayendo primero el tejido graso que recubre esta zona. La región anterior del estomodeo se extrajo seccionando el protórax y la cabeza, retirando todas las placas cuticulares dejando expuestos todos los órganos. Los tejidos se tiñeron con azul de toluidina, para facilitar la diferenciación de los órganos que componen al tracto digestivo y sistema reproductor. Luego se midieron con un estereoscopio Zeiss Stemi 2000, equipado con reglilla micrométrica. Todos los órganos del tracto digestivo y del sistema reproductor fueron fotografiados y medidos para establecer su forma y tamaño, posteriormente se preservaron en glutaraldehído 2% en fosfato buffer pH 7.0.

### Resultados

**Morfología del tracto digestivo de *Compsus* sp.** Las diferentes estructuras del tracto digestivo de *Compsus* sp. se distinguen fácilmente (Fig. 1). El largo del tracto digestivo supera en tres veces el tamaño de la hembra adulta (Tabla 1). El estomodeo ocupa el 20% de todo el sistema mientras que el mesenterón y el proctodeo representan alrededor del 40% cada uno. El estomodeo inicia con la cavidad bucal, seguido de la faringe, el esófago y el buche (Figs. 2A y 2B). En el epitelio interno del buche, se observa una gran cantidad de proyecciones espinosas, con función desconocida (Fig. 2C); seguido al buche se encuentra el proventrículo (Fig. 2D), siendo esta una dilatación definida y diferenciada entre el buche y el cardias. El proventrículo de forma bulbosa, es la estructura más rígida del tracto digestivo; en dirección longitudinal se registran ocho aristas esclerotizadas, donde convergen gruesas bandas de músculos circulares que rodean toda la estructura (Fig. 2D).

Las ocho aristas están formadas por proyecciones cuticulares o cerdas gruesas de diversos tamaños, dando la apariencia de cepillos que se insertan en todo el lumen del proventrículo (Fig. 2E). A continuación del proventrículo se observa la válvula cardíaca o cárdias (Fig. 2F), de poca longitud y representada por una acentuada constricción.

Posterior al cárdias se encuentra el mesenterón, esta sección del canal alimentario está compuesta por dos partes, el ventrículo anterior y el ventrículo posterior (Fig. 3A). Ambos ventrículos presentan diferentes longitudes (Tabla 1) y el diámetro del ventrículo posterior se reduce en un tercio. El ventrículo anterior es ovoide, liso y está dividido en sacos o bolsas de tamaño medio (Fig. 3B). El ventrículo posterior presenta un tamaño superior al ventrículo anterior, del que se proyectan numerosos ciegos gástricos mediales dispuestos irregularmente (Fig. 3C). Tanto el ventrículo anterior como el posterior se encuentran rodeados de una gran cantidad de papilas.

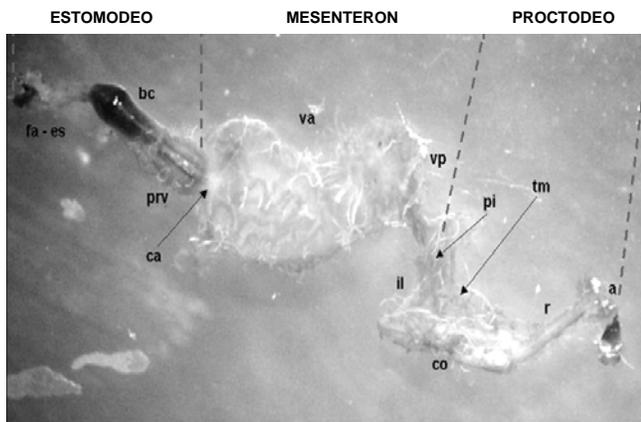
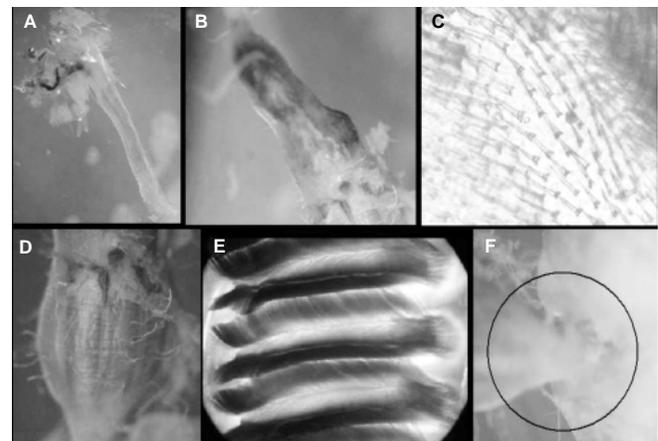
El proctodeo se encuentra separado del mesenterón por la válvula pilórica ó píloro de la cual nacen seis túbulos de Malpighi. Estos túbulos son largos y rodean todo el mesenterón y proctodeo, éstos corresponden al Tipo II según Calder (1989), los cuales se proyectan en dos grupos: el primero en posición dorsal con respecto al píloro, del cual nacen cuatro túbulos que desembocan en la parte anterior del recto; el segundo grupo solo contiene dos túbulos más angostos que inician en la región ventral del píloro y desembocan en la parte media del colon (Fig. 4A). Seguido al píloro se presenta el íleon siendo ésta la porción más larga del proctodeo (Fig. 4B). Posterior al íleon se encuentra el colon que es la región del proctodeo de mayor diámetro (Fig. 4B). Tanto en el íleon como en el colon se pueden observar una gran cantidad de excretas (Fig. 4C), que se van depositando en el recto para su eliminación. El recto es la última sección del proctodeo la cual termina en el ano (Fig. 4B).

**Morfología del sistema reproductor femenino de *Compsus* sp.** La longitud del sistema reproductor femenino de *Compsus* sp. supera aproximadamente en 1,5 veces la del insecto (Tabla 2). Este sistema se compone de dos ovarios cada uno con dos ovariolas de forma semicónica (Fig. 5). Cada ovario desemboca en un cáliz (Fig. 6A). En la región distal del cáliz se encuentra adherido el oviducto lateral, siendo éste muy corto y terminando en el oviducto común (Fig. 6B) y en el canal vaginal el cual está protegido por un par de placas esclerosadas (Fig. 6C). En la región anterior del canal vaginal, se observan los órganos accesorios, compuestos de la espermateca y la glándula accesoria. La espermateca es un ducto en forma de “C” muy esclerosado en cuya región anterior se encuentra adosada una glándula accesoria de tonalidad hialina y sacciforme (Fig. 6D).

Los ovarios se encuentran divididos en tres regiones: el filamento terminal, ubicado en la región distal de la ovariola y es una prolongación de la capa peritoneal para mantener unidas las ovariolas. Entre el proctodeo y los ovarios se observan una gran cantidad de cuerpos grasos. Seguido al filamento terminal se encuentra el gemario (Fig. 6E) el cual contiene los oogonios, no distinguiéndose en esta zona estructuras específicas sino una gran cantidad de células circulares, y en la región basal de la ovariola se presenta el vitelario (Fig. 6F), observándose muy bien el epitelio folicular diferenciándose de la pared de la ovariola. Los oocitos son ovoides y aumentan su tamaño rápidamente cuando pasan del gemario al vitelario. Las cuatro ovariolas que presenta *Compsus* sp. tienen en promedio 15 oocitos maduros en cada una.

**Tabla 1.** Tamaño (mm)  $\pm$  error estándar (EE) de los diferentes órganos componentes del tracto digestivo del picudo de los cítricos *Compsus* sp.

	Ancho (mm) promedio $\pm$ EE	Largo (mm) promedio $\pm$ EE
<b>ESTOMODEO</b>		<b>7,740 <math>\pm</math> 0,406</b>
Esófago y Faringe	0,416 $\pm$ 0,030	2,482 $\pm$ 0,070
Buche	1,009 $\pm$ 0,105	2,825 $\pm$ 0,201
Proventrículo	1,458 $\pm$ 0,045	2,048 $\pm$ 0,117
Cardias	—	0,384 $\pm$ 0,016
<b>MESENERÓN</b>		<b>13,842 <math>\pm</math> 0,811</b>
Ventrículo anterior	3,417 $\pm$ 0,179	5,100 $\pm$ 0,272
Ventrículo posterior	0,863 $\pm$ 0,041	8,741 $\pm$ 0,539
<b>PROCTODEO</b>		<b>13,441 <math>\pm</math> 0,829</b>
Íleon	0,550 $\pm$ 0,056	6,116 $\pm$ 0,324
Colon	1,108 $\pm$ 0,071	4,940 $\pm$ 0,237
Recto	0,866 $\pm$ 0,114	2,384 $\pm$ 0,267
<b>HEMBRA ADULTA</b>		<b>13,8 <math>\pm</math> 1,016</b>

**Figura 1.** Vista general del tracto digestivo de *Compsus* sp. (fa) faringe, (es) esófago, (bc) buche, (prv) proventrículo, (ca) cárdias, (va) ventrículo anterior, (vp) ventrículo posterior, (pi) píloro, (il) íleon, (tm) túbulos de Malpighi, (co) colon, (r) recto, (a) ano.**Figura 2.** Regiones del estomodeo de *Compsus* sp. **A.** vista lateral de la faringe y el esófago. **B.** vista lateral del buche. **C.** vista de la pared interna del buche. **D.** vista general del proventrículo. **E.** vista general de los filamentos internos del proventrículo. **F.** vista lateral del cárdias (en el círculo).

Los huevos al salir del vitelario son depositados en el cáliz en el cual puede almacenar en promedio 23 huevos, para luego pasar del oviducto lateral y al oviducto común para ser fertilizados y expulsados. El oviducto común y la vagina presentan un notable sistema muscular lo que podría contribuir al movimiento de los huevos para su expulsión al exterior.

### Discusión

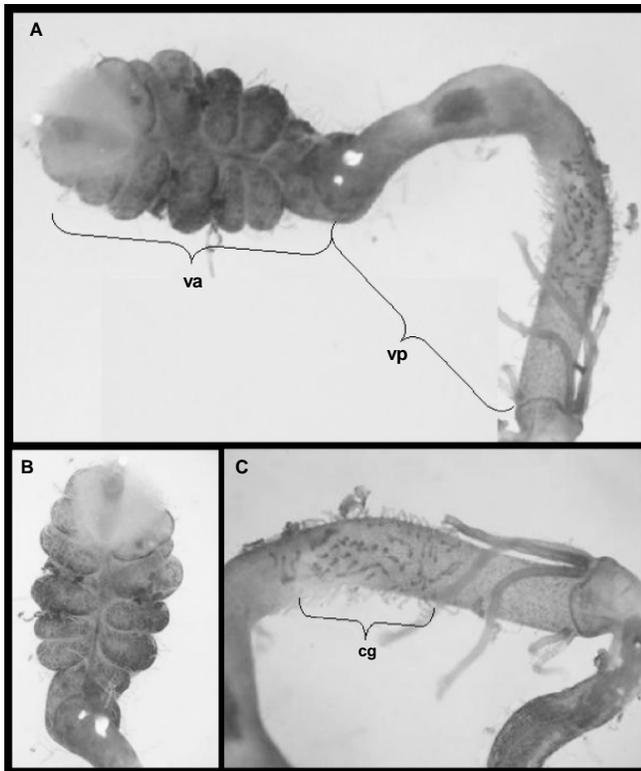
Este trabajo describe la morfología del tracto digestivo y del sistema reproductor femenino de *Compsus* sp. plaga importante en cultivos de cítricos en Colombia. En general el tracto digestivo de *Compsus* n. sp. es similar a lo descrito por Calder (1989), en cuanto a las proporciones del estomodeo, mesenterón y proctodeo de otros escarabajos de la familia Curculionidae. Pero en relación a las proporciones de la subfamilia Entiminae el mesenterón de *Compsus* sp. es más

**Tabla 2.** Tamaño (mm)  $\pm$  error estándar (EE) de los órganos del sistema reproductor de *Compsus* sp.

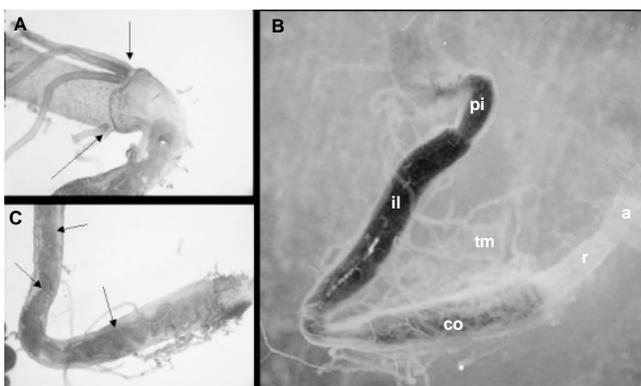
Órganos	Promedio ancho $\pm$ EE	Promedio largo $\pm$ EE
<b>Sistema Reproductor</b>	—	20,965 $\pm$ 0,909
<b>Gemario</b>	—	4,450 $\pm$ 0,271
<b>Vitelario</b>	—	9,829 $\pm$ 0,635
<b>Cáliz</b>	3,365 $\pm$ 0,101	2,883 $\pm$ 0,136
<b>Oviducto Lateral</b>	—	0,366 $\pm$ 0,021
<b>Oviducto Común</b>	—	4,233 $\pm$ 0,152
<b>Espermateca</b>	—	0,399 $\pm$ 0,025
<b>Oocitos Maduros</b>	0,416 $\pm$ 0,022	1,250 $\pm$ 0,042

largo que lo reportado por Calder en el mismo trabajo. Calder señala que éste fue del 5 al 15% mientras que todo el mesenterón de *Compsus* ocupa el 22%.

El buche es una sección alargada del esófago, internamente presenta unas proyecciones espinosas, las cuales Calder (1989) reporta en la tribu Mecysolobini (Molytinae), pero no hace referencia de éstas en la tribu Entiminae. El proventrículo internamente se compone de ocho placas esclerosadas, formadas por proyecciones cuticulares, presentando similitud a reportado por Calder (1989) para esta subfamilia.

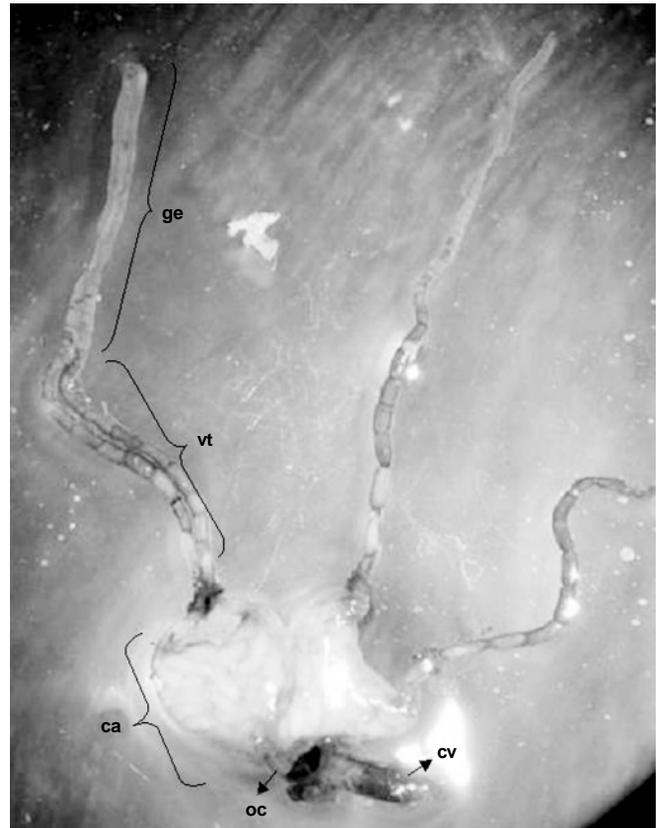


**Figura 3.** Mesenterón de *Compsus* sp. **A.** vista general del mesenterón (va) ventrículo anterior; (vp) ventrículo posterior. **B.** vista ventral del ventrículo anterior. **C.** vista lateral del ventrículo posterior con los ciegos gástricos (cg).

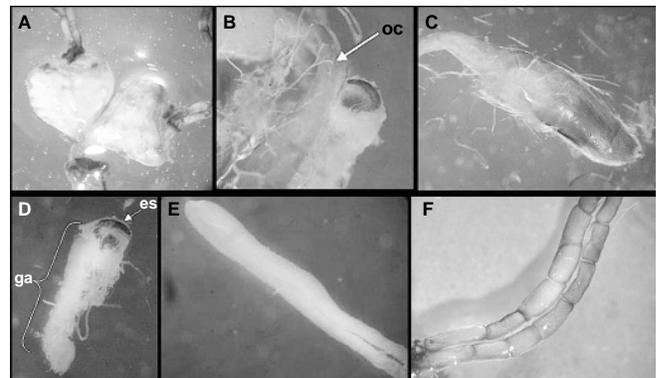


**Figura 4.** Proctodeo de *Compsus* sp. **A.** vista general del píloro y de los costados donde nacen los túbulos de Malpighi (señalado con flechas). **B.** vista general del proctodeo (pi) píloro, (il) íleon, (tm) túbulos de Malpighi, (co) colon, (r) recto, (a) ano. **C.** vista lateral del íleon y colon, nótese la gran cantidad de excretas en esta región (flechas).

El mesenterón se encuentra dividido en el ventrículo anterior y posterior, común en otros escarabajos descritos de la familia Curculionidae (Wigglesworth 1950; Crowson 1981; Calder, 1989; Macgown y Sikorowski 1981). La forma del ventrículo anterior y del posterior presentan características similares a *Essolithna* sp. (Calder 1989) con bolsas de tamaño medio en el ventrículo anterior y el ventrículo posterior una disposición similar en los ciegos gástricos.



**Figura 5.** Vista General del sistema reproductor femenino de *Compsus* sp. (ge) gemario, (vt) vitelario, (ca) cáliz, (oc) oviducto común, (cv) canal vaginal.



**Figura 6.** Regiones del sistema reproductor femenino de *Compsus* sp. **A.** vista general del par de cáliz presentes en el sistema reproductor. **B.** vista lateral del oviducto común. **C.** vista general del canal vaginal. **D.** vista lateral de los órganos accesorios (es) espermateca, (ga) glándula accesoria; **E.** vista general del gemario. **F.** Vitelarios con oocitos en proceso de formación.

El número de ovarios presentes en el sistema reproductor de *Compsus* sp. es similar a otros escarabajos pertenecientes a la misma familia (Crowson 1981). La particularidad de presentar este insecto en la región basal de las ovariolas una región especializada en el almacenamiento de los oocitos maduros (cáliz), le da la capacidad de realizar oviposiciones en masa, en los conteos de oocitos alojados en el cáliz, dando un valor promedio de 23 oocitos/cáliz.

### Agradecimientos

A Carlos Alberto Marín - Laboratorio Parasitoides para el Control del Picudo de los Cítricos (Chinchiná - Caldas); al Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafé y a la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

### Literatura Citada

- ARNETT Jr., R. H.; THOMAS, M. C.; SKELLEY, P. E.; FRANK, J. H. (eds.). 2002. American beetles. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. Vol. II. CRC Press, Florida. 861 p.
- CALDER, A. A. 1989. The alimentary canal and nervous system of Curculionoidea (Coleoptera): gross morphology and systematic significance. *Journal of Natural History* 23: 1205-1265.
- CANO, D. M.; SERNA, J.; BUSTILLO, A. E. 2002a. Características anatómicas de una nueva especie de *Compsus* (Coleoptera: Curculionidae) plaga de cítricos en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 28 (1): 33-41.
- CANO, D. M.; CARDENAS, R.; BUSTILLO, A. E.; OROZCO, G. L. 2002b. Biología y enemigos nativos del picudo de los cítricos *Compsus* n. sp. (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología* 28 (1): 43-52.
- CORRALES, G. A. 2002. Manual ilustrado para la producción de cítricos en Colombia. Asocítricos. Produmedios. Bogotá. 167 p.
- CROWSON, R. A. 1981. The biology of the Coleoptera. Londres, Academic Press, Inglaterra. 802 p.
- DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. 1994. Citrus. CAB International. Wallingford. 254 p.
- GUEDES, J. V. C.; LANTERI, A. A.; PARRA, J. R. P. 2005. Key for identification, occurrence and distribution of citrus root weevils in São Paulo and Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Entomology* 34 (4): 577-584.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, ICA. 2002. Manejo del picudo de los Cítricos. *Boletín de Sanidad Vegetal* 33: 1-27.
- MACGOWN, M. W.; SIKOROWSKI, P. P. 1981. Digestive anatomy of the adult boll weevil, *Anthonomus grandis grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America* 74 (1): 117-126.
- MARTÍNEZ, M. I. 2000. Técnicas básicas de anatomía microscópica y de morfometría para estudiar los Insectos. *Aracnet 9 – Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa - S.E.A.* 30: 187-195.
- THOMPSON, R. T. 1992. Observations on the morphology and classification of weevils (Coleoptera: Curculionoidea) with a key to major groups. *Journal of Natural History* 26: 835-891.
- WIGGLESWORTH, V. B. 1950. The principles of insect physiology, E. P. Dutton and Co. New York (Estados Unidos). 544 p.
- WOODRUFF, R. E. 1985. Citrus weevils in Florida and the West Indies. Preliminary report on systematics, biology, and distribution (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist* 68 (3): 370-379.

Recibido: 30-jun-06 • Aceptado: 25-ago-07

## Nota científica

## Distribución geográfica de las abejas del fuego en Colombia (Hymenoptera: Apidae, Meliponini, *Oxytrigona*)

Geographic distribution of the fire bees in Colombia (Hymenoptera: Apidae, Meliponini, *Oxytrigona*)

VÍCTOR H. GONZÁLEZ<sup>1</sup>

Los resultados de la gran mayoría de tesis de pregrado en Colombia raramente son publicados. Esta información, única y valiosa, generalmente se pierde en los armarios de las bibliotecas universitarias o biblioteca del profesor asesor, fallando con el principal objetivo de la ciencia: poner a disposición de la comunidad científica los resultados de una investigación. El propósito de esta nota, además de hacer disponible parte de los resultados de mi tesis de pregrado (González 2000) sobre las abejas *Oxytrigona* (Cockerell, 1917) (Hymenoptera: Apidae, Meliponini), es contribuir al conocimiento de la distribución geográfica de las abejas sociales sin aguijón en Colombia. Información detallada sobre la distribución geográfica para la mayoría de especies de abejas colombianas todavía es fragmentaria. Esto dificulta el entendimiento de patrones biogeográficos o el reconocimiento de áreas de endemismo para un grupo en particular.

Las abejas del género *Oxytrigona* son llamadas “abejas del fuego”, “mionas” o “cagafuego”, porque las obreras tienen glándulas mandibulares que secretan principalmente ácido fórmico para defender sus nidos. Cuando muerden, depositan una gota de esta secreción sobre la piel y dejan una herida similar a una quemadura (Michener 1974; Roubik *et al.* 1987). Actualmente hay ocho especies descritas, las cuales se distribuyen desde el sur de México hasta Brasil (Michener 2000). En Colombia se conocen cinco de las ocho especies y hay al menos dos sin describir (González y Roubik, en prep.). La mayoría de especies están presentes en la región Andina,

considerando las tierras bajas interandinas y zonas montañosas. *Oxytrigona* se encuentra dentro de la franja altitudinal y zonas de vida ocupadas por la mayoría de las especies de meliponinos en Colombia (Nates-Parra 1996), habitando principalmente bosques húmedos tropicales (Tabla 1). *Oxytrigona daemoniaca* (Camargo, 1984) y *O. mellicolor* Packard, 1869 también están presentes en bosques secos tropicales y son las especies más comunes y ampliamente distribuidas del género. El 70% de los especímenes examinados fueron de estas dos especies ( $n = 680$  especímenes, 11 colecciones nacionales y una internacional; detalles en González 2000).

A diferencia de muchas especies del género *Trigona s. l.*, *Oxytrigona* es raramente colectada y por tal razón está pobremente representada en las colecciones entomológicas. Por ejemplo, en muestreos intensivos y sistemáticos en Porce (Antioquia), las abundancias relativas de *O. daemoniaca* y *O. mellicolor* fueron muy bajas (0,3 - 0,6%) en comparación a *Trigona fulviventris* Guérin-Méneville, 1845 (~ 10%), la especie más abundante en ese estudio (Smith-Pardo 1999). Los nidos de *Oxytrigona* también son raramente encontrados. Por ejemplo, Villa y Vergara (1982) registraron cinco nidos (~ 1,7%) de *Oxytrigona* en 303 nidos de meliponinos examinados a bajas altitudes en Cundinamarca. Valores de abundancia similares para *Oxytrigona* también han sido observados en Panamá (Roubik com. pers.).

Al igual que para otros géneros de abejas, la región Andina de Colombia contiene el mayor número de especies de

**Tabla 1.** Distribución geográfica de *Oxytrigona* en Colombia. Región natural: And = Andina; Ama = Amazonía; Atl = Atlántica; Ori = Orinoquía; Pac = Pacífica. Zonas de vida según Espinal (1991): bmh-T= Bosque muy Húmedo Tropical; bmh-ST= Bosque muy Húmedo Subtropical; bh-T= Bosque Húmedo Tropical; bh-ST= Bosque muy Húmedo Subtropical; bs-T= Bosque Seco Tropical; bh/bmh-T = Transición Bosque Húmedo Tropical a Bosque muy Húmedo Tropical.

Especie	Región natural	Zona de vida	Rango altitudinal (m)
<i>O. daemoniaca</i> (Camargo, 1984)	And, Atl, Pac	bmh-T, bmh-ST, bh-T, bh-ST, bs-T	150-1.510
<i>O. flaveola</i> (Friese, 1900)	And, Ori	bmh-ST	175-1.630
<i>O. aff. mediorufa</i> (Cockerell, 1913)	And, Ori	bmh-T, bh-T	467-576
<i>O. mellicolor</i> Packard, 1869	And, Atl, Pac	bmh-T, bmh-ST, bh-T, bh-ST, bs-T, bh/bmh-T	2-1.479
<i>O. mulfordi</i> (Schwarz, 1948)	Ama, Ori	bh/bmh-T	400
<i>Oxytrigona</i> nov. sp. 1	Pac	bh-T	200
<i>Oxytrigona</i> nov. sp. 2	And	bmh-T	576

<sup>1</sup> Department of Ecology and Evolutionary Biology, Haworth Hall, 1200 Sunnyside Avenue, University of Kansas, Lawrence, Kansas 66045-7523, USA. [vhgonza@ku.edu](mailto:vhgonza@ku.edu)

*Oxytrigona* (González y Engel 2004; González *et al.* 2005). Sin embargo, esta aparente riqueza es seguramente un sesgo del muestreo, pues la región Andina es una de las áreas mejor colectadas del país.

### Agradecimientos

A todos los curadores y personas encargadas de las colecciones entomológicas e instituciones visitadas; a G. Nates Parra del Laboratorio de Abejas, Universidad Nacional de Colombia, por su apoyo y sugerencias a lo largo de este trabajo; a E. Palacios y dos evaluadores anónimos por los comentarios y sugerencias a esta nota.

### Literatura Citada

- ESPINAL, L. S. 1991. Apuntes ecológicos. Universidad Nacional de Colombia, Seccional Medellín. 152 p.
- GONZÁLEZ, V. G. 2000. El género *Oxytrigona* en Colombia (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). Tesis de pregrado. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 70 p.
- GONZÁLEZ, V. H.; ENGEL, M. S. 2004. The Tropical Andean bee fauna (Insecta: Hymenoptera: Apoidea), with examples from Colombia. *Entomologische Abhandlungen* 62 (1): 65-75.
- GONZÁLEZ, V. H.; OSPINA, M.; BENNETT, D. 2005. Abejas altoandinas de Colombia: Guía de campo. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, D.C., Colombia. 80 p.
- MICHENER, C. D. 1974. *The Social Behaviour of the Bees: A Comparative Study*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 404 p.
- MICHENER, C. D. 2000. *The Bees of the World*. Johns Hopkins University Press; Baltimore, MD. 913 p.
- NATES-PARRA, G. 1996. Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponinae) de Colombia, pp. 181-268. En: Amat, G.; Andrade, G.; Fernández, F. (eds.). *Insectos de Colombia: Estudios Escogidos*. Universidad Javeriana y Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Bogotá. Colombia. 541 p.
- ROUBIK, D. W.; SMITH, B. H.; CARLSON R. G. 1987. Formic acid in caustic cephalic secretions of stingless bee, *Oxytrigona* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Chemical Ecology* 13 (5): 1079-1086.
- SMITH-PARDO, A. H. 1999. Abejas (Hymenoptera: Apoidea) de la zona de influencia del embalse Porce II (Antioquia, Colombia). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 390 p.
- VILLA, A. L.; VERGARA, C. B. 1982. Contribución al estudio de los hábitos de nidificación de algunas especies de abejas nativas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae). *Scientiae* 1 (2): 147-163.

Recibido: 15-dic-2005 • Aceptado: 7-jul-2007

## Nota científica

## ***Digitonthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae): distribución en América y dos nuevos registros para Colombia**

*Digitonthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae): distribution in America and two new records for Colombia

CAROLINA RIVERA<sup>1</sup> y MARTA WOLFF<sup>2</sup>

**Resumen:** Se hace una revisión de literatura acerca del área de distribución de la especie Indo-africana *Digitonthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae) a partir de su introducción en 1972 en Norteamérica, hasta este momento. Su rango de dispersión ha alcanzado la colonización casi completa de Centroamérica y parte de Suramérica. Además se registran individuos de esta especie en dos nuevas localidades de intenso uso ganadero en la región Caribe de Colombia.

**Palabras clave:** Coleópteros coprófagos. Dispersión. Introducción. Especies invasivas.

**Abstract:** A literature review is made on the area of distribution of the Indo-African species *Digitonthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae) since its introduction in 1972 in North America until the present. Its range of dispersion has reached the almost complete colonization of Central America and part of South America. Individuals of this species are also recorded at two new localities of intense cattle ranching in the Caribbean region of Colombia.

**Key words:** Dung beetle. Dispersion. Introduction. Invasive species

### Introducción

La especie *Digitonthophagus gazella* (Fabricius, 1787) cuya distribución original conocida era África y Asia, se introdujo en Australia en 1968 y en 1972 de manera experimental en Estados Unidos (Blume y Aga 1978; Fincher *et al.* 1983) como complemento de la fauna nativa de coleópteros coprófagos, para un más rápido y eficiente reciclaje de estiércol de los pastos y como control biológico de las poblaciones de dípteros y helmintos gastrointestinales que no hacen nidos pero se desarrollan en las masas de excremento y afectan negativamente animales de pastoreo y humanos (Cambefort 1991; Kohlmann 1991; Blume y Aga 1978; Doube *et al.* 1991); subsecuentemente, esta especie se liberó en otras regiones como la isla de Grenada, Uruguay, Chile continental e insular (Isla de Pascua), (Kohlmann 1994; Noriega *et al.* 2006) Brasil (Costa-Júnior *et al.* 2002) y de manera no oficial en territorio Venezolano (Noriega *et al.* 2006).

*Digitonthophagus gazella* tiene una poderosa capacidad para dispersarse, esto se hace evidente si se examina su historia de distribución en América. La liberación inicial de la especie se realizó en Abril de 1972 en el Condado Victoria, Texas y en Julio del mismo año se introdujo en el Condado Kleberg al sur del mismo Estado aproximadamente 5.000 individuos (Blume y Aga 1978; Fincher *et al.* 1983), los cuales a finales de 1973 ya se encontraban aproximadamente a 16 km del punto de liberación inicial y durante 1974 habían avanzado otros 32 km (Blume y Aga 1978). Para octubre de 1976 se encontraba en 18 condados del sur de Texas comprendiendo cerca de 4'250.000 ha (Blume y Aga 1978). Entre 1975 y 1979, se realizaron liberaciones experimentales en varias localidades de California (Blume y Aga 1978), Georgia, Arkansas y Mississippi (Fincher *et al.* 1983); otras liberaciones se reali-

zaron en otros tres condados del norte de Texas entre 1973 y 1975 (Fincher *et al.* 1983).

En México la expansión de la especie se inició desde el Norte y en 1981 se efectuaron los primeros registros en los estados de Nuevo León y Tamaulipas (Kohlmann 1994; Lago *et al.* 1984) posteriormente en 1982 en Piedras Negras, Coahuila (Fincher *et al.* 1983) y en 1984 alrededor de La Mesa, Chihuahua, en San Ignacio, Durango y para este mismo año se halló al sur del país en Palma Sola, Veracruz. El primer reconocimiento de esta especie en la vertiente pacífica mexicana se obtuvo en 1983 en Manzanillo, Colima (Kohlmann 1994). Entre 1984 y 1986, se hicieron otros hallazgos en la región Pacífica, en Chamela y cerca de la localidad de José María Morelos, ambos en el estado de Jalisco (Morón *et al.* 1988); en 1986, se encontró en el Océano Pacífico Mexicano en las Islas Marías, Nayarit exactamente en la Isla María Madre y en la isla María Magdalena (Kohlmann 1994). En 1987 se colectó a lo largo de la costa pacífica en Zihuatanejo, Guerrero y en el centro de México en la capital del Estado de San Luís Potosí; y este mismo año en Sayaxché, Petén en Guatemala, aparentemente cruzando todo México a lo largo de la costa Atlántica en aproximadamente siete años; con estos datos Kohlmann (1994) estimó el tiempo de expansión para la especie en 103 km/año.

En el periodo entre 1988-1990 se registró en Zenzontla, La Calera, Autlán, el Grullo y El Limón poblaciones del Estado de Jalisco (Rivera-Cervantes y García-Real 1991), en 1989 se recolectó en el pacífico en Puerto Ángel, Oaxaca y un tanto tardío con relación al registro hecho en Guatemala, se encontró en las localidades de la "Estación Biológica Los Tuxtlas" y San Andrés Tuxtla ambos en Veracruz y en Palenque, Chiapas (Kohlmann 1994). En el año 1991 la especie se halló en tres

<sup>1</sup> Bióloga. Laboratorio de Colecciones Entomológicas-GIEM. Universidad de Antioquia. A.A. 1226 Medellín-Colombia. [carolinariveraalvarez@yahoo.com](mailto:carolinariveraalvarez@yahoo.com)

<sup>2</sup> Bióloga, Ph. D. Directora, Laboratorio de Colecciones Entomológicas-GIEM. Profesora, Instituto de Biología. Universidad de Antioquia. A. A. 1226 Medellín-Colombia. [mwolff@matematicas.udea.edu.co](mailto:mwolff@matematicas.udea.edu.co)

municipios al suroeste del Estado de Chiapas y para el 2000 nuevos reportes en cinco municipios del centro y oeste del mismo Estado (Morales *et al.* 2004).

Los registros de 1990 son para Tuzamapán-Veracruz, que muestran una incursión cerca de la Sierra Madre Oriental (Kohlmann 1994). En este mismo año, se recolectó a 116 km al sur de la misma costa Atlántica en la carretera entre Tuxtepec y Palomar, Oaxaca. Para 1991 se encontró en la localidad de San Blas, Nayarit (Kohlmann 1994).

En 1995 *D. gazella* se colectó por primera vez en territorio Colombiano durante un estudio rápido en la Isla de San Andrés, cercana a Nicaragua (Noriega 2002); mientras que un estudio más profundo realizado en 1998 en el mismo sitio se confirmó el establecimiento en tierras insulares colombianas (Noriega 2002). En 1996 la especie se registró para Nicaragua, aparentemente llegó cruzando todo México y Guatemala, curiosamente se encontró en zona selvática sobre el Río Wasbuk, en la Reserva Natural Bosawas, donde no existe actividad ganadera (Maes *et al.* 1997).

Hacia 1997, aparecen nuevos registros de *D. gazella* en México en Sierra de la Laguna, Baja California, Yepáchic y Cuauhtémoc, Chihuahua y Yécora, Sonora (Montes de Oca y Halfpter 1997). En el estado de Chihuahua cerca de Basaseachic se encontró a 1920 msnm, la altitud más elevada a la cual se ha recolectado la especie (Montes de Oca y Halfpter 1997). En 1998 se registró en el Estado de Puebla, México a 600 msnm, siendo el primer reconocimiento en montañas húmedas (Carrillo-Ruiz y Morón 2003).

En el 2004 la especie se reportó en zona continental de Colombia en la parte Norte en los departamentos de: Atlántico (Galapa y Juan Acosta), Bolívar (Cicuco, Magangué, Mompo, Cartagena e Isla de Tierra Bomba), Guajira (Valle del Cerrejón), Cesar (La Jagua de Ibirico) y Magdalena (Vertiente Noroccidental del PNN Sierra Nevada de Santa Marta y Santa Marta), y en la parte Oriental de Casanare (Paz de Ariporo) y Vichada (Cumaribo) (Noriega *et al.* 2006) (Fig. 1).

El objetivo de este trabajo es recopilar y registrar información acerca del avance y la actual distribución de *D. gazella* en Centro y Suramérica a partir de su introducción en EE.UU.

### Métodos

Se recolectaron muestras en dos localidades en los departamentos de Atlántico y Bolívar de la zona Caribe de Colombia entre los 0 y los 300 msnm entre agosto de 2005 y febrero de 2006 como parte del proyecto "Zoocria de coleópteros coprófagos de Colombia" financiado por Fort Dodge laboratorios Wyeth división Animal Health. Las recolecciones se realizaron por personas de la zona, a quienes se les enseñó la metodología de muestreo, en potreros destinados a la ganadería mediante trampas de caída (pitfall) cebadas con excremento de vaca (boñiga fresca) para la captura de individuos vivos. Se establecieron tres transectos de 120 m cada uno, donde se distribuyeron cuatro trampas separadas 30 m entre sí. Las trampas en cada sitio se revisaron y recibieron cada 24 horas durante tres días. Los individuos se almacenaron en recipientes con boñiga, se rotularon con datos de localidad de la colecta y se enviaron al laboratorio de colecciones entomológicas de la Universidad de Antioquia (CEUA) para el análisis y separación de las muestras.

### Resultados

En el 2005 en Sabanalarga, Atlántico, se recolectaron 318 individuos; 12 en agosto y 306 en septiembre, mientras que en febrero de 2006 en Magangué, Bolívar se obtuvieron 96 ejemplares. Todos los especímenes recolectados se revisaron e identificaron y 30 de ellos se depositaron en CEUA.

**Material examinado.** *D. gazella*. 3 ♀, 4 ♂-COLOMBIA. Atlántico. Sabanalarga. Corregimiento Molinero. Fca. Carreto. Potrero, Pitfall boñiga. Ago 2005. J. Oliveiros. [CEUA]. 4 ♀, 7 ♂ Atlántico. Sabanalarga. Corregimiento Molinero. Fca. Carreto. Potrero, Pitfall boñiga. Sep 2005. J. Oliveiros. [CEUA]. 8 ♀, 4 ♂ Bolívar. Magangué. Fca. Gallinazo. Potrero, Pitfall boñiga. Feb 2006. E. Serpa. [CEUA].

### Discusión

De las especies de coleópteros coprófagos que se han estudiado, *D. gazella* es una de las más exitosas y eficientes debido a que cada hembra puede producir aproximadamente 100 descendientes durante su vida (Blume y Aga 1978), aunado a una sorprendente tasa de dispersión de 50 a 130 km/año (Hanski y Cambefort 1991). Los mayores desplazamientos han sido observados en especies introducidas en áreas donde no ocurrían originalmente (Hanski y Cambefort 1991); siendo ésta una especie originaria de las sabanas de África (Cambefort 1991), se establece fácilmente en zonas bajas con poco o ningún tipo de vegetación, altas temperaturas y algunos periodos de lluvia al año, como se evidencia por la distribución de la especie entre los Estados Unidos y Colombia. El tamaño de una población de *D. gazella* es dependiente de condiciones climáticas y edáficas, prefiriendo pastos abiertos en suelos arenosos (Blume y Aga 1978), logrando establecerse fácilmente en las sabanas continentales de Colombia.

Pese a que se desconoce la vía de acceso de *D. gazella* al país, es posible pensar que la especie haya logrado colonizar primero la región norte de Colombia, debido a que las condiciones necesarias para su sobrevivencia son óptimas en los valles secos de esta parte del país. Teniendo en cuenta que su historia en el continente se inició con la introducción en Norteamérica y posteriores eventos de dispersión, su distribución conocida actualmente es más o menos continua y por su gran capacidad de desplazamiento y colonización, se cree que la ausencia de registros podría ser efecto de la falta de muestreo en muchas regiones.

### Agradecimientos

Agradecemos por la financiación de este proyecto a la compañía Fort Dodge laboratorios Wyeth división Animal Health, en especial a los señores: Guillermo García, Jorge Campuzano y Andrés Gutiérrez quienes facilitaron en gran medida el desarrollo de este trabajo.

### Literatura Citada

- BLUME, R. R.; AGA, A. 1978. *Onthophagus gazella*: Progress of experimental releases in South Texas. Folia Entomológica Mexicana 39-40: 190-191.
- CAMBEFORT, Y. 1991. Dung Beetles in Tropical Savannas, pp. 156-178. En: Hanski I.; Cambefort, Y. (eds.). Dung Beetle Ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 481 p.

- CARRILLO-RUIZ, H.; MORÓN, M. A. 2003. Fauna de Coleoptera Scarabaeoidea de Cuetzalan del Progreso, Puebla, México. Acta Zoológica Mexicana (n.s.) 88: 87-121.
- COSTA-JUNIOR, L. M.; KOLLER, W. W.; GOMES, A.; FERREIRA, W. L.; RODRÍGUEZ, S. R.; VAZ-DE-MELLO, F. Z. 2002. Coleópteros coprófagos capturados através de aArmadilhas "Pitfall" na Ilha São Luis, MA, Brasil. Datos Preliminares. En: Congreso Brasileiro de Parasitologia Veterinaria, 12, Rio de Janeiro, 2002. Programas y Resúmenes, Rio de Janeiro. EMBRAPA.
- DOUBE, B. M.; MACQUEEN, A.; RIDSDILL-SMITH, T. J.; WEIR, T. A. 1991. Native and Introduced Dung Beetles in Australia, pp. 255-278. En: Hanski, I.; Cambefort, Y. (eds.). Dung Beetle Ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 481 p.
- FINCHER, G. T.; STEWART, T. B.; HUNTER III, J. S. 1983. The 1981 Distribution of *Onthophagus gazella* Fabricius from releases in Texas and *Onthophagus taurus* Schreber from an unknown release in Florida (Coleoptera: Scarabaeidae). Coleopterists Bulletin 37: 159-163.
- HANSKI, I.; CAMBEFORT, Y. 1991. Spatial Processes, pp. 283-304. En: Hanski, I.; Cambefort, Y. (eds.). Dung Beetle Ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 481 p.
- KOHLMANN, B. 1991. Dung Beetles in Subtropical North America, pp. 116-132. En: Hanski, I.; Cambefort, Y. (eds.). Dung Beetle Ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 481 p.
- KOHLMANN, B. 1994. A preliminary Study of the Invasion and Dispersal of *Digitonthophagus gazella* (Fabricius, 1787) in Mexico (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). Acta Zoológica Mexicana (n.s.) 61: 35-42.
- LAGO, P. K.; MACDONALD, J. R.; CROSS, W. H. 1984. Mexican records for *Onthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae). Coleopterists Bulletin 38: 214.
- MAES, J. M.; RATCLIFFE, B. C.; JAMESON, M. L. 1997. Fauna entomológica de la Reserva Natural Bosawas, Nicaragua. XI. Escarabajos (Coleoptera: Scarabaeidae) nuevos para la fauna de Nicaragua. Revista Nicaragiense de Entomología 39: 41-45.
- MONTES DE OCA, E.; HALFFTER, G. 1997. Invasion of México by two dung beetles previously introduced into the United States. Studies on Neotropical Fauna and Environment 34: 1 - 9.
- MORALES, C. J.; RUIZ NAJÉRA, R.; DELGADO, L. 2004. Primer Registro de *Euoniticellus intermedius* (Reiche, 1849) y Datos Nuevos de Distribución de *Digitonthophagus gazella* (Fabricius, 1787) (Coleoptera: Scarabaeidae) e *Hybosorus illigeri* Reiche, 1853 (Coleoptera: Hybosoridae) para el Estado de Chiapas. Dugesiana 11 (2): 21-23.
- MORÓN, M. A.; DELOYA, C.; DELGADO-CASTILLO, L. 1988. Fauna de coleópteros Melolonthidae, Scarabaeidae y Trogidae de la Región de Chamela, Jalisco, México. Folia Entomológica Mexicana 77: 313-378.
- NORIEGA, J. A. 2002. First report of the presence of the genus *Digitonthophagus* (Coleoptera: Scarabaeidae) in Colombia. Caldasia 24 (1): 213-215.
- NORIEGA, J. A.; SOLIS, C.; QUINTERO, I.; PEREZ, L. G.; GARCIA, H. G.; OSPINO, D. A. 2006. Registro continental de *Digitonthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Colombia. Caldasia 28 (2): 379 -381.
- RIVERA-CERVANTES, L. E.; GARCÍA-REAL, E. 1991. New locality records for *Onthophagus gazella* Fabricius (Coleoptera: Scarabaeidae) in Jalisco, México. Coleopterists Bulletin 45: 370.

Recibido: 12-ene-2007 • Aceptado: 27-oct-2007

## Nota científica

## Nuevos registros de hormigas del Caribe Colombiano, incluyendo claves taxonómicas para *Acanthoponera*, *Heteroponera* y *Platythyrea*

New records of ants of the Colombian Caribbean, including taxonomic keys for *Acanthoponera*, *Heteroponera* and *Platythyrea*

ROBERTO J. GUERRERO-F.<sup>1,2</sup> y DEIVER Y. OLIVERO-G.<sup>3</sup>

**Resumen:** Se registran por primera vez cuatro especies de hormigas poneromorfas para el Caribe Colombiano, *Platythyrea pilosula*, *Platythyrea prizo*, *Acanthoponera mucronata* y *Heteroponera angulata*, esta última nuevo registro para Colombia. Además, se presenta una clave para las especies de Heteroponerinae y otra para las especies del género *Platythyrea* (Ponerinae) en Colombia.

**Palabras clave:** Hormigas cazadoras. Sierra Nevada de Santa Marta. Colombia

**Abstract:** Four species of poneromorpha ants are registered for the first time for the Colombian Caribbean, *Platythyrea pilosula*, *Platythyrea prizo*, *Acanthoponera mucronata*, and *Heteroponera angulata*. The latter is a new record for Colombia. Keys to the Colombian Heteroponerinae species as well as keys to the Colombian species of the *Platythyrea* (Ponerinae) are given.

**Key words:** Hunting ants. Sierra Nevada de Santa Marta. Colombia.

### Introducción

Dentro de las hormigas se encuentran varios grupos de depredadoras por excelencia como las subfamilias Amblyoponinae, Ectatomminae, Heteroponerinae, Paraponerinae, Ponerinae y Proceratinae (Bolton 2003; Brady *et al.* 2006). Estas hormigas viven en pequeñas colonias con decenas o cientos de obreras, sus nidos son muy frecuentes en madera descompuesta sobre el suelo o en la hojarasca; la mayoría de las especies buscan su alimento solitariamente, pero se puede encontrar esporádicamente el comportamiento grupal de caza (Hölldobler y Wilson 1990; Longino y Hanson 1995), este tipo de comportamiento así como caracteres morfológicos han permitido que sean catalogadas como grupos primitivos (basales) dentro de las hormigas (Fernández 2003).

Actualmente se han descrito 424 especies para el Neotrópico, representando aproximadamente el 14% de todas las especies de hormigas neotropicales (Fernández y Sendoya 2004). En Colombia existen aproximadamente 200 especies de hormigas cazadoras de las subfamilias Amblyoponinae, Ectatomminae, Heteroponerinae, Paraponerinae, Ponerinae y Proceratiinae (Fernández 2003); la posición geográfica y la gran diversidad de ecosistemas, favorecen esta gran riqueza permitiendo posicionar a Colombia como una de las zonas más ricas en hormigas del Neotrópico (Brown 1991). Al presente el Instituto Humboldt (IAvH) de Colombia, adelanta la propuesta editorial "*Hormigas Cazadoras de Colombia*" cuyo objetivo es fortalecer y enriquecer el conocimiento de la fauna de este grupo de hormigas en el país (Fernández com. pers.); y por otro lado el Grupo de Investigación en Insectos Neotropicales de la Universidad del Magdalena viene adelantando el proyecto "*Insectos de la Sierra Nevada de Santa*

*Marta*" como estrategia para conocer la diversidad de insectos de este complejo montañoso y en general la diversidad de los insectos del Caribe colombiano. Resultado de estos esfuerzos de captura en diversas temporadas del año se han registrado nuevas especies para la región y para el país. En este trabajo se presentan estos registros con breves notas de campo, y además se ofrecen claves actualizadas para estos grupos.

### Registro de las especies

Subfamilia Heteroponerinae Bolton, 2003

Tribu Heteroponerini Bolton, 2003

*Acanthoponera mucronata* (Roger, 1861)

Material examinado: 1 obrera. COLOMBIA. **Magdalena.** Sierra Nevada de Santa Marta. Vereda Minca. Sector Pozo Azul. Finca La Marta, 74°06'29"W 11°08'17"N. 740m. 1-2-jul-2004. *H. García & D. Ospino leg.* [CEUM]. Colectada en bh-ST mediante trampa de caída con cebo de excremento humano. Primer registro para el Caribe colombiano, se conocía en los departamentos del Amazonas y Meta (Fernández 1993).

*Heteroponera angulata* Borgmeier, 1959

Material examinado: 1 obrera. COLOMBIA. **Magdalena.** Sierra Nevada de Santa Marta. Vereda Minca. Hacienda La Victoria, 74°05'12"W 11°07'14,2"N. 1395 m. 30-abr-2006. *R. Guerrero & D. Olivero leg.* [CEUM]. Colecta manual en bmh-ST. Primer registro para Colombia, sólo se conocía de Brasil (Fernández & Sendoya 2004).

Subfamilia Ponerinae *s.str.*

Tribu Platythyreini Emery, 1901

*Platythyrea pilosula* (Smith F., 1858)

<sup>1</sup> Autor para correspondencia: Biólogo. Grupo de Investigación en Insectos Neotropicales. Instituto de Investigaciones Tropicales. Universidad del Magdalena. Carrera 32 N° 22-08. San Pedro Alejandrino. Santa Marta, Colombia. [rguerrero@unimagdalena.edu.co](mailto:rguerrero@unimagdalena.edu.co)

<sup>2</sup> Colección Entomológica de la Universidad del Magdalena.

<sup>3</sup> Grupo de Investigación en Insectos Neotropicales. Instituto de Investigaciones Tropicales. Universidad del Magdalena. [deiver.olivero@gmail.com](mailto:deiver.olivero@gmail.com)

Material examinado: 3 obreras. COLOMBIA. Cesar. Chiriguana. 73°34'53,2"W 09°20'48,2"N. 120 m. 14-abr-2006. R. Guerrero & A. Mejía leg. [CEUM]. Colecta manual sobre *Enterolobium cyclocarpum* (Mimosoideae), en vegetación de sabana. 1 obrera. COLOMBIA. Magdalena. Sierra Nevada de Santa Marta. Puerto Mosquito. Finca "El Reposo". 74°10'45"W 11°10'23,6"N. 96m. 24-26.feb-2007. D. Olivero & D. Ramírez leg. [CEUM]. 2 obreras. COLOMBIA. Santa Marta. Quinta San Pedro Alejandrino. 74°10'38,2"W 11°13'47,4"N. 30 m. 22-oct-2005. R. Guerrero & S. Rhenals leg. [CEUM]. 4 obreras. COLOMBIA. Santa Marta. Vda. Altos de Palangana. 74°09'11,4"W 11°16'06,5"N. 11 m. 16-18-ene-2007. D. Ramírez leg. [CEUM]. Primer registro para el Caribe Colombiano, se conocía en los departamentos del Amazona y Valle del Cauca (Fernández *et al.* 1996). Colectadas con trampa de caída en bs-T

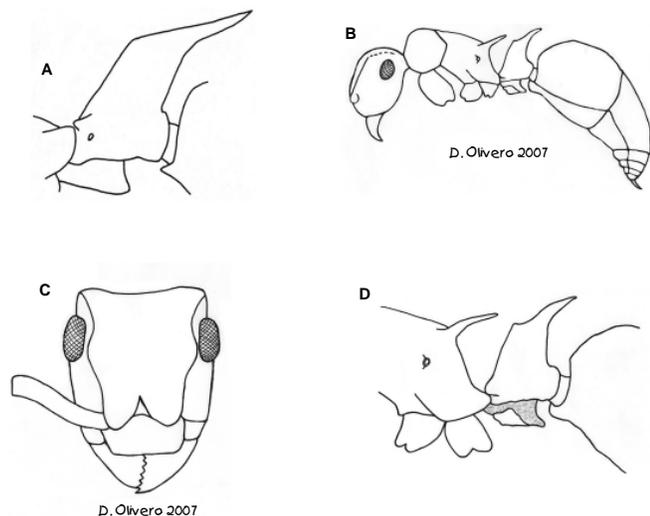
**Platythyrea prizo** Kugler, 1977

Material examinado: 2 obreras. COLOMBIA. Magdalena. Santa Marta. Reserva Natural Kalashe Kalahabia. 74°08'10"W 11°14'18"N. 250 m. 23-24-sep-2006. R. Guerrero & D. Olivero leg. [CEUM]. Primer registro para el Caribe Colombiano, se conocía del departamento del Valle del Cauca (Arias 2003). Colectada con trampa de caída en bs-T.

**Clave para las obreras de *Acanthoponera* (Heteroponerinae) en Colombia**

Modificación de la clave propuesta por Brown (1958).

- 1. Espina propodeal igual o más corta que la longitud máxima del diámetro del ojo; margen dorsal del pecíolo (vista lateral) levemente recto (Fig. 1A); Valle del Cauca ..... ***A. minor***
- Espina propodeal más larga que la longitud máxima del diámetro del ojo; margen dorsal del pecíolo (vista lateral) tiende a ser cóncava anteriormente (Fig. 1B-D); Amazonas, Magdalena, Meta..... ***A. mucronata***

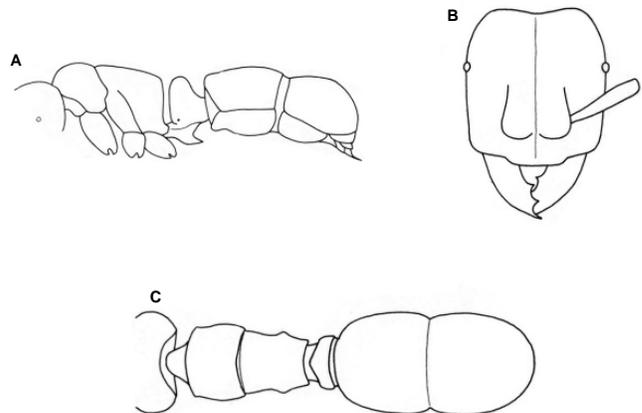


**Figura 1.** *Acanthoponera* spp. **A.** Pecíolo de *A. minor* (Adaptado de Fernández 1993); **B.** Vista lateral, **C.** Cabeza y **D.** Pecíolo de *A. mucronata*.

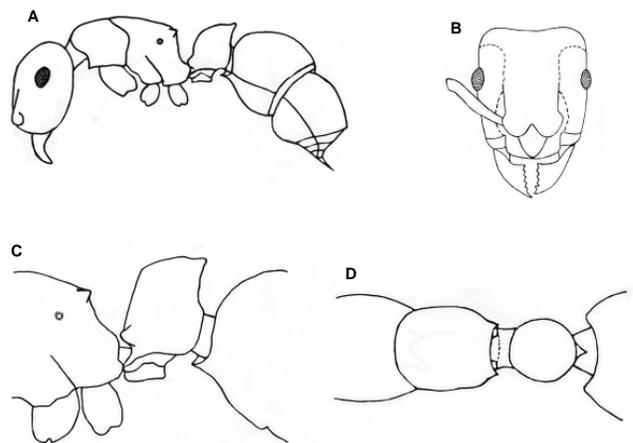
**Clave para las obreras de *Heteroponera* (Heteroponerinae) en Colombia**

Modificación de la clave propuesta por Fernández (1993)

- 1. Ojos pequeños, con unos pocos omatidios (Fig. 2B); propodeo sin dientes (Fig. 2A, C); Antioquia, Tolima ..... ***H. microps***
- Ojos grandes, con más de 20 omatidios; propodeo con dientes **2**
- 2. Espinas propodeales pequeñas o vestigiales (Fig. 3A, C y D); los ángulos occipitales no forman lóbulos (Fig. 3b); Magdalena..... ***H. angulata***
- Espinas propodeales bien desarrolladas y puntiagudas, más largas que el ancho de su base (Fig. 4A); cada ángulo occipital forma un lóbulo notorio ..... **3**
- 3. Cada ángulo occipital forma un lóbulo subtruncado redondeado; escrobas antenales largas, sobrepasando el plano de los ojos (Fig. 4C); Valle del Cauca ..... ***H. inca***
- Cada ángulo occipital forma un lóbulo prominente y agudo; escrobas antenales cortas, sin sobrepasar el plano de los ojos (fig. 4B); Meta, Nariño, Risaralda, Valle del Cauca .... ***H. monticola***



**Figura 2.** *Heteroponera microps*, obrera. **A.** Vista lateral, **B.** Cabeza y **C.** Vista dorsal. (Adaptado de Fernández 1993).



**Figura 3.** *Heteroponera angulata*, obrera. **A.** vista lateral, **B.** cabeza, **C.** Pecíolo en vista lateral y **D.** pecíolo en vista dorsal

### Clave para las obreras de *Platythyrea* (Ponerinae) en Colombia

Modificación de la clave propuesta por Brown (1958).

1. Mandíbulas con el margen masticador edentado (Fig. 5D) ..... 2
  - Mandíbulas con el margen masticador aserrado (Fig. 5A y B); Magdalena, Valle del Cauca ..... *P. prizo*
2. Longitud del pecíolo (vista dorsal) menor a 0,85mm; Amazonas, Bolívar, Caquetá ..... *P. punctata*
  - Longitud del pecíolo (vista dorsal) mayor a 0,85mm (Fig. 5C y D); Amazonas, Magdalena y Valle del Cauca ..... *P. pilosula*

### Consideraciones finales

Aunque la región Andina es la más rica en hormigas del país (Fernández *et al.* 1996), las áreas relictuales de bosque del Caribe pueden estar albergando igual o mayor cantidad de especies de hormigas endémicas o de amplia distribución que están a la espera de ser descubiertas. El nudo de Paramillo, la Serranía del Perijá, las zonas secas de la Guajira, las sabanas del Cesar, la Sierra Nevada de Santa Marta, son algunos pocos ejemplos de sitios que hacen del Caribe colombiano una región con una amplia variedad de hábitats y con ello favoreciendo una gran diversidad de hormigas; a pesar de esto, el esfuerzo de muestreo es poco y se ha concentrado en unas pocas áreas de bosque seco (IAvH 1997) y en esporádicas investigaciones en zonas de montaña (Guerrero-F y Sarmiento-M en preparación), descuidando otras formaciones vegetales con distribución restringida y características especiales tales como los relictos de sabanas y la vegetación xerofítica y subxerofítica.

Tan sólo de la Sierra Nevada de Santa Marta y sus estribaciones se reportan dos de las tres especies de *Platythyrea* presentes en Colombia y una especie de *Heteroponera* conocida únicamente del Brasil, es de considerar que este enclave montañoso así como algunas regiones del Caribe colombiano, posiblemente guardan una fauna de hormigas importante para el inventario nacional de biodiversidad.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Fernando Fernández (ICN) por sus precisos comentarios al manuscrito. A la Universidad del Magdalena por apoyo logístico al Proyecto Insectos de la Sierra Nevada de Santa Marta. Héctor García y Deivis Ospino por la donación de especímenes. Luís Jiménez y Julio Valle (Unimagdalena) por la edición de las figuras. Así mismo, se agradece a dos revisores anónimos por los comentarios dados al manuscrito. Este trabajo hace parte del programa Jóvenes Investigadores de RJGF (Colciencias -Universidad del Magdalena # 122)

### Literatura Citada

- ARIAS, T. 2003. Nuevos registros de especies de hormigas de la subfamilia Ponerinae (Hymenoptera: Formicidae) para Colombia. *Caldasia* 25 (2): 429-431.
- BOLTON, B. 2003. Synopsis and classification of Formicidae. *Memoirs of the American Entomological Institute* 71: 1-370.
- BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R.; FISHER, B. L.; WARD, P. S. 2006. Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 18172-18177.

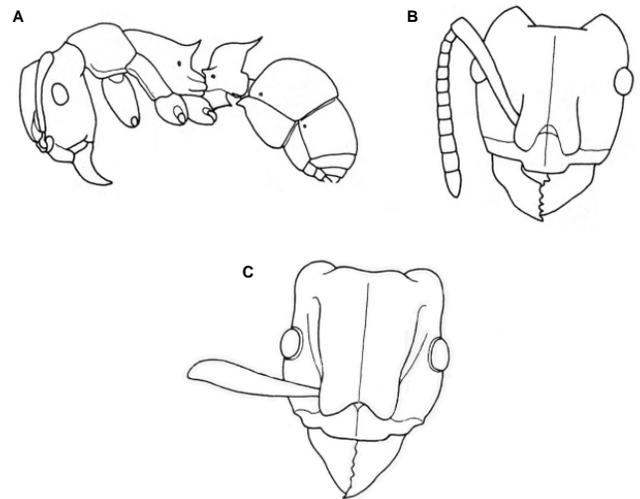


Figura 4. *Heteroponera* spp. A. Vista lateral y B. Cabeza de *H. monticola*; C. Cabeza de *H. inca* (Adaptado de Fernández 1993).

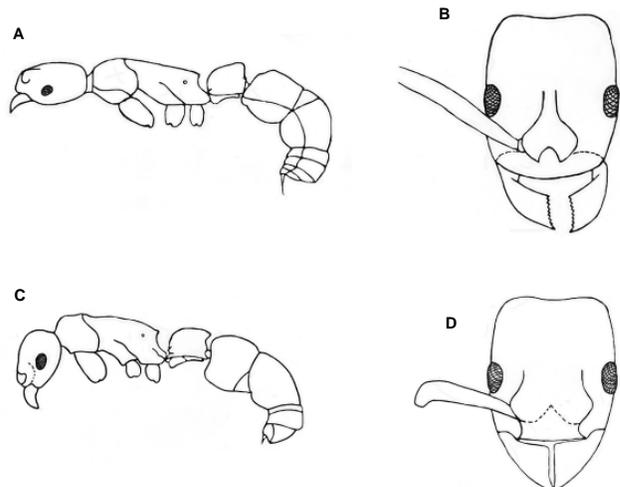


Figura 5. *Platythyrea* spp. A. Vista lateral y B. Cabeza de *P. prizo*; C. Vista lateral y D. Cabeza de *P. pilosula*.

- BROWN, W. 1958. Contributions toward a reclassification of the Formicidae, II: Tribe Ectatommini (Hymenoptera). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 118 (5): 173-362.
- BROWN, K. S. 1991. Conservation of Neotropical environments. Insects as indicators. 349-404. En: Collins, N. M.; Thomas, S. (eds.). *Conservation of insects and their habitats*. Academic Press. San Diego. USA.
- FERNÁNDEZ, F. 1993. Los géneros *Acanthoponera* Mayr, *Heteroponera* Fr. Smith y *Paraponera* Fr. Smith (Formicidae: Ponerinae: Ectatommini). *Hormigas de Colombia III*. *Caldasia* 17 (2): 249-258.
- FERNÁNDEZ, F. 2003. (ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. Colombia. XXVI + 398 p.
- FERNÁNDEZ, F.; SENDOYA, S. 2004. Lista de las Hormigas Neotropicales. *Biota Colombiana* 5 (1): 3-109.
- FERNÁNDEZ, F.; PALACIO, E.; MACKAY W. P.; MACKAY, E. 1996. *Introducción al Estudio de las Hormigas (Hymenoptera: Formicidae) de Colombia*. p. 317-355. En: Andrade, M. G.; Amat, G.; Fernández, F. (eds). *Insectos de Colombia*. Volumen I. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Física y Naturales.

- Colección Jorge Álvarez Lleras N° 10. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 541 p.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, O. E. 1990. The ants. Belknap. Harvard University Press. Cambridge. USA. 732 p.
- IAvH. 1997. Informe Nacional sobre el estado de la biodiversidad colombiana. Diversidad Biológica Tomo I. Bogotá. Colombia. 535 p.
- LONGINO, J. T.; HANSON, P. E. 1995. The ants (Formicidae). pp. 588-620. En: Hanson, P. E; Gauld, I. D. (eds). The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press. Oxford. UK. 893 p.
- RAMÍREZ, M.; CHACÓN DE ULLOA, P.; AMBRECHT, I.; CALLE, Z. 2001. Contribución al conocimiento de las interacciones entre plantas, hormigas y homópteros en bosques secos relictuales de Colombia. *Caldasia* 23 (2): 523-536.

Recibido: 14-feb-2007 • Aceptado: 14-oct-2007

## Nota científica

**Preservación y almacenamiento de ADN de mariposas utilizando papel filtro**

Preservation and storage of butterfly DNA using filter paper

LUZ MIRYAM GÓMEZ-P.<sup>1</sup> y SANDRA I. URIBE<sup>2</sup>

**Resumen:** Dos técnicas de almacenamiento de ADN de mariposas se compararon por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante la amplificación de un fragmento del gen ND4. El ADN extraído se depositó en tubos de microcentrífuga y se almacenó a -20°C, alternativamente se depositó en papel de filtro y se almacenó a temperatura ambiente. Las amplificaciones de fragmentos de ADN mediante PCR provenientes de papel filtro exhibieron buena calidad. Nuestros resultados sugieren el almacenamiento en papel filtro como una alternativa sencilla, efectiva y económica para preservar el ADN extraído.

**Palabras clave:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). ND4. Lepidoptera.

**Abstract:** Two techniques for butterfly DNA storage were compared using Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of a fragment from the ND4 gene. Extracted DNA was put into microcentrifuge tubes and stored at -20°C; alternatively, they were put on filter paper and stored at ambient temperatures. Fragments of DNA amplified through PCR that came from filter paper exhibited high quality. Our results suggest storage on filter paper to be a simple, effective and inexpensive alternative to preserve extracted DNA.

**Key words:** Polymerase Chain Reaction (PCR). ND4. Lepidoptera.

Los estudios moleculares en mariposas han proporcionado un renacimiento en la sistemática de este grupo que constituye uno de los más grandes y diversos del mundo animal. Al interior de Insecta, el orden Lepidoptera (mariposas y polillas) constituye el segundo orden más rico en número de especies, con cerca de 170.000 especies reconocidas y unas 300.000 especies todavía sin describir (Wahlberg 2006). Con base en dichos estudios, se han abordado aspectos taxonómicos, biogeográficos y evolutivos proporcionando avances significativos en el conocimiento sobre estos organismos (Sperling 2003; Sperling y Harrison 1994; Mallarino *et al.* 2005; Whinnett *et al.* 2005).

En la actualidad técnicas como la obtención de secuencias nucleotídicas y otras basadas en la PCR (por su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction), son de uso común en los estudios de sistemática molecular de mariposas y constituyen una de las principales herramientas para complementar y contrastar la información obtenida con base en caracteres morfológicos (Campbell y Pierce 2003; Keyghobadi *et al.* 2003). Para los entomólogos y en este caso particular para aquellos interesados en estudios moleculares de mariposas, el intercambio de muestras (especímenes o ADN) así como la calidad y cantidad de ADN obtenido son de gran importancia; por lo tanto, aspectos como el almacenamiento, transporte y posible degradación de las muestras por los ciclos repetidos de congelación y descongelación deben recibir especial consideración. Todos ellos, determinan en gran parte la calidad de la información obtenida (Hoy 1994; Avise 2004; Dessauer *et al.* 1996).

Por lo general, las extracciones de ADN realizadas a partir de insectos son almacenadas de forma individual en tubos de

microcentrífuga y congeladas a -20°C o -80°C hasta su utilización en las diferentes técnicas moleculares; también pueden pelletizarse mediante precipitación en alcohol o secarse al vacío cuando se almacenan por largos periodos. En este último caso, se requiere la resuspensión del ADN en el momento de realizar la técnica de amplificación (PCR) (Yang *et al.* 1997).

El papel filtro es usado de rutina en procedimientos de laboratorio y se ha implementado con éxito en extracciones de ADN. Así, la técnica conocida como Flinders Technology Associates (FTA®) permite la extracción del ADN a partir de sangre y su preservación a temperatura ambiente. En ella, se utiliza el papel filtro como una matriz de almacenamiento del ADN siendo una solución adecuada para aislarlo y preservarlo. Aunque esta técnica se ha realizado con algún éxito en plantas y pequeños insectos, es demasiado costosa en relación con la lisis celular tradicional en la que se basa la mayoría de los métodos de extracción de ADN en insectos (1 dólar vs 0.05 dólares por muestra). (Devost y Choy 2000; Natarajan *et al.* 2000; Snowden *et al.* 2002). En la presente nota se presenta una forma sencilla, económica y efectiva para almacenar, preservar e intercambiar ADN de mariposas utilizando papel filtro. Vía PCR se comparó la utilización del papel filtro comercial con la congelación y almacenamiento en tubos de microcentrífuga a -20°C de las muestras.

**Materiales y Métodos**

Las mariposas utilizadas fueron *Oleria fumata* (Haensch, 1905) y *Oleria makrena* (Hewitson, 1854) colectadas en el municipio de Jardín, Antioquia. Las extracciones de ADN individuales

<sup>1</sup> Autor para correspondencia: Bacterióloga, Entomóloga M. Sc., Grupo de Investigación en Sistemática Molecular –GSM–, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. [imgomezp@unalmed.edu.co](mailto:imgomezp@unalmed.edu.co)

<sup>2</sup> Ingeniera Agrónoma, M. Sc., Ph. D. Coordinador Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. [suribe@unal.edu.co](mailto:suribe@unal.edu.co)

se realizaron a partir de dos patas de las mariposas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  entre dos a cinco meses de su recolección. La extracción se realizó mediante el método sugerido en el kit comercial Dneasy kit (QIAGEN).

El ADN extraído de 50 muestras fue resuspendido en 80  $\mu\text{l}$ , de TE. La calidad de las muestras se verificó mediante observación en geles de agarosa al 0,8%. Las muestras con PCR positivo para el gen ND4 (subunidad 4 de la NADH-deshidrogenasa-mitocondrial-) se seleccionaron para la comparación. Posteriormente, se dispuso de dos trozos circulares de 3 cm de diámetro de papel filtro No.1 de advantec MFS, inc. marcados con lápiz para cada muestra. Con una micropipeta Gilson se depositaron sobre cada círculo 25  $\mu\text{l}$ , de ADN y se dejaron secar durante 10 horas. Para ello, los círculos se colocaron sobre cajas de petri estériles con doble papel servilleta encima y debajo. Una vez secos, se retiraron de las cajas petri y se depositaron en sobres blancos de papel respectivamente marcados que se almacenaron a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) en un cajón de madera de 20 x 20 cms. Otros 25  $\mu\text{l}$ , de cada muestra se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en tubos de microcentrífuga.

Cada mes durante cuatro meses tanto las muestras congeladas como las almacenadas en papel filtro, se probaron para PCR utilizando los cebadores ND4ar 5'-AA(A/G)GCTCATGTTGAAGC-3' y ND4c 5'-ATTTAAAGG(T/C)AATCAATGTAA-3', diseñados por Uribe *et al.* (2001) en el CDC de Atlanta, que amplifican un fragmento del gen ND4 de aproximadamente 600pb. La PCR se desarrolló con el siguiente perfil térmico:  $94^{\circ}\text{C}$  durante tres minutos, 35 ciclos a  $93^{\circ}\text{C}$ , durante 30 segundos,  $48^{\circ}\text{C}$  durante un minuto,  $70^{\circ}\text{C}$  durante un minuto y un paso final de extensión de  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Los geles se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador con luz ultravioleta (Biodoc analyzer, Biometra).

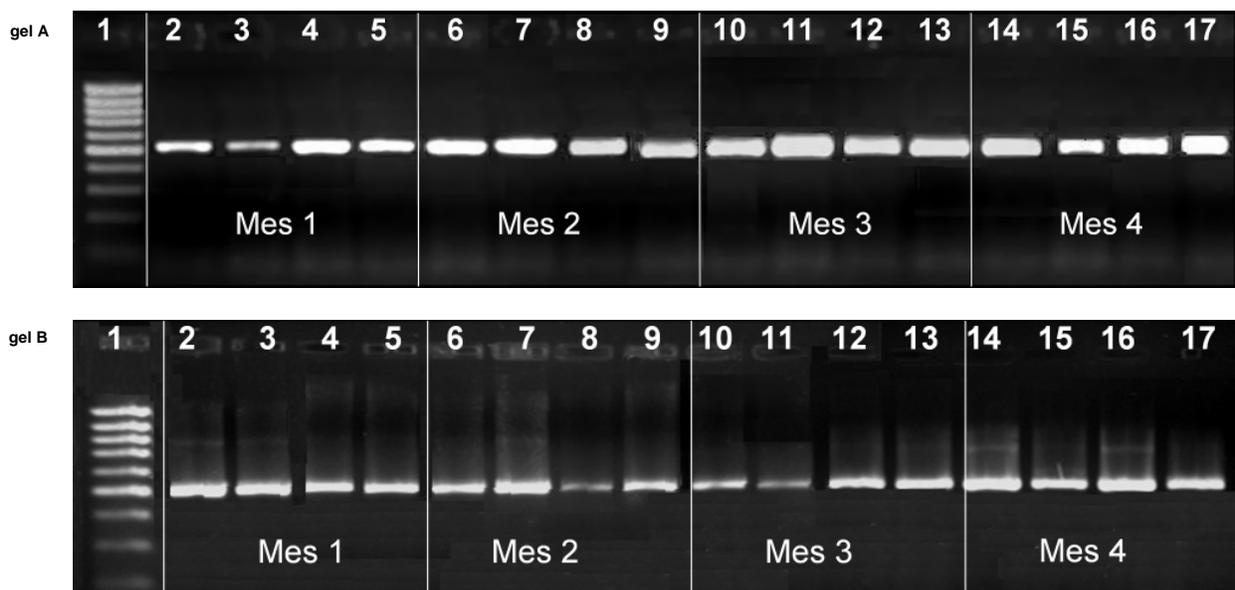
Para ambos tratamientos el volumen de la reacción fue de 50  $\mu\text{l}$  empleando 2  $\mu\text{l}$  de ADN molde en el caso del ADN congelado y un círculo de papel de 4mm, retirado con un

sacabocado de las muestras almacenadas a temperatura ambiente (aprox.  $25^{\circ}\text{C}$ ) y depositado en la mezcla de reacción. Los reactivos de mezcla de reacción, (Fermentas) se utilizaron en las siguientes cantidades y concentraciones: 5  $\mu\text{l}$  de buffer 10x, 4  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0,1  $\mu\text{l}$  de dNTPs (1mM), 0,3  $\mu\text{l}$  de taq polimerasa (500U) y 0,3  $\mu\text{l}$  de cada primer (50  $\mu\text{M}$ ) y agua ultrapura estéril ajustada al volumen final de la reacción. Las muestras se clasificaron como positivas o negativas para PCR.

## Resultados

De las 50 extracciones, 48 fueron positivas para PCR con los cebadores para amplificar el fragmento del gen ND4 las cuales se seleccionaron para la comparación. Al realizar de nuevo los PCR después de preservar las muestras congeladas y en papel filtro, se obtuvieron resultados positivos en cada uno de los cuatro meses para la totalidad de las muestras. En la figura 1 se observan algunos de los amplificados para algunas de las mariposas.

Los resultados verifican que el ADN almacenado a temperatura ambiente en papel filtro durante cuatro meses funcionó de forma efectiva para el almacenamiento y preservación del ADN genómico verificado por la técnica de PCR. Esta técnica representa una excelente fuente de almacenamiento de ADN sin los costos de congelación y con gran economía de espacio, ya que un gran número de muestras podrían almacenarse en sobres de papel en gabinetes de madera a temperatura ambiente. Otra ventaja es el fácil intercambio de las muestras entre investigadores al poder enviar los discos de papel en vez del ADN en solución lo cual significa no solo bajar los costos, sino también los riesgos de pérdida de la muestra por derrames o fracturas en los tubos. Esta forma de envío también es útil para remitir las muestras a laboratorios nacionales o internacionales para análisis o secuenciación. Adicionalmente, se evitan los ciclos de congelación y descongelación que afectan la calidad del ADN y se optimiza



**Figura 1.** Amplificados del gen ND4 para ejemplares de *O. fumata* y *O. makrena*. Las muestras del **gel A** fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras del **gel B** fueron conservadas en papel filtro. En los carriles número 2-3, 6-7, 10-11, 14-15 se sembraron muestras de *O. fumata*. En los carriles 4-5, 8-9, 12-13, 16-17 se sembraron muestras de *O. makrena*. El carril número 1 corresponde al marcador de peso molecular (100 pb).

la cantidad de reacciones de la PCR que pueden realizarse con base en una muestra, la cual corresponde al número de círculos que pueden usarse para cada reacción.

Es importante validar este estudio con un número mayor de muestras y por diferentes tiempos de almacenamiento del ADN ya que existe cierto grado de degradación del ácido nucleico, el cual puede ser más evidente con el paso del tiempo. Esta forma de conservar y preservar el ADN puede ser de gran utilidad en especial para técnicas como la PCR en la cual se logran resultados exitosos con pequeñas cantidades de ADN y aun con cierta degradación. Esto es especialmente válido para ADN mitocondrial uno de los más utilizados en la actualidad para estudios evolutivos y biogeográficos (Quicke 1993; Avise 2004; Hoy 1994).

### Agradecimientos

El presente trabajo se realizó como parte de un trabajo de tesis de maestría en Entomología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín y gracias a la financiación de la dirección de investigaciones de la sede proyecto QUIPU: 20101004614. Las autoras agradecen al especialista Keith R. Willmott (McGuire Center for Lepidoptera Research) por la confirmación taxonómica de los ejemplares utilizados en el estudio y a los miembros del semillero de investigación del grupo Sistemática Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín que apoyaron la realización del macro-proyecto.

### Literatura Citada

- AVISE, J. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. Sinauer associates, Inc. Miami. United States of America. 684 p.
- CAMPBELL, D.; PIERCE, N. 2003. Phylogenetic relationships of the Riodinidae: implications for the evolution of ant association, pp. 395-408. En: Boggs, C.; Watt, W.; Ehrlich, P. (eds.). Butterflies. Ecology and evolution taking flight. The University of Chicago Press. Chicago. United States of America. 739 p.
- DESSAUER, H.; COLE, C.; HAFNER, M. 1996. Collection and storage of tissues, pp. 29-47. En: Hillis, D.; Moritz, C.; Mable, B. (eds.). Molecular systematics. Sinauer associates. Miami. United States of America. 656 p.
- DEVOST, N.; CHOY, F. 2000. Mutation analysis of Gaucher disease using dot-blood samples on FTA filter paper. American Journal of Medical Genetics 94: 417-420.
- HOY, M. 1994. Insect molecular genetics. Academic press, Inc. California. United States of America 546 p.
- KEYGHOBADI, N.; ROLAND, J.; FOWNES, S.; STROBECK, C. 2003. Ink marks and molecular markers: examining the effects of landscape on dispersal using both mark-recapture and molecular methods, pp. 169-183. En: Boggs, C.; Watt, W.; Ehrlich, P. (eds.). Butterflies. Ecology and evolution taking flight. The University of Chicago Press. Chicago. United States of America. 739 p.
- MALLARINO, R.; BERMINGHAM, E.; WILLMOTT, K.; WHINNETT, A.; JIGGINS, C. 2005. Molecular systematics of the butterfly genus *Ithomia* (Lepidoptera: Ithomiinae): a composite phylogenetic hypothesis based on seven genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 34 (3): 625-44.
- NATARAJAN, P.; TRINH, T.; MERTZ, L.; GOLDSBOROUGH M.; FOX, D. 2000. Paper-based archiving of mammalian and plant samples for RNA analysis. Biotechniques 29: 1328-1333.
- QUICKE, D. L. 1993. Principles and techniques of contemporary taxonomy. Blackie academic & professional. Great Britain. 311 p.
- SNOWDEN, K. F.; LOGAN, K.; VINSON, S. 2002. Simple, filter-based PCR detection of *Thelohania solenopsae* (Microspora) in fire ants (*Solenopsis invicta*). Journal of Eukaryotic Microbiology 49: 447-448.
- SPEHLING, F. 2003. Butterfly molecular systematics: from species definitions to higher-level phylogenies, pp. 431-458. En: Boggs, C.; Watt, W.; Ehrlich, P. (eds.). Butterflies. Ecology and evolution taking flight. The University of Chicago Press. Chicago. United States of America. 739 p.
- SPEHLING, F.; HARRISON, R. 1994. Mitochondrial DNA variation within and between species of the *Papilio machaon* group of swallowtail butterflies. Evolution 48: 409-422.
- URIBE, S.; LEHMANN, T.; ROWTON, E.; VÉLEZ, I.; PORTER, C. H. 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. Molecular Phylogenetics and Evolution 18 (1): 84-93.
- WAHLBERG, N. 2006. Lepidoptera Evolution, Taxonomy and Systematics- Scientific Report European Science Foundation. Stockholm, Sweden, 12 p.
- WHINNETT, A.; BROWER, A.; LEE, M.; WILLMOTT, K.; MALLETT, J. 2005. The phylogenetic utility of Tektin, a novel region for inferring systematic relationships amongst Lepidoptera. Annals of the Entomological Society of America 98 (6): 873-886.
- YANG, H.; GOLENBERG, E.; SHOSHANI, J. 1997. Proboscidean DNA from museum and fossil specimens: An assessment of ancient DNA extraction and amplification techniques. Biochemical Genetics 35 (5/6): 165-179.

Recibido: 26-abr-2006 • Aceptado: 7-ago-2007

## ÍNDICE TEMÁTICO Y DE AUTORES DEL VOLUMEN 33 (2007)

**A**

Abejas del fuego 188  
*Acanthoponera* 193  
*Acanthoponera minor* 194  
*Acanthoponera mucronata* 193  
 Acaridae 125  
 Acariformes 110  
 Acentropinae 1-3, 5, 7, 9  
*Acmaeodera lupinae* 147  
 Acraeinae 63  
 Actividad proteolítica 104, 106  
 Acuña, J. 183  
 ADN 18S 171  
 ADN ribosomal 171  
*Aedes aegypti* 148-156  
*Aepocerus* 167-169  
 Agaonidae 165-169  
 Agaoninae 168  
*Agrilus hyperici* 147  
 Agromyzidae 104  
*Agrotis ipsilon* 125  
*Agrotis subterranea* 125  
*Alabama argillacea* 27-28 30  
*Aleurotrachelus socialis* 110, 115  
 Algodón 117  
*Allium cepa* 125  
*Allium fistulosum* 129  
 Almacenamiento ADN 197  
*Alpaida veniliae* 74-75  
 Amazonía 157  
 Amblyoponinae 193  
*Amitus fuscipennis* 120  
*Anastrepha* 36-42  
*Anastrepha alveata* 36-39, 41  
*Anastrepha antunesi* 36-38, 41  
*Anastrepha palae* 36-39, 41  
*Anastrepha parishi* 36-37, 40-41  
*Anastrepha shannoni* 36-37, 39-41  
*Ancognatha* 181  
*Ancognatha manca* 178  
 Angel, F. 171  
*Anidarnes* 168  
*Anomala inconstans* 21-22  
*Anoplotermes* 82-84  
*Anthaxia nitidula* 147  
 Anthocoridae 121  
*Anthocoris nemorum* 121  
 Anthomyiidae 124  
 Antibiosis 10, 12, 15-16  
 Aphididae 124, 171  
*Aphis fabae* 125  
*Aphis gossypii* 125  
 Apicotermitinae 82-84  
 Apidae 188  
 Araneae 74, 76  
 Araneidae 74, 76  
 Armbricht, I. 64  
 Arroz 74-76  
*Aschersonia aleyrodis* 120  
*Aspergillus ochraceus* 120  
*Aspilodea singularis* 178

**B**

*Beauveria bassiana* 89-95, 120  
 Bejarano, E. 43  
 Bellotti, A. 110  
*Bemisia tabaci* 141-144  
 Bioplaguicida 116-119  
 Bosque húmedo tropical 157

Bosque nublado 45-46, 50  
 Botero, J. 157  
*Botrytis* 129  
*Brachiaria* 31, 32, 35  
*Brachiaria ruziziensis* 32  
 Brassolinae 58, 63  
 Buprestidae 146  
 Burbano, M. 110

**C**

Cadena, P. 171  
 Café 10-16  
 Calberto, G. 178  
*Callosobruchus chinensis* 137  
 Caña de azúcar 31-32, 35  
 Carabali, A. 110  
 Carabidae 77-78, 80  
 Cardona, W. 165  
 Carrillo, D. 124  
*Ceraeochrysa claveri* 172  
*Ceraeochrysa cubana* 171  
 Cerambycidae 77-78, 80, 99  
 Cercopidae 31, 35, 74  
 Chacon de Ulloa, P. 54, 165  
 Charaxinae 61  
 Chiffelle, I. 98  
 Chisas 17-19  
 Chrysauginae 2-3, 5-7, 9  
*Chrysoperla carnea* 174  
*Chrysoperla externa* 171  
*Chrysoperla rufilabris* 174  
 Chrysopidae 171  
 Cicadellidae 74  
*Clavipalpus ursinus* 124, 125  
 Coccinellidae 116  
*Coffea arabica* 10  
*Coffea liberica* 10  
 Coleoptera 10, 15, 17, 19-21, 25, 77-78, 80-81  
 Coliadinae 61  
*Compsus* 183-187  
*Compsus viridilineanus* 183  
*Conocephalus* 74-76  
 Constantino, L. 54  
 Coprófagos 190  
 Cordeiro G. 146  
*Cornitermes cumulans* 82-85  
*Cortaritermes* 83-84  
*Cortaritermes fulviceps* 82 84  
 Cortés, C. 45  
 Cortina, G. 10  
 Cotes, A. 116  
 Cotes, C. 45  
 Cotton 27-30  
 Crambidae 1-5, 7-9  
 Crambinae 2-4, 7, 8  
 Cubas, A. 27  
*Culex quinquefasciatus* 148-156  
 Culicidae 150-156  
 Curculionidae 10, 15, 77-78  
 Cybalomiinae 3, 5, 7  
*Cyclocephala* 181  
 Cyclocephalini 181  
*Cyrtodiopsis dalmanni* 138

**D**

Danainae 62  
 De Nadai, J. 146  
 Degradadores 77-78, 80-81  
 Degrande, P. 27

*Delia* 124-127  
 Deloya, C. 77  
 Delphacidae 74  
*Delphastus pusillus* 116-121  
 Dengue 148-156  
 Densitometrías 108  
 Depredador(es) 47-48, 78, 80  
 Detritívoros 45, 47-48  
*Digitonthophagus gazella* 190-192  
 Dinámica estacional 157-163  
 Diniz-Silveira R. 146  
 Diopsidae 138  
 Diptera 36-37, 41-44, 74  
 Dismorphinae 61  
 Dos Anjos, N. 146  
 Drop drop beetle 146  
*Drosophila melanogaster* 138  
 Drosophilidae 138  
 Dynastinae 178

**E**

Ecología urbana 54  
 Edafofauna 45, 47-50  
 Elateridae 77-78, 80  
 Electroforesis 91, 106, 198  
*Enterolobium cyclocarpum* 191  
 Entomoparasitos 21  
 Epipaschiinae 2-3, 5, 6, 8-9  
 Escalas de infestación 112  
 Especies invasivas 190  
 Espinaca 124  
 Estructura trófica 157  
*Eucalyptus* 98-102, 146  
*Eucalyptus camaldulensis* 99-101  
*Eucalyptus globulus* 99-101  
*Eucalyptus robusta* 99-101  
 Eumastacidae 70, 73  
 Evergestinae 2-5  
 Evolución de insectos 86-88

**F**

Fagua, G. 157  
 Fernandes, M. 27  
 Fernández, C. 74  
*Ficicola* 167-169  
*Ficus* 165-169  
*Ficus andicola* 167-169  
*Ficus dugandi* 168  
*Ficus mexiae* 167  
*Ficus popenoei* 168  
*Ficus trigonata* 168  
 Flórez, D. 74  
 Formicidae 64-65, 69  
 Frecuencia de cópula 133  
*Fusarium oxysporum* 107, 129

**G**

Gaigl, A. 17, 21  
 Galleriinae 2-3, 5, 9  
 Gamboa, F. 148  
 García, J. 133  
 García-González, J. 116  
 Geles de poliacrilamida 106  
 Germoplasma 114  
 Germoplasma de café 10  
 Gil, R. 124  
 Glaphyriinae 2-5, 9  
*Gliocladium* 129  
 Golmirzaie, A. 104

- Gómez, L. 171  
 Gómez-P, L. 197  
*Gonipterus scutellatus* 98-102  
 González, R. 148, 171  
 González, V. 188  
*Gossypium hirsutum* 27-28  
 Gramíneas forrajeras 31  
 Granobles, J. 141  
*Grigiotermes* 82-84  
*Grigiotermes bequaerti* 83-84  
*Gryllus integer* 138  
 Guerrero, R. 193
- H**  
 Heliconiinae 57, 62  
*Helicoverpa zea* 125  
 Hemiptera 31, 35, 110  
 Herbívoro(s) 47-48  
 Herrera R. 64  
 Hesperidae 54, 56-58, 60  
 Hesperioidea 54, 56, 60-63  
*Heterandrium* 165-169  
*Heteroponera* 193  
*Heteroponera angulata* 193, 194  
*Heteroponera inca* 194  
*Heteroponera microps* 194  
*Heteroponera monticola* 194  
 Heteroponerinae 193  
*Heterorhabditis* 21-22 24-25  
 Hexapoda 86-87  
 Hongo entomopatógeno 89  
 Hormiga depredadora  
 Hormigas cazadoras 193  
*Hortensia similis* 74-76  
 Huerta, A. 98  
 Hymenoptera 64-65, 69  
*Hypothenemus hampei* 10-16
- I**  
*Idarnes* 165-169  
 Ingeniero(s) 47-48  
 Inhibidores de proteasas 104-108  
 IPM 27-28  
 Isoptera 82, 84-85  
 Ithomiinae 57-58, 62
- J**  
 Jiménez, J. 124
- K**  
 Kattan, G. 165  
 Khachatourians, G. 89
- L**  
 Laffont, E. 82  
 Lampetis 147  
*Lampetis instabilis* 147  
*Lampetis nigerrima* 147  
*Lecanicillium lecanii* 116-121  
 Lepidoptera 1, 3, 7-9, 54, 59-60, 88, 197  
*Leucochryza* 172  
*Limoniis* 125  
*Linepithema humile* 68  
 Linostinae 3, 5  
*Liriomyza huidobrensis* 104, 125  
*Liriomyza trifolii* 125  
 Lucero, A. 129  
*Lutzomyia* 43-44  
*Lutzomyia atroclavata* 43  
*Lutzomyia* sp. serie *townsendi* 44
- M**  
*Macrosiphum euphorbiae* 124  
*Mahanarva andigena* 31-35  
*Manihot* 110-114  
*Manihot esculenta* 17, 110-115  
*Manihot flabellifolia* 111-115  
*Manihot peruviana* 111-115  
 Marcelo, A. 104  
 Mariposas diurnas 54, 59-60  
 Martínez-Alava, J. 36  
 Meliponini 188  
 Melitaeinae 62  
 Melolonthidae 17, 19-21, 25, 26, 77-78, 80-81, 124  
 Melo-Molina, E. 17, 21  
*Metarhizium* 95  
*Metarhizium anisopliae* 121  
 Midilinae 3, 5, 8  
 MIP 27  
 Miridae 141-144  
 Miss D. 77  
 Mitochondria 89  
*Mizus persicae* 125  
 Molinario de Souza, R. 146  
 Monoginas 64-68  
*Mononychellus tanajoa* 110, 115  
 Montoya, J. 110, 148  
 Moreira, M. 27  
 Morphinae 63  
 Mosca blanca 110-111, 116  
 Mosca minadora 104  
 Muñoz, L. 129  
 Musotiminae 3 5 9  
*Myzus persicae* 124, 127, 141-144
- N**  
 Nasutitermitinae 82-83  
 ND4 ADN 197  
 Neita, J. 178  
 Nematodos 21-26  
*Neocaprithermes opacus* 82-83  
*Nesidiocoris tenuis* 141-144  
*Nicotiana tabacum* 141-144  
 Noctuidae 88, 124  
 Noriega, J. 157  
 Nymphalidae 54, 56-57, 61  
 Nymphalinae 57, 62
- O**  
 Odontiinae 3-5, 7  
*Oleria fumata* 197  
*Oleria makrena* 197  
 Olivera, J. 104  
 Olivero-G, D. 193  
 Ortega-Ojeda, C. 17, 21  
 Orthoptera 70-74  
 Otitesellinae 168  
*Oxytrigona* 188
- P**  
*Paecylomyces fumosoroseus* 120  
*Paelomyces farinosus* 89, 91  
 Palacios, M. 104  
 Papa 133  
 Papilionidae 54, 57-59, 61  
 Papilioninae 61  
 Papilionoidea 54, 56, 60-63  
 Paraponerinae 193  
*Paratrechina fulva* 67, 68, 69  
 Parsimonia de Wagner 91  
 Passalidae 77-78, 80  
 Pastizales 82-85  
 PCR 173, 197  
 Peck, D. 31  
*Pegoscopus* 165  
 Perafán, O. 148  
 Pérez, R. 116  
 Perfil proteico 98, 99  
*Peridroma saucia* 125  
 Perú 104  
*Phenacoccus herreni* 110-115  
 Phlebotominae 43-44  
*Phoma* 129  
*Phoracantha semipunctata* 99  
*Phthorimaea operculella* 105, 136  
 Phycitinae 2-3, 5-9  
*Phyllophaga menetriesi* 17-24, 26  
 Phylogenetic 1, 3-9  
*Physothorax* 167-169  
 Picudo cítricos 183  
 Pieridae 54, 57, 58, 61, 138  
*Pieris napi* 138  
 Piojo harinoso 111  
*Platythyrea* 193  
*Platythyrea pilosula* 193, 195  
*Platythyrea prizo* 194, 195  
*Platythyrea punctata* 195  
 Poliandria 133  
 Poligina 64, 66-68, 133  
 Polilla guatemalteca 133  
 Ponerinae 193  
 Porcel, E. 82  
 Porras, M. 70  
*Premnotrypes* sp 105  
 Proceratinae 193  
 Proteasas 104  
*Psiloptera pertyi* 146, 147  
 Psychodidae 43-44  
 Pteromalidae 168  
 Pyralidae 1, 3, 5-9, 74  
 Pyralinae 2-3, 5-6, 9  
 Pyraloidea 1, 3-5, 7-9  
 Pyraustinae 2-4, 7, 9
- R**  
 Ramírez, R. 54  
 Ratcliffe, B. 178  
 Resistencia 111  
 RFLP 89, 90  
*Rhizoglyphus* 129  
 Rincon, D. 133  
 Riodininae 63  
 Rivera, C. 190  
 RNA 16S 91  
 Rodríguez J. 31  
 Romero, J. 10  
 Rubio, J. 183
- S**  
 Saavedra 74  
 Salivazo 31-32 34-35  
 Sánchez, M. 141  
 Saproxilófilos 77-78 80  
 Satyrinae 54 57-58 63  
 Scarabaeidae 178, 190  
 Schoenobiinae 2-3 5 7  
 Scolytinae 10, 15, 157  
 Scopariinae 2-3, 5, 8  
 Serrano, M. 98  
*Sesamun indicum* 142  
 Sierra Nevada de Santa Marta 193  
 Sierra, D. 43  
 Silva, A. 27  
*Sipha flava* 171  
*Solanum tuberosum* 104  
*Solenopsis* cf. *picea* 64-69  
*Solenopsis geminata* 64 69  
*Solenopsis invicta* 65, 67-69

- Solis, M. 1  
*Spaceloma manihoticola* 114  
 Spilomelinae 2-4, 9  
*Spinacia oleracea* 124  
*Spodoptera exigua* 125  
*Spodoptera littoralis* 125  
*Spodoptera praefica* 125  
*Steinernema feltiae* 21-22, 25  
 Suárez, M. 148  
 Sumideros urbanos 150-156  
 Sycophaginae 168
- T**  
 Tabaco 141-144  
 Tabla de vida 10-13, 15, 116, 118  
 Tasa finita de crecimiento 118, 119  
 Tasa intrínseca de crecimiento natural 118, 119  
 Tasa neta reproductiva 118, 119  
*Tecia solanivora* 133-138  
 Tenebrionidae 77-78, 80-81  
 Tenorio, J. 104
- Tephritidae 36-37, 41-42  
*Termes* 83-84  
 Termitinae 82-83  
*Tetranychus urticae* 125  
 Tettigoniidae 74  
 Tiempo generacional 118, 119  
*Torulopsis glabrata* 89  
 Torymidae 168  
 Transformador(es) 45, 47-48  
*Trialeurodes vaporariorum* 116-119, 141-144  
*Trichogramma* spp. 27-28, 30  
*Trichoplusia ni* 125  
*Trigona fulviventris* 188  
 Tripidae 124  
*Tyrophagus putrescentiae* 124-127  
*Tyrophagus similis* 125
- U**  
 Uribe, D. 89  
 Uribe, S. 197  
*Urostigma* 167-169
- V**  
 Valderrama, K. 141  
 Valencia, E. 141  
 Varela, A. 45  
 Variedad Caturra 10-14  
 Vásquez, T. 98  
 Vélez, I. 43  
 Viola, M. 157  
 Virus del nilo 148
- W**  
*Wasmannia auropunctata* 68-69  
 Wolff, M. 190
- X**  
 Xilomicetófagos 157
- Y**  
 Yuca 17-20, 110
- Z**  
*Zeromastax* 70-73, 199  
*Zeromastax selenesii* 70-72

#### Fe de erratas número 33 (1):

Por un imperdonable descuido editorial la figura 3 (página 72) del trabajo **Del carnaval al estereoscopio: *Zeromastax* (Orthoptera: Eumastacidae), un nuevo género de saltamontes payaso**, presenta errores con los nombres en la imagen así: 1. Los literales C y D tienen como título “Esclerito endofálico” pero debe ser ‘Esclerito subepifálico’. y 2. La figura del extremo inferior izquierda no tiene literal y debe ser “E” y el texto debe ser ‘esclerito endofálico’ no “Esclerito subepifálico” ofrecemos nuestras excusas a la autora.

## Agradecimientos

La Revista Colombiana de Entomología desea expresar sus agradecimientos a los doctores listados abajo por su contribución como evaluadores de los trabajos sometidos a publicación durante nuestro volumen 33 de 2007. Su desinteresado apoyo ha sido fundamental para mantener nuestros estándares de calidad.

Oscar Alomar, Agustín Aragón García, Jaime E. Araya Clericus, Inge Armbrecht, Chuck Bellamy, María V. Bertorelli, Arturo Bonet Ceballos, Eduardo Botto, Armando Burgos Solorio, Alex Bustillo, Abraham Cáceres, Omar Cáceres Rey, Sara Cáceres, Alejandro Calixto, Enio B. Cano, Fernando Cantor, Sonia Casari, Juan Pablo Castillo, María Luisa Castillo, Oskar V. Conle, Reginaldo Constantino, Renato Contin Marinoni, Antonio José Creao-Duarte, Carolina Cuezco, Jacques Delabie, Luis Leonardo Delgado Castillo, Rocco Alfredo Di Mare, Carmen Fernández, Montraveta, Fernando Fernández, María Cristina Ferro, Rodolfo Figueroa-Brito, Enrique García-Barros, Marcos Gerding P. Arturo Goldarazena, Carmenza Góngora B. Alfredo de Gouvea, Nancy M. Greco, James Hardwod, Solange Isa, Alberto Jiménez-Valverde, John E. Lattke, Roberto E. Lecuona, Jorge M. Lobo, Héctor Lozoya-Saldaña, Silvia Noemí López, Lauri Kaila, Carlos A. Machado, Paulo Sérgio Machado Botelho, William Mackay, Marta Martínez Wells, Fernando Montealegre, Estefanía Micó, José Ricardo Miras Mermudes, Laurence Mound, Simone Mundstock Jahnke, Dori Edson Nava, Joelo Tupac Otero, Alicia Pelicano, Daniel E. Perez-Gelaberta, Patricia C. Pereyra, José Roberto Postali Parra, Emilio Realpe, Hugh Rowell, Camilo Salazar, Oscar Salomón, Carlos Sarmiento, Michael Sharkey, Gustavo Schiffler, Miguel Serrano, Gonzalo Silva, Rogério Silvestre, Daniel Ricardo Sosa-Gómez, Andrew B. T. Smith, Myriam Tigano, Carolina Torres, Sandra Uribe, Carmen Urones Jambrina, Jorge Valdez Carrasco, Sergio Antonio Vanin, Alexandre Vasconcellos, Richard L. Westcott, Marta Wolff,