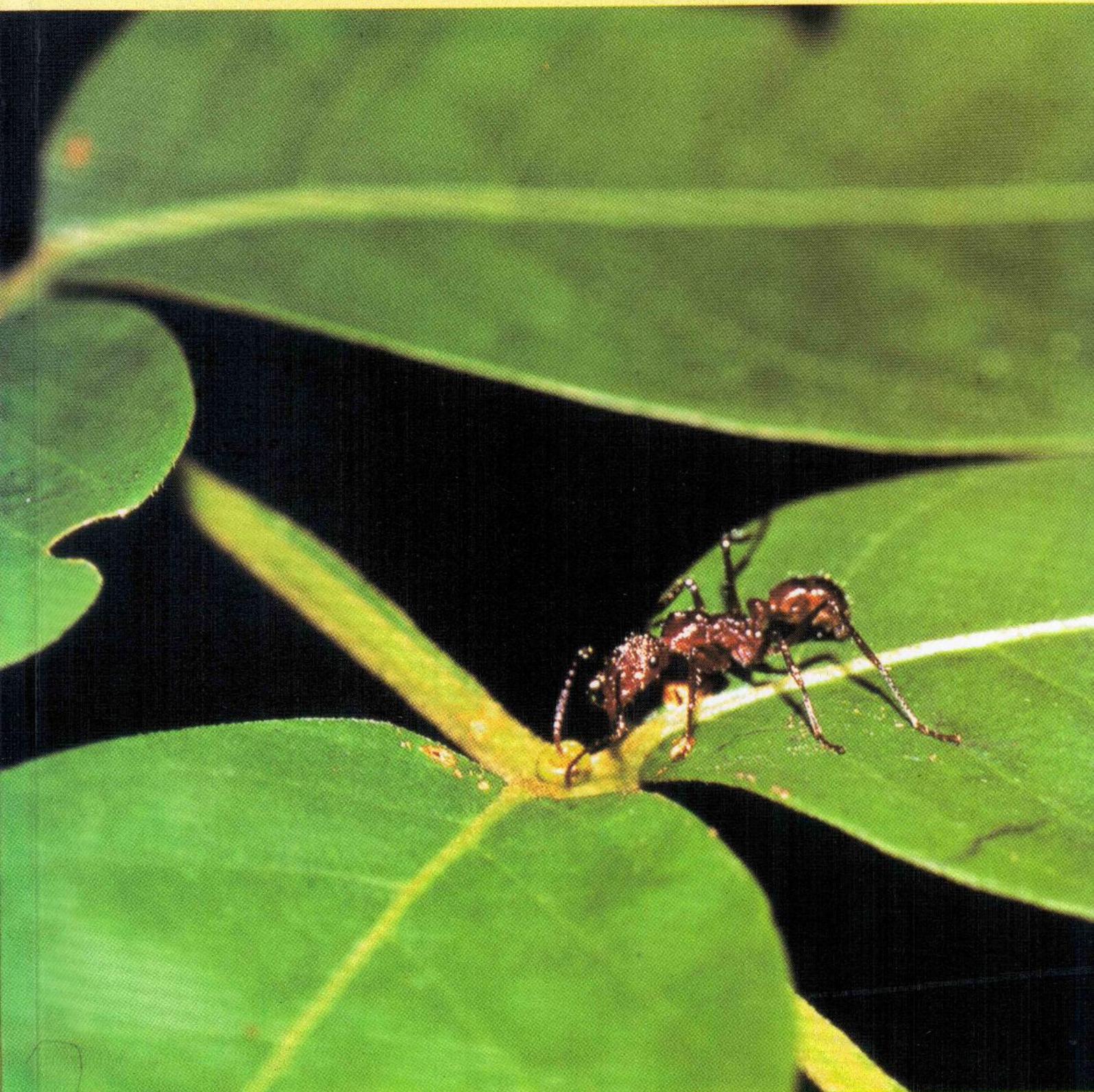


REVISTA COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA

Volumen 31 • Número 2 • Julio - Diciembre 2005

Tarifa Postal Reducida No. 239 - Vence Dic. 31 / 2005



Publicación oficial de la Sociedad Colombiana de Entomología

Artículo de revisión**Resistencia a insecticidas en mosquitos
(Diptera: Culicidae): mecanismos, detección
y vigilancia en salud pública**Insecticide resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae): mechanisms, detection and monitoring
in public healthIDALYD FONSECA¹, MARTHA L. QUIÑONES²

Resumen. Uno de los obstáculos más serios en los programas de control de vectores de enfermedades humanas es el desarrollo de resistencia a los insecticidas usados. Según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 40% de los 506 artrópodos de importancia médica presentan algún grado de resistencia a insecticidas. De estas especies, cerca del 50% son especies de mosquitos vectores de malaria, dengue, fiebre amarilla y filariasis. Los dos principales mecanismos de resistencia a insecticidas son las alteraciones en el sitio blanco y un incremento en la tasa de detoxificación de los insecticidas. Una vez se detectan niveles de resistencia en una población de vectores es fundamental determinar su base bioquímica y molecular. La identificación de los mecanismos de resistencia permite la selección de los insecticidas a usar en los programas de control y la evaluación del potencial desarrollo de resistencia a insecticidas alternativos. Esta revisión presenta información básica acerca de los principales mecanismos de resistencia a insecticidas identificados en mosquitos vectores de enfermedades humanas y las metodologías más usadas para su vigilancia y detección.

Palabras clave: Mecanismos moleculares. Vectores. Control Químico. Vigilancia.

Summary. Among the most serious obstacles in vector control programs for human diseases is the development of resistance to the insecticides used. According to WHO, approximately 40% of the 506 medically important arthropods show some degree of insecticide resistance. Of these species, about 50% are species of mosquitoes that vector malaria, dengue, yellow fever and filariasis. The two principal mechanisms of insecticide resistance are alterations in the target site or an increase in the detoxification rate of the insecticide. Once resistance is detected in a vector population it is crucial to determine its molecular and biochemical basis. Identification of resistance mechanisms permits the selection of insecticides to use in control programs and the evaluation of potential development of resistance to alternative insecticides. This review presents basic information regarding the main mechanisms of insecticide resistance identified in mosquito vectors of human diseases and the methodologies most used to monitor and detect them.

Key words: Molecular mechanisms. Vectors. Chemical Control. monitoring.

Introducción

Cada año, millones de personas alrededor del mundo se enferman y mueren por enfermedades transmitidas por insectos vectores, como malaria, dengue, leishmaniosis y tripanosomiasis. Estas enfermedades causan gran impacto económico y social, particularmente en países tropicales como Colombia. Actualmente, ningún método efectivo de inmunización está disponible para controlar dichas enfermedades y la única forma de controlar la transmisión está dirigida hacia sus vectores. El uso de insecticidas químicos ha sido la forma más utilizada en los programas de control. Éstos se han empleado por más de 60 años con resultados variables. Inicialmente se usaron piretrinas, de corto efecto de noqueo. Posteriormente se introdujeron insecticidas de mayor acción residual como los organoclorados, carbamatos y organofosforados.

A partir de 1990, el desarrollo de piretroides sintéticos fotoestables y las presiones de grupos ambientalistas desplazaron el uso del DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano) para la fumigación intradomiciliar en los programas de control de malaria, siendo en la actualidad el tipo de insecticida más usado tanto en rociamientos intradomiciliares como en la impregnación de toldillos (Lengeler *et al.* 1996; Phillips 2001).

En 1947, tan solo un año después de la introducción de insecticidas para el control de vectores, se notificaron los primeros casos de resistencia a DDT en *Aedes tritaeniorhynchus* (Weidemann) y *Ae. sollicitans* (Walker) (Brown 1986). Desde entonces se han señalado más de 100 especies de mosquitos resistentes a uno o más insecticidas, de las cuales 56 son Anophelinos y 39 Culicinos, además de triatomíneos, pulgas, piojos y

garrapatas (WHO 1992). Actualmente, el Comité de Acción para la Resistencia a Insecticidas (IRAC) cita en su página web (<http://www.plantprotection.org/irac>) resistencia en 21 especies de *Aedes*, entre ellas el vector de dengue *Ae. aegypti* (Linnaeus) (resistente a 16 insecticidas) y 63 especies de *Anopheles*, incluyendo *Anopheles albimanus* Weidemann, *An. darlingi* Root, *An. pseudopunctipennis* Theobald y *An. rangeli* Galabdon, Cova García & López, todas éstas importantes en la transmisión de malaria en Colombia.

En Colombia, la descentralización de los programas de control de malaria y dengue desde 1992 ha dificultado la vigilancia permanente del estado de la resistencia a insecticidas en las poblaciones vectoras. No obstante, existen registros de resistencia al DDT y Temefos en diferentes especies de *Anopheles* y *Ae.*

1 Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Calle 62 No 52-59, Edificio de Sede de Investigación Universitaria, Medellín, Colombia. A. A 1226. Fax: (4) 210 6502. E-mail: idalydf@guajiros.udea.edu.co

2 Autor para correspondencia: Martha L. Quiñones P. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Lab 632. A. A 1226, Medellín, Colombia. Fax: (4) 210-6502. E-mail: mquinones@guajiros.udea.edu.co

aegypti en el país, respectivamente (Quiñones *et al.* 1987; Suárez *et al.* 1990), los cuales sugieren que las poblaciones de vectores presentan características genéticas favorables para la emergencia de resistencia cuando éstas sean presionadas por insecticidas. Sin embargo, debido a que no hay conocimiento de los mecanismos bioquímicos que generaron la resistencia al DDT y a otros químicos, se desconoce el impacto que podría tener el uso de otros insecticidas que compartan el mismo mecanismo de acción, causado por efectos de resistencia cruzada.

La resistencia a insecticidas o resistencia fisiológica se define como la capacidad de una población de insectos de tolerar dosis de un insecticida que serían letales para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie y es el resultado de la presión de selección positiva ejercida por el insecticida (WHO 1975) sobre genes inicialmente en baja frecuencia. Los genes de resistencia pueden luego dispersarse en la población local de insectos e incluso en el mundo. Los patrones de distribución de estas variantes genéticas en poblaciones naturales son el efecto conjunto de varias fuerzas evolutivas y factores demográficos como la selección, mutación y el ciclo de vida (Gazave *et al.* 2001).

Numerosos factores influyen en la evolución de la resistencia a insecticidas, los cuales pueden agruparse en tres categorías: factores genéticos, biológicos y operacionales. Los factores genéticos se relacionan principalmente con la frecuencia y dominancia de los alelos de resistencia, en tanto que los biológicos incluyen el ciclo de vida, el número de descendientes por generación y las tasas de flujo génico. Los factores genéticos y biológicos son intrínsecos a las especies y por lo tanto se escapan del control humano. Los factores operacionales si pueden ser manejados a fin de evitar o retardar el desarrollo de resistencia. Estos factores se asocian directamente con el tiempo, dosis y formulación del insecticida, el estadio seleccionado y el uso previo de insecticidas relacionados (Georghiou 1990).

Mecanismos de Resistencia

Los dos principales mecanismos de resistencia a insecticidas son las alteraciones en el sitio blanco y un incremento en la tasa de detoxificación de los insecticidas. Se proponen también mecanismos basados en la respuesta al estrés térmico (Patil *et al.* 1996), penetración disminu-

da, incremento en las tasas de excreción y cambios de comportamiento que eviten el contacto con los insecticidas aunque los vectores sean susceptibles a éstos (Brogdon y McAllister 1998a).

La resistencia mediada por el sitio blanco ocurre cuando el insecticida no logra unirse a su sitio de acción ya sea porque hay disminución en la sensibilidad del sitio blanco o modificación de éste (Hemingway y Ranson 2000). La resistencia basada en enzimas detoxificantes se presenta cuando niveles elevados o actividades modificadas de estas enzimas contribuyen a disminuir la dosis efectiva de un insecticida evitando que llegue a su sitio de acción (Ranson *et al.* 2002a). (Fig. 1).

1. Alteraciones en el sitio blanco

La causa más común de resistencia en el sitio blanco es la presencia de mutaciones puntuales no silentes en genes estructurales. Para que dichas mutaciones sean seleccionadas favorablemente, el cambio en el aminoácido debe disminuir la unión al insecticida sin causar pérdida de la función primaria del sitio blanco. Por lo tanto, el número de posibles sustituciones de aminoácidos es limitado y comúnmente se encuentran mutaciones idénticas asociadas con resistencia a través de taxa altamente divergentes. El grado de deterioro de la función, ocasionado por la mutación que confiere resistencia, se refleja en la eficacia biológica de los individuos resistentes en ausencia de selección por el insecticida. Este costo en la eficacia biológica tiene importantes implicaciones para la persistencia de resistencia y/o reversión a la susceptibilidad en poblaciones de campo (Berticat *et al.* 2002).

1.1. Cambios en el Receptor GABA (Ácido γ -aminobutírico)

En insectos, el receptor GABA es un canal heteromultimérico abierto por el ión cloro, un inhibidor de canales de neurotransmisión en el sistema nervioso y las uniones neuromusculares (Bermudez *et al.* 1991).

El receptor GABA es el sitio de acción para ciclodienos y avermectinas al igual que para fipronil (Ffrench-Constant *et al.* 1993a). La resistencia está dada por el gen *Rdl* (Resistencia a dieldrín), el cual codifica para la subunidad RDL del receptor GABA. La sustitución Ala302Ser confiere insensibilidad al insecticida al interactuar directamente con el sitio de unión del insecticida dentro del poro del canal iónico y alostéricamente, desesta-

bilizando la conformación preferida del insecticida, a través de un fenómeno conocido como desensibilización (Ffrench-Constant *et al.* 1998). En *Drosophila* se identificaron por primera vez subunidades del receptor GABA conteniendo *Rdl*, las cuales se han encontrado expresadas en el sistema nervioso de insectos resistentes a dieldrín, entre ellos *Ae. aegypti* (Thompson *et al.* 1993). En *Drosophila simulans* Sturtevant y *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), el mismo residuo es reemplazado por glicina (Ffrench-Constant *et al.* 1993b).

1.2. Canales de sodio dependientes de voltaje (*kdr*)

Los canales de sodio dependientes de voltaje son el blanco de acción del DDT y piretroides. Estos insecticidas actúan sobre el sistema nervioso del insecto causando decaídas lentas del potencial de acción, generando la iniciación de descargas repetitivas en los axones motores y sensoriales (Soderlund y Bloomquist 1989). Estudios electrofisiológicos en *Ae. aegypti* y *An. stephensi* Liston han demostrado que estos fenómenos resultan de la modificación en la cinética de apertura de estos canales (Hemingway *et al.* 1989; Vatandoost *et al.* 1996).

El *para*-canal de sodio es un complejo de proteínas de más de 2000 aminoácidos, compuesto por 4 dominios homólogos separados por enlaces hidrofílicos. Cada uno de estos dominios contiene 6 α -hélices hidrofóbicas extendidas sobre la membrana (S1-S6) y cuyas secuencias contribuyen a las propiedades funcionales del canal (Loughney *et al.* 1989).

El gen *Para*, el cual codifica el canal de sodio, se clonó originalmente de *D. melanogaster* (Loughney *et al.* 1989) pero la primera mutación confiriendo resistencia, denominada "Resistencia Knockdown" o *kdr*, se identificó en *Musca domestica* Linnaeus (Williamson *et al.* 1993). Los fenotipos *kdr* poseen una mutación puntual (Leu1014Fen) en el segmento transmembranal S6 del dominio II, la cual produce 10-30 veces resistencia a DDT y piretroides en *M. domestica* (Williamson *et al.* 1996). Esta mutación se ha identificado en insectos resistentes a piretroides pertenecientes a los órdenes Diptera (*M. domestica*, *An. gambiae* Giles), Blattodea (*Blattella germanica* (Linnaeus)) (Dong 1997), Lepidoptera (*Plutella xylostella* Linnaeus) (Schuler *et al.* 1998) y Hemiptera (*M. persicae*) (Martínez-Torres *et al.* 1999).

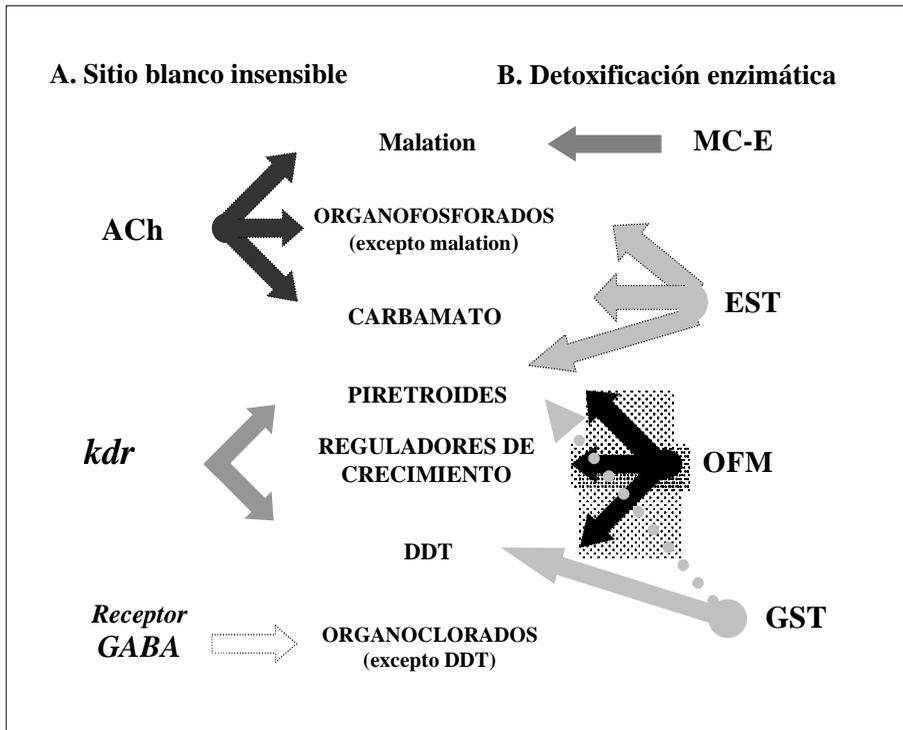


Figura 1. Mecanismos de Resistencia a Insecticidas. *AchE*: Acetilcolinesterasa Inhibida. *Kdr*: resistencia "Knockdown". *GST*: Glutathion S-transferasas. *EST*: Esterasas inespecíficas. *OFM*: Oxidasas de función mixta. *MC-E*: Malation carboxil-esterasas.

Otras mutaciones puntuales en el mismo nucleótido (Leu1014His: *An. gambiae*. Leu1014Ser: *An. gambiae*, *Culex pipiens* Linnaeus) también confieren resistencia a DDT y piretroides, aunque con menor frecuencia (Martínez-Torres *et al.* 1998; Ranson *et al.* 2000a).

Una sustitución adicional encontrada en cepas de *M. domestica*, Metionina918-Treonina, cerca al dominio IIS4-S5, en combinación con la mutación Leu1014-Fen, presenta niveles elevados de resistencia a piretroides (más de 500 veces), denominándose resistencia *super-kdr* (Williamson *et al.* 1996). Esta mutación no tiene efecto sobre la dependencia de voltaje del canal de sodio pero sí reduce la disponibilidad de los canales e incrementa la tasa de inicio y recuperación de la inactivación (Vais *et al.* 2001).

Martínez-Torres *et al.* (1998) desarrollaron una prueba diagnóstica basada en la amplificación por PCR de alelos específicos, la cual permite discriminar entre individuos homocigóticos susceptibles, homocigóticos resistentes y heterocigóticos con la mutación Leu1014Fen. Debido a que el fenotipo *kdr* es semi o totalmente recesivo (Paton *et al.* 2000), con genes de resistencia en bajas frecuencias, la capacidad de identificar heterocigóticos es importante en la detección temprana y manejo de la resistencia en el

campo. Esta prueba diagnóstica ha sido modificada por Ranson *et al.* (2000a) para identificar la mutación Leu1014Ser en *An. gambiae*.

En *Drosophila* se ha usado un enfoque diferente para aislar mutantes tipo *kdr* utilizando un método basado en el fenotipo de sensibilidad a la temperatura. De esta forma se han identificado dos clases de mutaciones ubicadas en posiciones equivalentes a las mutaciones *kdr* y *super-kdr* pero hasta la fecha no se ha establecido su papel en el desarrollo de resistencia (Ffrench-Constant *et al.* 1998).

1.3. Acetilcolinesterasas (*AchE*)

La acetilcolinesterasa es una enzima clave en el sistema nervioso al catalizar la hidrólisis del neurotransmisor Acetilcolina sobre las membranas de los nervios post-sinápticos. En insectos, la forma molecular predominante es un dímero anfífilo globular anclado en la membrana mediante un glicolípido (Vontas *et al.* 2002). *AchE* es el principal blanco para organofosforados y carbamatos, los cuales inhiben la actividad enzimática mediante fosforilación covalente o carbamilatando el residuo de serina dentro del sitio activo (Corbett 1974).

La resistencia a insecticidas mediada por *AchE* está relacionada con cambios cua-

litativos y cuantitativos en la enzima y con mutaciones puntuales generalmente acompañadas por modificación de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de acetilcolina. Tales mutaciones involucran sustituciones de aminoácidos en el sitio activo de la enzima (Walsh *et al.* 2001).

En general, los niveles de insensibilidad a insecticidas conferidos por cada sustitución individual son bajos pero en combinación producen enzimas altamente resistentes. El alto número de mutaciones puntuales en *AchE* contrasta con las pocas mutaciones responsables para resistencia fuerte, encontradas en otros sitios blancos alterados (GABA o *kdr*). Este número elevado de mutaciones presentes en *AchE* se atribuye a la comunalidad sustrato-análogo insecticida y los receptores de acetilcolina (Vontas *et al.* 2002). Se han registrado mutaciones específicas en *AchE* que confieren resistencia en *D. melanogaster* Meigen (Mutero *et al.* 1994) y *M. domestica* (Walsh *et al.* 2001).

En *Cx. pipiens* existen mínimo dos genes, *AchE1* y *AchE2*, los cuales se diferencian en su especificidad de sustrato, sensibilidad y patrones de migración electroforética (Malcolm *et al.* 1998). *AchE2* es ligado al sexo pero aun no ha sido asociado con resistencia. En *Ae. aegypti* y *An. stephensi*, también se han identificado genes *AchE* aunque son pocas las referencias de mecanismos de resistencia basados en *AchE* en estas especies (Vaughan *et al.* 1998). Estos genes también están ligados al sexo. Esto sugiere que los genes clonados a partir de estos mosquitos no representan el sitio blanco del insecticida o por el contrario, si existe la resistencia basada en *AchE* alterada, ésta debe estar ligada al sexo en estas especies (Hemingway y Ranson 2000).

En *Drosophila* se han identificado cinco mutaciones puntuales dentro del gen *AchE* asociadas con resistencia a organofosforados y carbamatos (Mutero *et al.* 1994). Estas mutaciones también se han identificado mediante estudios de mutagénesis sitio-dirigida en el gen *AchE* de *Ae. aegypti* (Milatovic *et al.* 1997), pero ninguna de ellas se ha identificado en cepas coleccionadas en el campo o seleccionadas en el laboratorio.

2. Incremento en la tasa de detoxificación de los insecticidas

En el metabolismo de los insecticidas se involucran principalmente tres familias enzimáticas: carboxilesterasas, glutathion S-transferasas (*GST*) y mono-oxigenasas.

La actividad de una o más de estas enzimas a menudo es elevada en poblaciones de insectos resistentes, pero en contraste con la resistencia dada por alteraciones en el sitio blanco, no se conocen totalmente los mecanismos moleculares de esta resistencia metabólica. La identificación de enzimas involucradas en la resistencia a insecticidas se complica además por la complejidad de tales familias enzimáticas y las dificultades para identificar genes ortólogos entre diferentes especies de insectos (Ranson *et al.* 2002a).

2.1. Carboxil-esterasas

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de ésteres carboxílicos y se han asociado como primer mecanismo de resistencia a organofosforados, carbamatos y en menor proporción a piretroides (Hemingway y Karunaratne 1998). Se han encontrado niveles elevados de esterasas inespecíficas en el 90% de los casos de tolerancia a insecticidas y en más de 30 especies de insectos resistentes (Hemingway *et al.* 2000).

Las esterasas comprenden seis familias proteicas pertenecientes a la superfamilia α/β hidrolasas (Cygler *et al.* 1993). En Diptera, estas enzimas son codificadas por un grupo de genes sobre el mismo cromosoma (Cr. 3R), donde cada uno de sus miembros puede sufrir modificaciones que confieren resistencia. Tales modificaciones pueden ser cambios aminoacídicos que alteren la especificidad del sustrato (encontrado en *An. arabiensis* Patton, *An. stephensi*, *An. culicifacies* Giles), presencia de múltiples copias génicas amplificadas en insectos resistentes (*Cx. quinquefasciatus* Say, *Cx. tarsalis* Coquillett, *Cx. pipiens*, *Cx. tritaeniorhynchus* Giles), mutaciones puntuales (*An. arabiensis*, *An. culicifacies*, *An. stephensi*) o sobreproducción constitutiva (*An. albimanus*, *An. culicifacies*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tarsalis*) (Hemingway y Ranson 2000).

Bioquímicamente, las esterasas actúan uniéndose rápidamente al insecticida pero liberando lentamente los metabolitos de éste, es decir, secuestrando el insecticida antes que llegue a su sitio de acción. Lo anterior requiere altas cantidades de estas enzimas debido a la estequiometría de la reacción, desencadenando la sobreproducción enzimática y por ende el desarrollo de resistencia (Karunaratne *et al.* 1993). Molecularmente, el mecanismo más común de resistencia mediado por esterasas es la co-amplificación de los genes *est α 2¹* y

est β 2¹, los cuales presentan distribución mundial y cuya base bioquímica y molecular de resistencia ha sido bien caracterizada en el mosquito *Cx. quinquefasciatus* (Vaughan *et al.* 1997).

La alta homología entre los genes *est α* y *est β* sugiere que éstos han surgido como resultado de un evento ancestral de duplicación génica (Raymond *et al.* 1991). Los genes *est α 2¹* y *est β 2¹* se encuentran en el mismo amplicón alejados 2.7 kb en insectos resistentes y solo 1.7 kb en insectos susceptibles. La diferencia está dada por la presencia de tres inserciones en el espacio intergénico amplificado (Vaughan *et al.* 1997). Las inserciones pueden haber introducido elementos reguladores adicionales (Hemingway *et al.* 1998).

Recientemente se ha descrito co-amplificación de *est α 2¹* y *est β 2¹* ligada a un tercer gen, aldehído oxidasa, el cual a su vez se encuentra co-elevado dentro del mismo amplicón con tales alelos pero no con otros genotipos de esterasas (Hemingway *et al.* 2000).

El análisis de fragmentos de restricción y homología de secuencias en cepas de insectos resistentes procedentes de distintos continentes, ha permitido confirmar que la co-amplificación de *est α 2¹* y *est β 2¹*, posee un origen único y se ha propagado mundialmente (Hemingway y Karunaratne 1998; Raymond *et al.* 1998). Esta rápida e inesperada migración de insectos resistentes sugiere una gran ventaja en la eficacia biológica de los portadores de este amplicón en presencia del insecticida (Hemingway y Karunaratne 1998), resultando en serias implicaciones para el control del vector y la enfermedad.

Otros fenotipos de resistencia más variables y menos comunes involucran coamplificación de *est α 3* y *est β 1*, o amplificación individual de *est β 1*, o *est α 1* y *est α 5¹*, los cuales presentan distribución geográfica restringida (Guillemaud *et al.* 1997; Severini *et al.* 1997; Vaughan *et al.* 1997). La región cromosómica que contiene estos genes de esterasas, presumiblemente representa un punto susceptible de amplificación, una teoría sustentada por la amplificación de genes esterasa β homólogos en *Cx. tritaeniorhynchus* (Karunaratne *et al.* 1998).

2.2. Glutation-S-transferasas

La enzima Glutation S-transferasa (GST) pertenece a una gran familia de isoenzimas multifuncionales involucradas en el metabolismo, detoxificación y excre-

ción de un amplio rango de xenobióticos incluyendo los insecticidas. Ellas se encargan de proteger a las células del estrés oxidativo y de los tóxicos químicos, catalizando la conjugación de los componentes electrofílicos con el grupo tiol de la glutatión reducida (GSH), obteniendo productos más hidrosolubles y de mayor excreción (Salinas y Wong 1999).

En eucariontes se han identificado más de 40 genes GST clasificados en 13 grupos según la identidad de sus secuencias, propiedades inmunológicas y en algunos casos, especificidad de sustrato (Sheehan *et al.* 2001). En insectos se han reconocido solo tres clases: *Delta*, *Sigma* y *Epsilon* (Ranson *et al.* 2001), las cuales están potencialmente relacionadas con el desarrollo de resistencia a insecticidas.

GST se asocia principalmente con resistencia a DDT (catalizando la dehidroclorinación del DDT a su metabolito menos tóxico DDE) (Clark y Shamaan 1984), organofosforados y recientemente piretroides (Kostaropoulos *et al.* 2001; Vontas *et al.* 2001), a través de mecanismos de cambio en la especificidad del sustrato (*An. gambiae*), niveles elevados de actividad (*An. gambiae*, *An. dirus* Peyton & Harrison, *An. stephensi*, *An. subpictus* Grassi, *An. culicifacies* y *Aedes aegypti*) y regulación génica (con posible amplificación) (*An. gambiae*, *An. dirus* y *Ae. aegypti*), aunque los elementos reguladores que controlan la expresión de GST no se han identificado aún (Hemingway y Ranson 2000).

GST de la clase *Delta* son codificadas por una familia multigénica. En *D. melanogaster* y *An. gambiae* tal familia se encuentra agrupada (Toung *et al.* 1993; Ranson *et al.* 1998), en contraste con *M. domestica*, donde estos genes se encuentran dispersos a través de todo el genoma (Zhou y Syvanen 1997). Los genes de esta subfamilia han sido localizados sobre el cromosoma 2R, división 18B y 19D y se expresan en niveles elevados tanto en larvas como adultos de *An. gambiae* (Ranson *et al.* 1998; Ranson *et al.* 2001). La familia GST de la clase *Sigma* consiste de un único gen en todas las tres especies (Beall *et al.* 1992; Reiss y James 1993). Se ha observado que la resistencia a DDT en *An. gambiae* es diferencial dependiendo del estadio de su ciclo de vida; así, el gen *GSTs1* se expresa en larvas pero su detección es escasa en insectos adultos, estadio responsable de la transmisión de malaria (Reiss y James 1993).

Recientemente se ha descrito GST clase *Epsilon* en *An. gambiae* y se sugiere que representa la mayor familia enzimática confiriendo resistencia a DDT en este vector. Se han identificado dos genes codificando enzimas funcionales *GSTe1* y *GSTe2*. Uno de estos genes, *GSTe2*, presenta actividad dehidroclorinasa y niveles de sobre-expresión cinco veces mayores en cepas resistentes que en cepas susceptibles (Ranson *et al.* 2001). Estos genes se ubican en la división 33B sobre el cromosoma 3R que contiene uno de los dos mayores loci (*rtd1*) para rasgos cuantitativos asociados con resistencia a DDT (Ranson *et al.* 2000b). Ranson *et al.* (2001) propusieron que *rtd1* podría ser un elemento regulador actuando en *Cis*, el cual estaría controlando la expresión de los genes GST clase *Epsilon*. Si múltiples miembros de esta familia génica están bajo el control de un factor regulador común, una mutación en este factor podría explicar la elevada actividad de GST observada en ensayos bioquímicos (Ding *et al.* 2003).

Un estudio sobre las propiedades bioquímicas e inmunológicas de la subfamilia *Epsilon* identificó un alelo *GSTe1K*, el cual presentó altos niveles de actividad peroxidasa (Ortelli *et al.* 2003). En *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae) se ha demostrado que la actividad de peroxidasa protege contra daños causados por productos de la peroxidación lipídica inducidos por la exposición a piretroides (Vontas *et al.* 2001). Aunque este mecanismo no se ha identificado en mosquitos, es posible que insectos portadores de este alelo posean ventajas en su eficacia biológica en presencia de insecticidas (Ortelli *et al.* 2003).

2.3. Citocromos P450

Los citocromos P450 son una superfamilia de hemoproteínas responsables del metabolismo oxidativo de una amplia variedad de componentes exógenos (aleloquímicos vegetales, promutágenos e insecticidas) y endógenos (hormonas juveniles, ecdiesteroides, feromonas) del metabolismo (Scott y Wen 2001). P450 han sido encontrados en todos los sistemas vivos y en un rango diverso de especies de insectos, incluyendo Diptera (Scott 1999), Lepidoptera (Rose *et al.* 1997) y Coleoptera (Sharf *et al.* 2001).

Se ha identificado resistencia mediada por P450 para casi todas las clases de insecticidas, principalmente piretroides (Berge *et al.* 1998), organoclorados y reguladores de crecimiento (Brogdon y McAllister

1998a). Se proponen dos posibles mecanismos genéticos: (1) Cambios estructurales en P450s específicos o (2) Niveles elevados de expresión de P450s. Mutaciones puntuales dentro de genes estructurales P450 pueden resultar en actividades catalíticas incrementadas o alta afinidad por el insecticida (Scott y Wen 2001). Algunos estudios han registrado sobre-expresión constitutiva (CYP6G1, CYP12D1) e inducción post exposición a DDT (CYP12D1) en cepas de insectos resistentes (Brandt *et al.* 2002), pero en pocos casos se ha establecido conexión definitiva entre la expresión elevada de un gen P450 específico y el desarrollo de resistencia.

En *D. melanogaster* se han aislado 83 genes putativos para codificar P450s funcionales. Estos han sido clasificados en 25 familias, pero más del 50% pertenece a las familias CYP4 o CYP6 (Tijet *et al.* 2001). Recientemente, Daborn *et al.* (2002) utilizando análisis de microarreglos sobre todos los P450s de *D. melanogaster* demostraron que *DDT-R*, un gen que confiere resistencia a DDT, está asociado con un incremento en la transcripción del gen *Cyp6g1*. Esto se confirmó mediante análisis transgénicos de *Cyp6g1*, los cuales demostraron que la transcripción es necesaria y suficiente para el desarrollo de resistencia.

En *An. albimanus* se identificaron 17 genes que codifican proteínas de las familias CYP4 y CYP9. En *An. gambiae* se identificaron 34 genes P450: 14 genes pertenecientes a la familia CYP6, 18 genes para CYP4 y 2 para CYP9. Estos genes se localizan en el cromosoma 3R, división 30A (CYP6), cromosoma 2R, división 13C (CYP6P) y división 12C (CYP4H) (Ranson *et al.* 2002b). Lo anterior se relaciona con la identificación de dos loci de resistencia para permetrina, uno de los cuales se localiza en el cromosoma 3R, división 30 (Ranson *et al.* 2002b). La co-localización de este loci de resistencia con un grupo de genes P450, plantea el papel de una o más de estas proteínas en conferir resistencia a piretroides en *An. gambiae*.

2.4. Aldehído Oxidasa

En vertebrados superiores, la enzima aldehído oxidasa está involucrada en el metabolismo oxidativo de xenobióticos y en la reducción de nitrosaminas, ácidos hidroxámicos, N-óxidos, hidrocarburos aromáticos nitropolicíclicos, colorantes azo y sulfóxidos (Calzi *et al.* 1995), pero

existen pocos estudios sobre su papel en el metabolismo de los insectos.

Esta enzima pertenece al grupo de hidrolasas que contienen Molibdeno. Se asume que para todas las enzimas de este grupo, los sustratos actúan en el molibdeno central, reduciéndolo del estado Mo(VI) a Mo(IV). Posteriormente, los equivalentes reductores son transferidos vía centros de sulfuro de hierro y la enzima es re-oxidada por interacción con el oxígeno (Turner *et al.* 1995).

Esta enzima se describió por primera vez para insectos en la cepa PELRR resistente de *Cx. quinquefasciatus* (Hemingway *et al.* 2000). El gen que codifica esta enzima fue identificado en ligamiento con el gen *est α* , dentro del amplicón de 30 kb asociado con resistencia a insecticidas el cual contiene los genes *est α 2'* y *est β 2'*. Lo anterior coincide fuertemente con estudios previos de mapeo genético en *An. albimanus* (Narang y Seawright 1983) y sugiere una ventaja selectiva de los individuos portadores de este amplicón con respecto a los amplicones que contienen otras esterasas (Coleman *et al.* 2002).

Coleman *et al.* (2002), mediante análisis de secuenciación y clonación, identificaron para aldehído oxidasa una secuencia de 1266 aminoácidos, la cual transcribe una proteína de 150 kDa. Análisis por RT-PCR en cepas susceptibles y resistentes sugieren que el gen amplificado es transcrito en todas las fases del ciclo de vida de los mosquitos, presentando mayor actividad en larvas resistentes, con un pico en los estadios 3 y 4, disminuyendo progresivamente en pupas y adultos.

Aunque el papel específico del gen aldehído oxidasa en la resistencia a insecticidas no se ha determinado totalmente, se ha demostrado que insecticidas como el paration y herbicidas conteniendo el grupo aldehído son reconocidos como sustratos o inhibidores enzimáticos (Hemingway *et al.* 2000). Trabajos realizados en mamíferos han involucrado esta enzima en el desarrollo del sistema nervioso central, uno de los principales blancos de acción de los insecticidas (Calzi *et al.* 1995), lo cual es otra evidencia de su posible papel en la resistencia a insecticidas.

Resistencia Cruzada

La resistencia cruzada implica el mismo mecanismo de resistencia para dos clases de insecticidas no relacionados (Najera y Zaim 2002). Este tipo de resistencia se pre-

senta principalmente entre piretroides y DDT en diferentes especies de insectos. Registros de resistencia tipo *kdr* en *An. gambiae* en África oriental postulan que la resistencia ha sido seleccionada por el uso temprano de DDT y/o el uso agrícola de piretroides (Chandre *et al.* 1999). La resistencia cruzada es específica de producto más no del tipo de insecticida, lo cual se ha demostrado en *An. stephensi* donde la resistencia a permetrina no confiere resistencia cruzada a deltametrina en larvas y adultos pero sí a otros cianopiretroides (Curtis y Townson 1998) y Etofenprox (Curtis 1993). Recientemente se ha registrado resistencia cruzada tipo *kdr* en *Ae. aegypti* (Bregues *et al.* 2003). La presencia de resistencia cruzada tipo *kdr* entre DDT y piretroides amenaza el uso de piretroides tanto en rociamientos intradomiciliarios como en toldillos impregnados para el control de malaria.

Un estudio realizado en *An. funestus* Giles demostró elevados niveles de resistencia a piretroides pero no a DDT (Hargreaves *et al.* 2000). Estas evidencias han motivado la idea de restaurar los programas de rociamiento con DDT en países como Madagascar y en la provincia de Kwazulu/Natal en Sur África, en áreas donde se advierte alta transmisión de malaria (Brooke *et al.* 2001). El impacto del uso reciente de DDT ha sido asociado con una reducción del 60% de los casos de malaria durante el 2001 en Sur África (Curtis 2002).

Detección y Vigilancia de la Resistencia

La capacidad de prevenir o retardar la evolución del desarrollo de resistencia a insecticidas se fundamenta en la implementación de estrategias para el manejo y vigilancia de la resistencia. Tres aspectos importantes en el diseño de tales estrategias son (1) el establecimiento de líneas-base de susceptibilidad, (2) la identificación de los mecanismos de resistencia y (3) el uso de métodos que vigilen las frecuencias de resistencia y el efecto de las estrategias de control (Brogdon y McAllister 1998a).

La identificación de los mecanismos de resistencia determina el espectro de resistencia cruzada, facilita la escogencia de insecticidas alternativos y permite el mapeo detallado de áreas con poblaciones resistentes. Los bioensayos o pruebas biológicas tienen la capacidad de encontrar casos de resistencia producidos por cualquiera de los diferentes mecanismos bioquímicos o neurofisiológicos.

La OMS (WHO 1981) implementó el uso de papeles impregnados con insecticidas o sinergistas en dosis estandarizadas, basados en la correlación entre mortalidad vs tiempo de exposición y mortalidad vs dosis letales. Otra alternativa para la realización de los bioensayos es el uso de botellas de vidrio impregnadas con insecticidas la cual ha sido estandarizada por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades en Estados Unidos (CDC). Esta aproximación simplifica el procedimiento de los bioensayos convencionales e incrementa la cantidad de información que puede obtenerse de un grupo limitado de mosquitos (Brogdon y McAllister 1998b).

Debido a que los piretroides causan inducción de parálisis temporal, más conocida como "knockdown", se ha asociado la resistencia a piretroides con un incremento significativo en el tiempo de noqueo antes de disminuir la mortalidad, por lo que dicho tiempo es un buen indicador para la detección temprana de resistencia a piretroides (WHO 1992) y puede incluirse en los programas de vigilancia de resistencia a estos insecticidas al aportar información inicial acerca de la resistencia basada en el gen *kdr* (Chandre *et al.* 1999).

Los métodos bioquímicos y moleculares pueden identificar mecanismos específicos de resistencia y detectar genes de resistencia cuando éstos aun estén en bajas frecuencias y utilizando un número mínimo de insectos (Brogdon 1984). Las pruebas bioquímicas están disponibles para la evaluación de esterasas inespecíficas, oxidasas de función mixta, glutatión S-transferasas y acetilcolinesterasas inhibidas, las cuales pueden ser detectadas en un mismo individuo. Aunque las pruebas están inicialmente diseñadas para realizarse en condiciones de laboratorio, pueden estandarizarse bajo condiciones de campo directamente en las áreas de vigilancia.

Actualmente se dispone de estudios comparativos de la estructura y función de los genomas totales de *An. gambiae* y *D. melanogaster* (Ranson *et al.* 2000b). Estos análisis permitirán descubrir nuevas moléculas hormonales, neuronales y reguladoras que puedan utilizarse como blancos para el desarrollo de nuevas clases de insecticidas; Igualmente, los avances recientes en genómica funcional permitirán determinar los cambios moleculares precisos que resulten en fenotipos de resistencia, contribuyendo así al manejo

de la resistencia en las poblaciones de campo (Hemingway *et al.* 2002).

Para el manejo de la resistencia se están desarrollando numerosas herramientas, desde nuevos insecticidas químicos hasta mosquitos transgénicos. Se han considerado también distintas estrategias, entre ellas el uso de mezclas de insecticidas con diferentes modos de acción (Corbel *et al.* 2002), las cuales deben producirse industrialmente. Entre las estrategias más comunes se encuentran la aplicación de insecticidas en mosaico y rotaciones. La aplicación en mosaico consiste en dividir el área a tratar en zonas, seleccionar dos insecticidas de resistencia no cruzada y aplicar en cada zona uno de éstos (Ej., alternando piretroides y organofosforados). En la estrategia de rotación se aplica un insecticida en un ciclo y otro, que no sea de resistencia cruzada, en el ciclo siguiente. (Por Ej., piretroides – organofosforados /carbamatos) (Penilla *et al.* 1998).

Se han desarrollado modelos matemáticos y simulaciones *in vitro* de la evolución de los genes de resistencia asociados a diferentes patrones de usos de los insecticidas (Tabashnik 1990), pero estos modelos no han sido aplicados en estudios de campo dada la dificultad práctica de estimar correctamente los cambios en las frecuencias de los genes de resistencia en los programas de control químico aplicados en gran escala (Penilla *et al.* 1998; Hemingway y Ranson 2000).

Conclusiones

Todos los insecticidas químicos ejercen, en mayor o menor extensión, presiones selectivas sobre las poblaciones de insectos que intentan controlar; por lo cual, en un tiempo las poblaciones resistentes comienzan a emerger. El tiempo necesario para el desarrollo de resistencia depende de numerosos factores incluyendo la frecuencia y naturaleza de los genes de resistencia, las estrategias para su manejo, las dosis y frecuencias de aplicación de los insecticidas y la eficacia biológica de las poblaciones resistentes en relación con las susceptibles. Mientras no haya alternativas efectivas al uso del control químico, éste debe enmarcarse en programas de control integrado, adaptándose a las condiciones locales con énfasis en la rotación de insecticidas a fin de prevenir, retardar o revertir el desarrollo futuro de resistencia en las poblaciones de insectos vectores. Es indispensable en los programas de control de las enfermedades transmitidas por vectores el uso de mé-

todos que vigilen las frecuencias de resistencia y el efecto de las estrategias de control. Todas las decisiones sobre el uso de insecticidas deben tomarse considerando los componentes del manejo de la resistencia y el impacto mínimo sobre los humanos, los organismos no blanco y el ambiente.

Literatura citada

- BEALL, C.; FYRBERG, C.; SONG, S.; FYRBERG, E. 1992. Isolation of a *Drosophila* gene encoding glutathione S-transferase. *Biochemical Genetics* 30: 515-527.
- BERGE, J. B.; FEYEREISEN, R.; AMICHOT, M. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 353: 1701-1705.
- BERMÚDEZ, I.; HAWKINS, C. A.; TAYLOR, A. M.; BEADLE, D. J. 1991. Actions of insecticides on the insect GABA receptor complex. *Journal of Receptor Research* 11: 221-232.
- BERTICAT, C.; BOQUIEN, G.; RAYMOND, M.; CHEVILLON, C. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* 79: 41-47.
- BRANDT, A.; SHART, M.; PEDRA, J. H. F.; HOLMES, G.; DEAN, A.; KREITMAN, M.; PITTENDRIGH, B. R. 2002. Differential expression and induction of two *Drosophila* cytochrome P450 genes near the *Rst(2)DDt* locus. *Insect Molecular Biology* 11: 337-341.
- BRENGUES, C.; HAWKES, N. J.; CHANDRE, F.; MCCARROLL, L.; DUCHON, S.; GUILLET, P.; MANGUIN, S.; MORGAN, J. C.; HEMINGWAY, J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 87-94.
- BROGDON, W. G. 1984. Mosquito protein microassay. I. Protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry* 79: 457-9.
- BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. 1998a. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases* 4: 605-613.
- BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. 1998b. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14: 159-164.
- BROOKE, B. D.; KLOKE, G.; HUNT, R. H.; KOEKEMOER, L. L.; TEMU, E. A.; TAYLOR, M. E.; SMALL, G.; HEMINGWAY, J.; COETZEE, M. 2001. Bioassay and biochemical analysis of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research* 91: 265-272.
- BROWN, A. W. A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *Journal of the American Mosquito Control Association* 2: 123-140.
- CALZI, M.; RAVILO, C.; GHIBAUNDI, E.; DE GIOIA, L.; SALMONA, M.; CAZZANIGA, G.; KUROSAKI, M.; TERAIO, M.; GARATTINI, E. 1995. Purification, cDNA cloning and tissue distribution of bovine liver aldehyde oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 31037-31045.
- CHANDRE, F.; DARRIER, F.; MANGA, L.; AKOGBETO, M.; FAYE, O.; MOUCHET, J.; GUILLET, P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization* 77(3): 230-234.
- CLARK, A. G.; SHAMAAN, N. A. 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the housefly is a glutathione S-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 22: 249-261.
- COLEMAN, M.; VONTAS, J. G.; HEMINGWAY, J. 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus*. *European Journal of Biochemistry* 269: 768-779.
- CORBEL, V.; DARRIET, F.; CHANDRE, F.; HOUGARD, J. M. 2002. Insecticide Mixtures for Mosquito Net Impregnation Against Malaria Vectors. *Parasite* 9: 255-259.
- CORBETT, J. R. 1974. *The Biochemical mode of action of pesticides*. Academic Press, London, UK. pp. 102-130.
- CURTIS, C. F. 1993. Workshop on bednets at the International Congress of Tropical Medicine. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*. 44: 65-68.
- CURTIS, C. F. 2002. Should the use of DDT be revived for malaria vector control? *Biomedica* 22: 455-61.
- CURTIS, C. F.; TOWNSON, H. 1998. Malaria: existing methods of vector control and molecular entomology. *British Medical Bulletin* 54: 311-325.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D.; SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; SILMAN, I.; GENTRY, M. K. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Science* 2: 366-82.
- DABORN, P. J.; YEN, J. L.; BOGWITZ, M. R.; LEGOFF, G.; FEIL, E.; JEFFERS, S.; TIJET, N.; PERRY, T.; HECKEL, D.; BATTERMAN, P.; FEYEREISEN, R.; WILSON, T. G.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253-2256.
- DING, Y.; ORTELLI, F.; ROSSITER, L. C.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *Genomics* 13: 4-35.
- DONG, K. 1997. A single amino acid change in the *para* sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in German cockroaches. *Insect Molecular Biology* 27: 93-100.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; STEICHEN, J.; ROCHELAU, T. A.; ARONSTEIN, K.; ROUSH, R. T. 1993a. A single amino-acid substitution in a γ -aminobutyric acid subtype. A receptor locus associated with *Ciclodione* insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1957-1961.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; ROCHELAU, T. A.; STEICHEN, J. C.; CHALMERS, A. E. 1993b. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363: 449-451.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; PITTENDRIGH, B.; VAUGHAN, A.; ANTHONY, N. 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 353: 1685-1693.
- GAZAVE, E.; CHEVILLON, C.; LENORMAND, T.; MARQUINE, M.; RAYMOND, M. 2001. Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito *Culex pipiens*. *Heredity* 87: 441-448.
- GEORGHIOU, G. P. 1990. Overview of insecticide resistance. Pages 18-41. In: M. B. Green, H.M. LeBaron and W. K. Moberg (eds.). *Managing resistance to agrochemical from fundamental research to practical strategies*. American Chemical Society Series. 421, Washington. DC. 421 p.
- GUILLEMAUD, T.; MAKATE, N.; RAYMOND, M.; HIRST, B.; CALLAGHAN, A. 1997. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 6: 319-327.
- HARGREAVES, K.; KOEKEMOER, L. L.; BROOKE, B. D.; HUNT, R. H.; MTHEMBU, J.; COHETES, M. 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 181-189.

- HEMINGWAY, J.; BODDINGTON, R. G.; HARRIS, J.; DUNBAR, S. J. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bulletin of Entomological Research* 79: 123-130.
- HEMINGWAY, J.; HAWKES, N.; PRAPANTHADARA, L.; JAYAWARDENA, K. G. I.; RANSON, H. 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 353: 1695-1699.
- HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. P. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 1-12.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology* 45: 371-391.
- HEMINGWAY, J.; COLEMAN, M.; PATON, M.; MCCARROLL, L.; VAUGHAN, A.; DESILVA, D. 2000. Aldehyde Oxidase is coamplified with the World's most common *Culex* mosquito insecticide resistance-associated esterases. *Insect Molecular Biology* 9: 93-99.
- HEMINGWAY, J.; FIELD, L.; VONTAS, J. 2002. An Overview of Insecticide Resistance. *Science* 298: 96-97.
- KARUNARATNE, S. H. P.; JAYAWARDENA, K. G. I.; HEMINGWAY, J.; KETTERMAN, A. J. 1993. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *The Biochemical Journal* 294: 575-579.
- KARUNARATNE, S. H. P.; VAUGHAN, A.; PATON, M. G.; HEMINGWAY, J. 1998. Amplification of a serine esterase gene is involved in insecticide resistance in Sri Lankan *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect Molecular Biology* 7: 307-315.
- KOSTAROPOULOS, I.; PAPAPOULOS, A. I.; METAXAKIS, A.; BOUKOUVALA, E.; PAPAPOULOU—MOURKIDOU, E. 2001. Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroid insecticides. *Insect Molecular Biology* 31: 313-319.
- LENGELER, C.; CATTANI, J.; DE SAVIGNY, D. 1996. Net Gain: A New Method for preventing malaria deaths. *International Development Research Center, Ottawa and World health Organization, Geneva.*
- LOUGHNEY, K.; KREBER, R.; GANETZKY, B. 1989. Molecular analysis of the *para* locus, sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* 58: 1143-1154.
- MALCOLM, C. A.; BOURGUET, D.; ASCOLLILLO, A.; ROOKER, S. J.; GARVEY, C. F. 1998. A sex linked *Ace* gene, not linked to insensitivity acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 7: 107-20.
- MARTÍNEZ-TORRES, D.; CHANDRE, F.; WILLIAMSON, M. S.; DARRIET, F.; BERGE, J. B.; DEVONSHIRRE, A. L.; GUILLET, P.; PASTEUR, N.; PAURON, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 7: 179-184.
- MARTÍNEZ-TORRES, D.; FOSTER, S. P.; FIELD, L. M.; DEVONSHIRRE, A. L.; WILLIAMSON, M. S. 1999. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology* 8: 339-346.
- MILATOVIC, D.; MORETTO, A.; OSMAN, K. A.; LOTTI, M. 1997. Phenyl valerate esterases other than neuropathy target esterase and the promotion of organophosphate polyneuropathy. *Chemical Research in Toxicology* 10(9): 1045-1048.
- MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J. M.; FOURNIER, D. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5922-5926.
- NAJERA, J. A.; ZAIM, M. 2002. Malaria Vector Control: Decision making criteria and procedures for judicious use of insecticides. *WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES), World Health Organization, Geneva.*
- NARANG, S.; SEAWRIGHT, J. A. 1983. Genetic mapping and characterization of an aldehyde oxidase of *Anopheles albimanus*. *Biochemical Genetics* 21: 653-660.
- ORTELLI, F.; ROSITER, L. C.; VONTAS, J.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide resistance locus, from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Biochemical Journal* 373: 957-963.
- PATIL, N. S.; LOLE, K. S.; DEOBAGKAR, D. N. 1996. Adaptive larval thermotolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticide in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology* 10: 277-82.
- PATON, M. G.; KARUNARATNE, S. H. P.; GIAKOUMAKI, E.; ROBERTS, N.; HEMINGWAY, J. 2000. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide resistant *Culex* mosquitoes. *The Biochemical Journal* 346: 17-24.
- PENILLA, R. P.; RODRÍGUEZ, A. D.; HEMINGWAY, J.; TORRES, J. L.; ARREDONDO-JIMÉNEZ, J. I.; RODRÍGUEZ, M. H. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 217-233.
- PHILLIPS, R. S. 2001. Current status of malaria and potential for control. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 208-226.
- QUIÑONES, M. L.; SUÁREZ, M. F.; FLEMING, G. A. 1987. Estado de la susceptibilidad al DDT de los principales vectores de malaria en Colombia y su implicación epidemiológica. *Biomedica* 7: 81-86.
- RANSON, H.; COLLINS, F. H.; HEMINGWAY, J. 1998. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within *Anopheles gambiae* class I GST family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14284-14289.
- RANSON, H.; JENSEN, B.; VULULE, J. M.; WANG, X.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F. H. 2000a. Identification of a novel mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae* associated with resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Molecular Biology* 9: 491-497.
- RANSON, H.; JENSEN, B.; WANG, X.; PRAPANTHADARA, L.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F. H. 2000b. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 9: 499-507.
- RANSON, H.; ROSSITER, L.; ORTELLI, F.; JENSEN, B.; WANG, X.; ROTH, C. H.; COLLINS, F. H.; HEMINGWAY, J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Biochemical Journal* 359: 295-304.
- RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M. V.; UNGER, M. F.; COLLINS, F. H.; FEYEREISEN, R. 2002a. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179-181.
- RANSON, H.; NIKOU, D.; HUTCHINSON, M.; WANG, X.; ROTH, C. W.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F. H. 2002b. Molecular analysis of multiple Cytochrome P450 genes from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 11(5): 409-418.

- RAYMOND, M.; CALLAGHAN, A.; FORT, P.; PASTEUR, N. 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 14; 350: 151-3.
- RAYMOND, M.; CHEVILLON, C.; GUILLEMAUD, T.; LENORMAND, T.; PASTEUR, N. 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 353: 1707-1711.
- REISS, R. A.; JAMES, A. A. 1993. A glutathione S-transferase gene of the vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 2: 25-32.
- ROSE, R. L.; GOH, D.; THOMPSON, D. M.; VERMA, K. D.; HECKEL, D. G.; GAHAN, L. J.; ROE, R. M.; HODGSON, E. 1997. Cytochrome P450 CYP9A1. *Heliothis virescens*: the first member of a new CYP family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 605-615.
- SALINAS, A. E.; WONG, M. G. 1999. Glutathione S-transferases – a review. *Current Medicinal Chemistry* 6: 279-309.
- SCHULER, T. H.; MARTÍNEZ-TORRES, D.; THOMPSON, A. J.; DENHOLM, I.; DEVONSHIRE, A. L.; DUCE, I. R.; WILLIAMSON, M. S. 1998. Toxicological, electrophysiological, and molecular characterization of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 59: 169-182.
- SCOTT, J. G. 1999. Cytochromes P450 and Insecticide Resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 757-777.
- SCOTT, J. G.; WEN, Z. 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science* 57: 958-967.
- SEVERINI, C.; ROMI, R.; MARINUCCI, M.; GUILLEMAUD, T.; RAYMOND, M. 1997. Esterases A5-B5 in organophosphate-resistant *Culex pipiens* from Italy. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 123-126.
- SHARF, M. E.; PARIMI, S.; MEINKE, L. J.; CHANDLER, L. D.; SIEGFRIED, B. D. 2001. Expression and induction of three family cytochrome P450 genes identified from insecticide-resistant and susceptible western corn rootworms. *Insect Molecular Biology* 10: 139-146.
- SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical Journal* 360: 1-16.
- SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. 1989. Neurotoxic action of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology* 34: 77-96.
- SUAREZ, M. F.; QUIÑONES, M. L.; PALACIOS, J. D.; CARRILLO, A. 1990. First Record of DDT Resistance in *Anopheles darlingi*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6: 72-74.
- TABASHNIK, B. E. 1990. Implications of gene amplification for evolution and management of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology* 83: 1170-1176.
- THOMPSON, M.; SHOTKOSKI, F.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. 1993. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letters* (Netherlands). 325: 187-190.
- TIJET, N.; HELVIG, C.; FEYEREISEN, R. 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262: 189-198.
- TOUNG, Y-P. S.; HSIEH, T.; TU, C-P. D. 1993. The glutathione S-transferase D genes: a divergently organized, intronless gene family in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 9737-9746.
- TURNER, A.; DOYLE, W. A.; VENTOM, A. M.; BRAY, R. C. 1995. Properties of rabbit liver aldehyde oxidase and the relationship of the enzyme to Xanthine Oxidase and dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* 232: 646-657.
- VAIS, H.; WILLIAMSON, M. S.; DEVONSHIRE, A. L.; USHERWOOD, P. N. R. 2001. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Management Science* 57: 877-888.
- VATANDOOST, H.; MCCAFFERY, A. R.; TOWNSON, H. 1996. An electrophysiological investigation of target site insensitivity mechanisms in permethrin-resistant and susceptibility strains of *Anopheles stephensi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 216.
- VAUGHAN, A.; HAWKES, N.; HEMINGWAY, J. 1997. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide resistance *Culex quinquefasciatus*. *The Biochemical Journal* 325: 359-365.
- VAUGHAN, A.; CHADEE, D. D.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. 1998. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitos from Trinidad. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 318-321.
- VONTAS, J. G.; SMALL, G. J.; HEMINGWAY, J. 2001. Glutathione S-transferase as antioxidant defense agents confers pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *The Biochemical Journal* 357: 365-372.
- VONTAS, J. G.; HEJAZI, M. J.; HAWKES, N. J.; COSMIDIS, N.; LOUKAS, M.; HEMINGWAY, J. 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* 11: 329-336.
- WALSH, S. B.; DOLDEN, T. A.; MOORES, G. D.; KRISTENSEN, M.; LEWIS, T.; DEVONSHIRE, A. L.; WILLIAMSON, M. S. 2001. Identification and characterization of mutations in house fly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *The Biochemical Journal* 359: 175-181.
- WHO. 1975. Manual on Practical Entomology in Malaria. Part II. Methods and Techniques. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 1981. Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides. WHO Technical Report Series No 737, 87 pp. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. WHO Technical Report Series No 818, 55 pp. World Health Organization, Geneva.
- WILLIAMSON, M. S.; DENHOLM, I.; BELL, C. A.; DEVONSHIRE, A. L. 1993. Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics* 240: 17-22.
- WILLIAMSON, M. S.; MARTÍNEZ-TORRES, D.; HICK, C. A.; DEVONSHIRE, A. L. 1996. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroids insecticides. *Molecular and General Genetics* 252:51-60.
- ZHOU, Z. H.; SYVANEN, M. 1997. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Molecular and General Genetics* 256: 187-194.

Sección Agrícola

Digestion of the inhibitor α AI by *Hypothenemus hampei* aspartic proteinases

Digestión de un inhibidor de α AI por aspartico proteinasas de *Hypothenemus hampei*

ARNUBIO VALENCIA J.^{1*}, JORGE W. ARBOLEDA V.²

Summary. The digestive fluid of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, larvae contains aspartic proteases, which show greatest activity at pH 3,0 and a temperature of 40°C. By using isoelectric focusing gels, it was possible to observe two well-defined bands in the intestinal tract. The band of highest activity was found very close to the anodic side and showed a *pI* of 5,2. The addition of 0,1 μ M of Pepstatin A caused a 70% inhibition of protease activity and a 90% inhibition when the concentration was 1 μ M. The strong inhibition of the protease activity in the intestinal tract of *H. hampei* after addition of Pepstatin A, allowed us to identify this protease as an aspartic-type protease. Other results permitted us to classify this protease as Cathepsin D given that when BSA was used as a substrate the enzyme only showed 20% of the total activity with respect to hemoglobin. Incubation of the α AI inhibitor from *Phaseolus vulgaris* with increasing amounts of this intestinal enzyme from the coffee berry borer, showed that the biological activity of the inhibitor was significantly reduced due to the proteolytic activity. This work constitutes the first electrophoretic evidence of α AI proteolysis of *P. vulgaris* by endogenous proteases from *H. hampei*.

Key words: Enzymes. Coffee berry borer. Cathepsin.

Resumen. El fluido digestivo de las larvas de la broca de café, *Hypothenemus hampei* contiene aspártico proteasas, las cuales muestran una gran actividad a pH 3,0 y a una temperatura de 40°C. Mediante el uso de geles de isoelectroenfoque (IEF) fue posible observar dos bandas de actividad bien definidas en el tracto intestinal. La banda de mayor actividad que se encontró muy cerca del ánodo presentó un *pI* de 5,2. La adición de pepstatin A, a una concentración de 0,1 μ M causó una inhibición del 70% de la actividad proteasa y de un 90% cuando la concentración del inhibidor fue de 1 μ M. La fuerte inhibición de la actividad proteasa presente en el tracto intestinal de *H. hampei*, después de la adición del pepstatin A, permitió identificar esta proteasa como del tipo aspártico. Otros resultados permitieron clasificar esta enzima como Cathepsin D, dado que cuando se empleó BSA como sustrato la enzima mostró solo un 20% del total de actividad con respecto a hemoglobina. La incubación del inhibidor de α -amilasas (α AI) de *Phaseolus vulgaris*, con cantidades crecientes de esta enzima intestinal de la broca de café, mostró que la actividad biológica del inhibidor fue reducida significativamente debido a la actividad proteolítica. Este trabajo se constituye en la primera evidencia electroforética de la proteólisis del α AI de *P. vulgaris* por proteasas endógenas de *H. hampei*.

Palabras clave: Enzimas. Broca del café. Cathepsin.

Introduction

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) is not only a major pest in Colombia and other countries, but also a serious economic pest of coffee in many coffee-growing areas of the world (Murphy and Moore 1990; Reid 1983). Insects, as well as other organisms, use proteinase for digestion of proteins that are ingested with their food (Xu and Qin 1994). Usually, the proteinase type is determined by the pH range of activity, by its similarity to well-characterized proteinases and by its sensitivity or susceptibility to different inhibitors (North 1982). Several insect proteases have already been described, isolated and characterized, some of which occur as mixtures of different isozymes, and which are generally simi-

lar in their catalytic activity to those found in vertebrates (Blanco *et al.* 1996; Applebaum 1985). However, some proteinases present major differences in their more important characteristics such as: location, optimal pH activity, kinetic constants and thermostability (Blanco *et al.* 1996).

Most of the midgut proteolytic enzymes in coleopteran insects have been shown to be cysteine proteinases (Murdock *et al.* 1987), or aspartic proteinases often found in combination with other proteinases and which are very active in acid environments, pH normally below 4,5 (Jongsma and Bolter 1997).

Characterizing the major protease activity present in the digestive tract of *H. hampei* larvae is important not only to

understand the protein digestion, but also to know how susceptible to digestion the α AI from *Phaseolus vulgaris* is. Interest in this area has been stimulated by the finding that insect digestive proteases have potential to digest α Amylase inhibitors and to increase by this way their natural resistance to these plant inhibitors (Ishimoto and Chrispeels 1996).

This paper describes the use of specific and general substrates, with a specific inhibitor, to determine the type of protease in the intestinal tract of larvae of *H. hampei* and to assess the role of this protease in the α AI digestion. We believe the present paper to be not only the first report but also the first electrophoretic evidence by using zimograms of α AI proteolysis with endogenous aspartic proteases from *H. hampei*.

1* Corresponding author: Departamento de Fitotecnia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Calle 65 # 26-10, Manizales-Colombia. Tel. + 57-68-812975. Fax: + 57-68-812975. E-mail: arnubio@laciudad.com

2 Disciplina de Entomología, Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ, Colombia. Tel.: +57-68-506550. A.A. 2427 Manizales. E-mail: jwarboleda@terra.com.co

Materials and Methods

Sources of plant inhibitors and insects

Hypothenemus hampei was obtained locally in Colombia and cultivated in an insectary at Cenicafé in Chinchiná, Colombia. *P. vulgaris* cv. L. radical is a local commercial bean in Manizales, Colombia.

Extraction procedures of insect proteases

Fifty insect guts carefully obtained by dissection of whole coffee berry borer larvae were homogenized in 50 µl of citrate buffer 0,05M pH 3,0, filtrated and centrifuged at 10.000g for 30 min at 4°C. The supernatant was freeze-dried and the resulting powder was stored at -80°C and used as a source of enzyme.

Purification of αAI-1

Seeds (20 g) of *P. vulgaris* were ground in a coffee grinder and the powder mixed with 250 ml of distilled water and stirred in the cold room from 6h. The slurry was centrifuged for 30 min at 8000g and the pH of the supernatant was adjusted to 4,0 with 1 N HCl. The precipitated proteins were removed by centrifugation (30 min at 8000g) and the pH of the supernatant adjusted to pH 6,7 with 1 M KPO₄. If there was a precipitate it was removed again by centrifugation. The proteins in the clear supernatant were precipitated by the gradual addition of saturated ammonium sulfate (4,1M) to a final concentration of 85% saturation.

After standing on ice for 4 h, the proteins were collected by centrifugation for 30 min at 8000g. The pellet was resuspended in water, dialyzed against water for 36 h and then against 20 mM KPO₄ pH 6,7 for at least 12 h. The protein solution was loaded on a DEAE cellulose column (120 x 16 mm) and the column washed with 200 ml of the same phosphate buffer. The column was eluted with a linear NaCl gradient (0 to 100 mM) and absorbance at 280 nm and αAI activity were measured in the eluted fractions.

Protein determination

Protein was determined by the Coomassie procedure (Bradford 1976). Bovine serum albumin was used as standard protein.

Electrophoretic separation and enzyme zymogram in isoelectrofocusing (IEF gels)

For all gels we used the PhastSystem electrophoresis unit (Pharmacia) following the manufacturer instructions. The isoelectric

point was calculated by using standard proteins with known isoelectric points and with software (ImageMaster VDS) provided by Pharmacia Biotech. For the protease zymogram, the proteins were first separated in nondenaturing conditions on IEF (3,0–9,0) Phastgels. After electrophoresis, the IEF gel was lightly rinsed with distilled water and incubated for 3 hours at 35°C with Citrate buffer 0,05M pH 3,0 containing 1% of hemoglobin. The gel was rinsed with water and stained with Coomassie Blue (Electrophoresis solution) during 30 min at 45°C and cleaned with water / methanol / acetic acid (60:30:10) solution. Protease activity appears on the polyacrylamide gel as clear bands on a blue-colored background. The gel was washed once again with water and then photographed.

Electrophoretic separation and inhibitor zymogram in isoelectrofocusing (IEF)

For the inhibitor zymograms, the IEF gels were incubated in 1,5% soluble starch in 10 mM sodium citrate, pH 5,0, containing 10 mM NaCl and 20 mM CaCl₂ for 1h at 4°C. The starch-gel was rinsed with water and incubated for 20 min at 30°C, rinsed and incubated with human salivary amylase dissolved in the same buffer. Staining with KI/I₂ (I: 0,5% and KI: 5%) produced dark blue bands on a light background (Valencia *et al.* 2000).

Proteolytic activity

Total proteolytic activity was assayed according to the method of Lenney (1975) and Blanco Labra *et al.* (1996). The bovine hemoglobin was prepared in water and denaturalized at pH 1.0 with a HCl solution 6,0N. This solution was dissolved with Citrate buffer pH 3,0 in order to get a 0,083% hemoglobin final solution. To carry out the activity tests, 40 µl of the enzyme solution was incubated for 3 hours at 30°C with 300 µl of Citrate buffer (0,05M pH 3,0) and 1,3 ml of hemoglobin solution (0,083%). The reaction was stopped by the addition of 2,5 ml of Trichloroacetic acid solution 0,34N. Then, samples were put in ice for 10 minutes and centrifuged at 10000g for 10 minutes. One enzymatic activity unit was defined as a decrement of 0,001 in absorbance at 280 nm. The absorbance was determined by using a UV/VIS spectrophotometer (UNICAM).

Proteolytic inhibition by pepstatin

Proteolytic inhibition was evaluated following preincubation of the enzyme

preparation with pepstatin A, a synthetic inhibitor. This specific inhibitor was added to enzyme preparation at a final concentration of 0,1µM, 0,4µM, and 1µM and allowed to stand at 25°C for 15 min before adding the substrate. Following preincubation the remaining activity was assayed as described above.

Proteolytic digestion of αAI

Proteolytic digestion of αAI (*Phaseolus vulgaris*) by acidic proteases present in the digestive fluid of *H. hampei*, was assayed as follows: An aliquot (1 µl) of the pure αAI (2 µg/µl) was incubated for two hours at 30°C with 1 µl of crude enzyme extract containing 3,92, 1,96, 0,98 or 0,0 enzymatic activity units. The reaction was stopped by adding Pepstatin A to this reaction solution at a final concentration of 0,1 µM. 1 µl of this solution containing the αAI was separated by using an isoelectrofocusing gel (IEF 3-9). Inhibitor zymogram was developing as described above.

Results and Discussion

Characteristics of intestinal tract proteases

In preliminary experiments we determined some biochemical properties of the digestive proteases of the coffee berry borer larvae. We found, that the enzyme has an optimum pH between 2,5 and 3,5 and it holds an 80% of their enzymatic activity when it is heated up to 50°C. In addition, when different buffer solutions were assayed, it was found that 0,05 M Citrate buffer, pH 3,0, was the best buffer solution to assay the proteolytic activity (Data not shown). Similar to most insect proteases, the enzyme activity found in coffee berry borer has similar values to those registered previously for other Coleoptera insects. For example, *Tribolium castaneum* (Herbst) shows an optimum proteolytic activity at pH between 3,0 and 6,9 (Blanco *et al.* 1996; Murdock *et al.* 1984; Birk *et al.* 1962); between 3,3 and 6,0 for *Callosobruchus maculatus* (F.) (Silva y Filho 1991; Murdock *et al.* 1984; Kitch y Murdock 1986; Gatehouse *et al.* 1985; Campos *et al.* 1989); between 5,5 and 6,5 for *Acanthoscelides obtectus* Say (Wieman y Nielsen 1988); and between pH 3,5 and 5,5 for *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Lemos *et al.* 1990). The highest proteolytic activity founded at pH 3,0 in *H. hampei* clearly indicates that this enzyme is an acid protease (Aspartic protease).

Similar results have been reported in other Coleoptera insects (Vundla *et al.* 1992; Barret 1977; Houseman and Downe 1982; Okasha 1968; Smith and Birt 1971).

The gradual loss of proteolytic activity that was observed in *H. hampei* over 50°C, has also been registered for proteinases coming from other organisms such as *Mujil auratus* (Bonete *et al.* 1984), *Tribolium castaneum* (Blanco *et al.* 1996), and *Trichoplusia ni* (Pritchett *et al.* 1981), indicating its thermal instability.

Electrophoretic zymograms and *pI* determination

To find out if coffee berry borer insect can synthesize different isoforms of acidic proteases, we analyzed enzymatic extracts from its intestinal tracts on native 16% polyacrylamide gels and develop them as zimograms. We observed two well-defined bands in the intestinal tract of *H. hampei* larvae (Fig. 1).

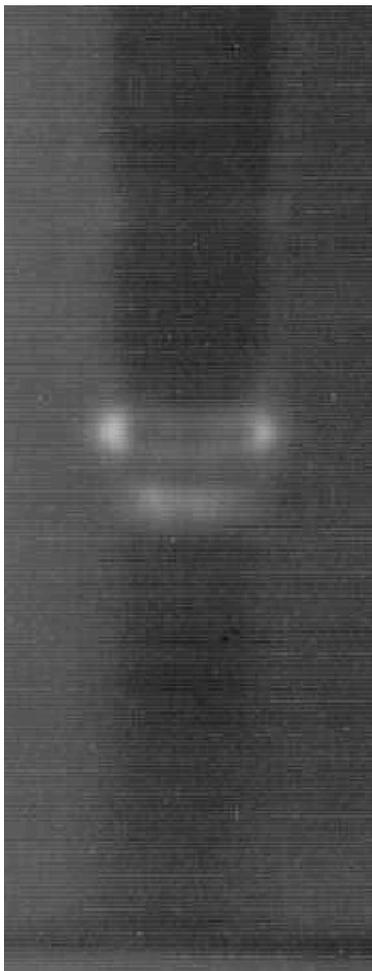


Figure 1. Zymogram of proteolytic activity from the digestive tract of *H. hampei* by using native electrophoresis on 7,5% homogenous Phastgel. After electrophoresis the gel was incubated with 1% hemoglobin solution in buffer Citrate pH 3,0, during 2 h at 35°C.

Similar analysis of the acidic proteases after separation of the proteins present in the intestinal tract on an isoelectric-focusing gels (IEF 3-9) showed the presence of a single major band very close to the anodic side with a *pI* of 5,2 (Fig. 2). Again, this result with *H. hampei* proteases was in general agreement with those reported for other insect acidic proteases, most of which fall in the acidic region of the IEF gel. For example, the two-reported aspartic proteases of *Tribolium castaneum* had isoelectric points between 2,8 and 3,5, respectively (Blanco *et al.* 1996; Barret 1977). The presence of this enzyme in the intestinal lumen of the insect shows the digestive nature of the enzyme.

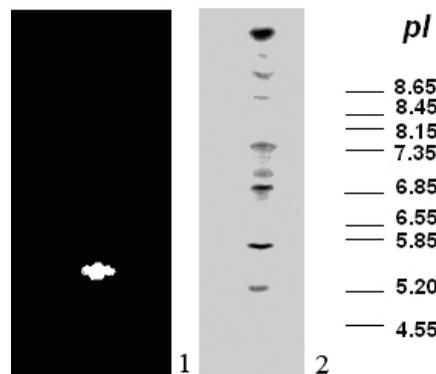


Figure 2. Determination of the *pI* of the major aspartic protease from intestinal tract of *H. hampei* by using an IEF Phastgel (3-9). Lane 1, represents the major aspartic protease *H. hampei* larvae. Lane 2, displays the *pI* markers.

Enzymatic inhibition by pepstatin A

Pepstatin A is a potent inhibitor of aspartic proteases and we prove its effect on *H. hampei* acidic proteases. So, to determine if the enzyme activity that is present in the digestive tract of coffee berry borer, could be inhibited by Pepstatin A, we assayed an intestinal extract for protease activity after incubation with increasing amounts of Pepstatin A. The results (Fig. 3) showed that addition of 0,1 μ M of Pepstatin A caused a 72% inhibition of protease activity and a 91% inhibition when 1 μ M of inhibitor was assayed. The strong inhibition caused on the protease activity in *H. hampei* after addition of Pepstatin A, allow us to conclude that the endogenous proteolytic activity in the intestinal tract of coffee berry borer is aspartic protease type.

In order to determine if the insect protease was Pepsin or Cathepsin D type, we assayed the enzyme activity by using hemoglobin and bovine serum albumin (BSA) as two different substrates. The results showed that this proteolytic enzyme hydrolyze hemoglobin more efficiently than BSA. Only 20% of the total activity on hemoglobin was found when BSA was used as substrate (data not shown).

According to this, it was possible to classify this enzyme as a protease cathepsin D type. The results of our study are consistent with the identification of a cathepsin protease activity in intestinal tracts of *Tribolium* species (Blanco *et al.* 1996).

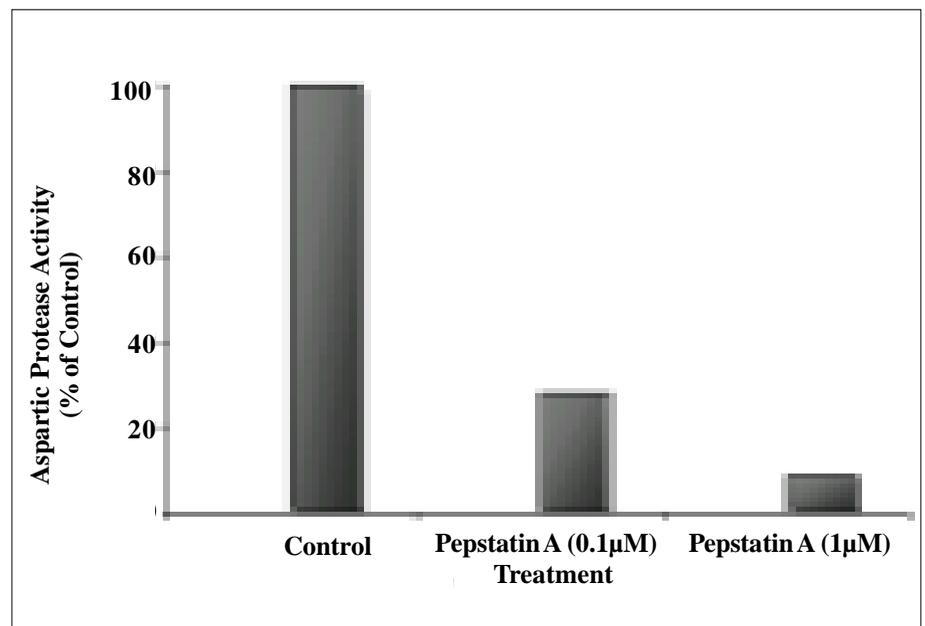


Figure 3. Effect of Pepstatin A on aspartic protease activity of coffee berry borer (*H. hampei*) gut extract. Data are presented as percentage of control containing no inhibitor.

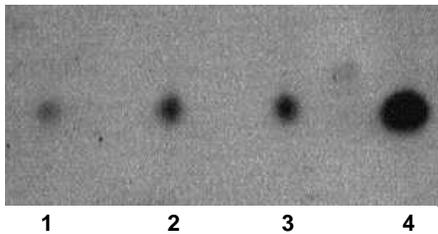


Figure 4. Proteolytic digestion of α AI-1 (*Phaseolus vulgaris* c.v. Radical) by *H. hampei* larval acidic protease(s). Purified α AI-1 was incubated with increasing amounts of larval midgut acidic protease from Coffee berry borer. Lane 1, 3,92 units/ μ l. Lane 2, 1,96 units/ μ l. Lane 3, 0,98 units/ μ l. Lane 4, Control (Untreated α AI-1). An aliquot (1 μ l) of the digestion solution containing the remaining α AI-1 (1 μ g/ μ l) was loaded in each well and run on an IEF (3-9) gel.

Proteolysis of α AI by larval proteases

To determine if the α AI-1 could be digested by the acidic proteases found in the intestinal tract of coffee berry borer, we assayed an exact quantity of α AI-1 for inhibitory activity after incubation with increasing amounts of acidic protease activity. The results (Fig. 4) showed that the inhibitory activity of α AI was significantly reduced when the inhibitor was incubated with acidic proteases from the intestinal tract of *H. hampei*. 3,92 units/ μ l of aspartic proteases from coffee berry borer nearly destroyed the total biological activity of the α AI from *P. vulgaris* after two hours of incubation. Previous works of proteolysis of α AI by larval enzymes, showed that *Z. subfasciatus* larval enzymes can cleave α AI-1 to smaller molecules (Ishimoto and Kitamura 1992). Ishimoto and Chrispeels (1996) have reported a similar result when seed extracts of *Phaseolus vulgaris* were incubated with larval midgut extracts of *Z. subfasciatus*, *Acanthoscelides obtectus*, and *Callosobruchus chinensis*, and the resulting α AI polypeptides were visualized on an immunoblot after SDS-PAGE. Although it is well known that insect gut proteases could digest different proteins that are intake by the insect during feeding, it doesn't exist electrophoretic evidence on this phenomenon when the well-characterized α AI is used as target; especially if the biological activity of the amylase inhibitor is monitored.

Because of this evidence, use of transgenic insect-resistant plant expressing α AI requires not only a complete characterization of the digestive proteases in the insect gut but also, requires to know if the inhibitor can act at the pH found in

its digestive tract and, if it is resistant to attack by insect gut proteases.

Based on the experiments presented here, we think that in order to increase the protective efficacy and durability of α AI in transgenic plants, it is envisaged that "Packages" of different genes must be introduced into plants. The component of such packages should each act on different targets within the insect. Protease inhibitors should be particularly valuable especially because they would protect other introduced gene products from premature and active digestion in the insect gut.

Conclusions

- The results in this paper provide further insight into the relation between α -amylase inhibitors and the digestive proteases that are present in the insect target.
- The data presented here lead to three important conclusions. First, the endogenous proteolytic activity in the digestive tract of *H. hampei* is aspartic protease (Cathepsin D) type. Second, the inhibitory activity of α AI could be significantly reduced when the inhibitor is incubated with acidic proteases from the intestinal tract of coffee berry borer. Third, protease inhibitors should be particularly valuable especially because they would protect other introduced gene products from premature and active digestion in the insect intestinal tract.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Colciencias and Cenicafé (Colombia) for financial support. We also thank the Entomology Laboratory of Cenicafé for their assistance with the insects.

Literature cited

- APPLEBAUM, S. W. 1985. Biochemistry of digestion. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* 4: 279-311.
- BARRET, A. J. 1977. Cathepsin D and other carboxyl proteinases from mammalian cells and tissues. Amsterdam, North-Holland. p. 209-248.
- BIRK, Y.; HARPAZ, I.; ISHAAYA, I.; BONDI, A. 1962. Studies on the proteolytic activity of the beetles *Tenebrio* and *Tribolium*. *Journal of Insect Physiology* 8: 417-429.
- BLANCO, L. A.; MARTÍNEZ, N. A.; SANDOVAL, L.; DELANO, J. 1996. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from

Tribolium castaneum larvae (Herbst). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26(1): 95-100.

- BONETE, M. J.; MANJON, A.; LLORCA, F.; IBORRA, J. Z. 1984. Acid proteinase activity in fishes II. Purification and characterization of Cathepsin B and D from *Mujil auratus* muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78B: 207-213.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- CAMPOS, F. A. P.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C. P.; ARY, M. B. 1989. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 92B: 51-57.
- GATEHOUSE, A. M. R.; BUTLER, K. J.; FENTON, K. A.; GATEHOUSE, J. A. 1985. Presence and partial characterization of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 39: 279-286.
- HOUSEMAN, J. G.; DOWNE, A. E. R. 1982. Characterization of an acidic proteinase from the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry* 12(6): 651-655.
- ISHIMOTO, M.; CHRISPEELS, M. J. 1996. Protective mechanism of the Mexican Bean Weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiology* 111: 393-401.
- ISHIMOTO, M.; KITAMURA, K. 1992. Tolerance to the seed α -amylase inhibitor by the two insect pests of the common bean, *Zabrotes subfasciatus* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae). *Applied Entomology and Zoology* 27: 243-251.
- JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. 1997. The adaptation of insect to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43(10): 885-895.
- KITCH, L. W.; MURDOCK, L. L. 1986. Partial characterization of a major midgut trypsin proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus* (F.). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 3: 561-576.
- LEMOS, F. J.; CAMPOS, F. A. P.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 56: 219-227.
- LENNEY, J. F. 1975. Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B and C. *Journal of Bacteriology* 122: 1265-1273.

- MURDOCK, L. L.; BROOKHART, G.; DUNN, P. E.; FOARD, D. E.; KELLY, S.; KITCH, L.; SHADE, R. E.; SHUCKLE, R. H.; WOLFSON, J. L. 1984. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87B: 783-787.
- MURDOCK, L. L.; BROOKHART, G.; DUNN, P. E.; FOARD, D. E.; KELLEY, S.; KITCH, L.; SHADE, R. E.; SHUCKLE, R. H.; WOLFSON, J. L. 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87: 783-787.
- MURPHY, S. T.; MOORE, D. 1990. Biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), previous programs and possibilities for the future. *Biocontrol News and Information* 11: 107-117.
- NORTH, M. J. 1982. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiology* 46: 308-340.
- OKASHA, A. Y. K. 1968. Effect of sub-lethal temperature on an insect, *Rhodnius prolixus* (Stal) III. Metabolic changes and their bearing on the cessation and delay of moulting. *Journal of Experimental Biology* 48: 475-486.
- PRITCHETT, D. W.; YOUNG, S. Y.; GEREN, C. R. 1981. Proteolytic activity in the digestive fluid of larvae of *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry* 11(5): 523-526.
- REID, J. C. 1983. Distribution of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, within Jamaica, following its discovery in 1978. *Tropical pest management* 29: 224-230.
- SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. 1991. Comparison between the levels of aspartic and Cysteine proteinases of *Callosobruchus maculatus* (F) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 99B: 529-533.
- SMITH, E.; BIRT, L. M. 1971. Proteolytic activity during the metamorphosis of the blowfly, *Lucila*. *Insect Biochemistry* 2: 218-225.
- VALENCIA, J. A.; A. E. BUSTILLO, G. A. OSSA.; CHRISPPEELS, M. J. 2000. Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 207-213.
- VUNDLA, W. R. M.; BROSSARD, M.; PEARSON, D. J.; LABONGO, V. L. 1992. Characterization of aspartic proteinases from the gut of the Tick, *Rhipicephalus appendiculatus* Neuman. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22(4): 405-410.
- WIEMAN, K. F.; NIELSEN, S. S. 1988. Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 89B: 419-426.
- XU, G.; QIN, J. 1994. Extraction and characterization of midgut proteases from *Heliothis armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their inhibition by tannic acid. *Journal of Economic Entomology* 87(2): 334-338.

Recibido: 12-oct-04 • Aceptado: 23-dic-04

Actividad de α -amilasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido

α -Amylase activity from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* growing in liquid medium

MARTA CECILIA FLÓREZ M.¹, JUAN C. LÓPEZ N.¹, ARNUBIO VALENCIA JIMÉNEZ^{2*}

Resumen. Diferentes aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* se cultivaron en medio líquido (YPDA / YDA). Bajo estas condiciones *B. bassiana* fue capaz de producir y liberar al medio de cultivo una α -amilasa digestiva. Mediante electroforesis en geles de isoelectroenfoque (IEF) se logró estimar el punto isoelectrico (*pI*) de esta banda de actividad en 6,75. No se observaron variaciones en la intensidad de la actividad en esta banda para los diferentes aislamientos. Sin embargo, estos aislamientos mostraron diferencias consistentes en la actividad de la enzima especialmente cuando se utilizaron diferentes concentraciones de conidios de *B. bassiana* en el medio de cultivo. Este es un método simple y sensible para la determinación de la actividad α -amilasa presente en el medio líquido de *B. bassiana*, el cual podría usarse satisfactoriamente no sólo para la evaluación de diferentes hongos entomopatógenos, sino también, para hacer una determinación rápida de posibles variaciones genéticas debidas a la presencia o ausencia de una enzima específica.

Palabras clave: Enzimas. Cultivos monospóricos. Punto isoelectrico.

Summary. Different isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* were grown using a liquid medium (YPDA / YDA). Under these conditions *B. bassiana* was able to release an α -amylase enzyme into the medium. Using electrophoresis on isoelectric focusing (IEF) gels the isoelectric point (*pI*) of this amylase activity band was estimated at 6.75 using isoelectric focusing (IEF). Variation in the intensity of enzyme activity was not observed in this band for the different isolates. However, these isolates showed consistent differences in the α -amylase activity especially when different concentrations of *B. bassiana* conidia were used in the culture medium. This is a simple and sensitive method to determine α -amylase activity in liquid culture of *B. bassiana*, which could be used satisfactorily not only to evaluate different fungal entomopathogens, but to make a rapid determination of the possible genetic variants based on the presence or absence of a specific enzyme.

Key words: Enzymes. Monosporic cultures. Isoelectric point.

Introducción

Se han realizado diversas investigaciones con el propósito de evaluar la actividad de una enzima específica como ayuda para la caracterización de hongos entomopatógenos (St. Leger *et al.* 1993; Leopold y Samsinakova 1970; Bidochka y Khachatourians 1987; Paterson *et al.* 1989; May *et al.* 1979; Micales *et al.* 1986). Sin embargo, pocas se han enfocado en el estudio de la relación entre la actividad de estas enzimas y la virulencia de los hongos entomopatógenos hacia sus hospederos (St. Leger *et al.* 1996). Actualmente se sabe que enzimas como las amilasas, proteasas, quitinasas y lipasas participan en el mecanismo de infección durante la invasión al hospedero. Hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* inician su proceso de infección cuando la conidia germina y penetra a través de la cutícula del insecto. Las enzimas involucradas en este proceso pueden ser producidas *in vitro*; mediante el uso de sustratos específicos (St. Leger *et al.* 1993; Bidochka y Khachatourians 1987). La ac-

tividad de muchas enzimas intracelulares en hongos entomopatógenos ha sido evaluada previamente mediante diferentes metodologías (Leopold y Samsinakova 1970). Estas mismas metodologías pueden ser de utilidad cuando se trata de evaluar la actividad de enzimas extracelulares que son producidas por hongos que crecen en cultivos líquidos.

El cultivo de hongos filamentosos en medio líquido es muy recomendado, dado que no sólo permite una fácil cuantificación del material obtenido a lo largo del cultivo, sino también el estudio de las principales características fisiológicas del hongo, en especial por tratarse de un sistema homogéneo que facilita el intercambio gaseoso y evita la autólisis prematura de la célula, asegurando de esta forma un buen crecimiento celular. Estas enzimas extracelulares, presentes en cantidades suficientes por los hongos en el cultivo líquido, pueden ser detectadas y caracterizadas fácilmente por electroforesis (St. Leger *et al.* 1996; Bidochka y Khachatourians 1987; Leger *et al.* 1993). Estudios del

perfil electroforético de isoenzimas llevados a cabo en hongos como *B. bassiana* y *M. anisopliae* han sido utilizados como herramienta para la clasificación taxonómica de las diferentes poblaciones geográficas de la especie (St. Leger *et al.* 1993; Rath *et al.* 1995; Bridge *et al.* 1990).

La electroforesis de enzimas pectolíticas ha sido aplicada para la interpretación genética en estudios de fusión de protoplastos híbridos de *Penicillium chrysogenum* y *P. roquefortin* (Paterson *et al.* 1989). Dado que los métodos existentes para la medición cuantitativa de la actividad de α -amilasas de hongos entomopatógenos son bastante diversos y en algunos casos dispendiosos, se hace necesario estandarizar una metodología para la cuantificación rápida y sencilla de la actividad de esta enzima. El presente trabajo se planteó con el objetivo principal de proponer una metodología de evaluación de enzimas extracelulares provenientes de hongos, la cual permita una evaluación mucho más rápida y sen-

1 Auxiliar IV y Asistente de Investigación, respectivamente. Disciplina de Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ, Chinchina-Colombia. E-mail: JuanCarlos.Lopez@cafedecolombia.com

2* Autor para correspondencia: Profesor Asociado. Dpto de Fitotecnía. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Calle 65 N° 26-10. Manizales-Colombia. Tel. (68) 861250. E-mail: arnubio@terra.com.co

cilla de la actividad de ésta y otras enzimas que pudieran estar relacionadas con características de patogenicidad del hongo. Una metodología como ésta permitiría estudiar con mayor detalle otros sistemas enzimáticos, facilitando la selección de aislamientos de hongos entomopatógenos con mayor potencial para el control de insectos plaga.

Materiales y Métodos

Material Biológico

Se utilizaron los cultivos monoespóricos: 1, 2, 3, 4, 5 y 21 obtenidos a partir del aislamiento *Beauveria bassiana* (Balsamo) *Bb* 9205 previamente reactivados sobre adultos de *H. hampei*, provenientes de la colección que posee la Disciplina de Entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé (Chinchiná-Colombia).

Medios de cultivo evaluados

Los medios de cultivo utilizados fueron: YPGA (extracto de levadura 0,5%, peptona 1%, glucosa 2% y almidón soluble 0,5%) y YGA (extracto de levadura 0,5%, glucosa 2% y almidón 0,5%). Una vez preparados los medios se esterilizaron en autoclave durante 15 min.

Concentración de conidios/ml

Un volumen de 100 ml del medio de cultivo YGA se inoculó con 1 ml de una suspensión de conidios de *B. bassiana* a concentraciones de 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 conidios/ml, dejándose a 25°C, en agitación constante a 100 rpm durante 6 días. A partir del momento de la siembra y cada 24 h se tomaron muestras de 1ml, las cuales se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la cantidad de sustrato remanente como consecuencia de la actividad acumulada de la enzima. Cada determinación se efectuó por triplicado.

Determinación de la actividad amilolítica

La actividad amilasa se determinó de acuerdo con una modificación del método de Hopkins y Bird (1954). 200 µl del sobrenadante del medio de cultivo se mezclaron con 1 ml de agua destilada más 5 ml de solución de Iodo (I: 0.5 % y KI: 5 %). La absorbancia de la muestra se leyó espectrofotométricamente a 580 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS marca UNICAM. Una unidad de actividad enzimática se definió como una disminución en 0,001 unidades de absorbancia. Para cada prueba de actividad se tomaron 5 repeticiones.

El efecto de la composición del medio sobre la actividad amilolítica del monoespérico *Bb* 9205 (5), se determinó utilizando los medios de cultivo YDA y YPDA. Un volumen de 100 ml de cada uno de los medios de cultivo evaluados se inoculó con 1 ml de una suspensión de conidios de *B. bassiana*, a una concentración de 1×10^3 conidios/ml, dejándose a 25°C en agitación constante a 100 rpm durante 7 días. A partir del momento de la siembra y cada 24 h se tomaron muestras de 1ml del sobrenadante, las cuales se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min para proceder con las determinaciones de actividad de la enzima.

Isoelectroenfoque (IEF) y zimogramas de actividad enzimática

Con el objetivo de identificar y caracterizar parcialmente (*pI*) cada una de las bandas de actividad α -amilasa producidas por el hongo *B. bassiana* en medio líquido se corrieron electroforesis sobre geles de isoelectroenfoque (IEF) 3-9 en una cámara de electroforesis PhastSystem (Farmacia). Después de la electroforesis el gel se incubó en una solución de almidón al 1 % durante una hora a 4°C. Posteriormente se incubó por 1 h a 30°C con solución amortiguadora citrato 0.05 M pH 5,0 conteniendo 10 mM de NaCl y 20 mM de CaCl_2 . Finalmente el gel se tiñó con una solución de Iodo (I: 0.5% y KI: 5 %) durante 10-15 min. Las bandas de actividad con este tratamiento aparecen como zonas blancas sobre un fondo azul oscuro. El punto isoelectro se calculó haciendo uso de un patrón de proteínas con *pI* conocido y apoyados con el software (ImageMaster VDS) suministrado por Pharmacia Biotech.

Resultados y Discusión

Efecto de la composición del medio líquido sobre la actividad amilolítica

En este experimento no se observaron diferencias en cuanto al crecimiento y actividad amilolítica del hongo a lo largo de siete días de evaluación en los dos medios de cultivo (Fig. 1). La actividad de la enzima no se detectó en los primeros cuatro días de cultivo evidenciando de esta forma una baja producción. Sólo a partir de este momento se empezó a detectar ligeramente, registrándose la mayor actividad a partir del sexto día. En las últimas 24 h de cultivo se produjo cerca del 90 % del total de actividad generada en todo el tiempo de evaluación. El hecho de que las dos gráficas de actividad de la enzima α -amilasa se superpongan entre sí, es una evidencia clara

de la gran precisión y fiabilidad de la metodología aquí utilizada.

Al igual que en *B. bassiana*, en *Clostridium thermosulfurogenes* SV9 la mayor cantidad de α -amilasa se produce al final del periodo exponencial de crecimiento (Swamy y Seenayya 1996). Resulta notorio que la actividad de las α -amilasas esté directamente relacionada con el crecimiento del hongo lo cual evidencia que el crecimiento micelial es crucial para la adecuada producción de las diferentes proteínas extracelulares (Carlsen *et al.* 1996). Sin duda alguna, la expresión de enzimas digestivas por parte de los hongos entomopatógenos que crecen en medios de cultivo líquido dependerá en gran medida de la composición del mismo. Hongos como *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces* spp. y *V. lecanii*, producen grandes cantidades de proteasas y quitinasas en medios de cultivo líquido (Gillespie 1988).

Igualmente se encontró que un medio de cultivo que contenga peptona y extracto de levadura se constituye en una muy buena fuente de nitrógeno para la producción de enzimas como las amilasas, lo cual está en concordancia con los datos suministrados Swamy y Seenayya (1996).

Concentración de conidios/ml

Los análisis del efecto de la concentración inicial del inóculo sobre la actividad de α -amilasas de *B. bassiana* se evaluaron durante 144 h en el medio de cultivo YGA. El comportamiento de la actividad amilolítica bajo estas condiciones se muestra en la Figura 2. Si bien no se encontraron diferencias en la actividad de la enzima entre las concentraciones de 1×10^5 y 1×10^6 conidios/ml, sí se presentaron diferencias cuando se compararon contra las otras dos concentraciones evaluadas, especialmente después de las primeras 48 h de cultivo. Así mismo, se puede apreciar con claridad que la cinética del desdoblamiento del almidón sigue un comportamiento similar en todas las concentraciones evaluadas, lo cual se denota en la pendiente de la curva obtenida. Conforme se incrementa la concentración de conidios/ml del inóculo inicial, el desdoblamiento enzimático del almidón se presenta más tempranamente como consecuencia de una mayor cantidad de la enzima que está siendo liberada al medio de cultivo, permitiendo de esta forma establecer diferencias entre las diferentes concentraciones.

Es evidente que una mayor actividad de la enzima, propiciada por una mayor concentración del inóculo acorta notable-

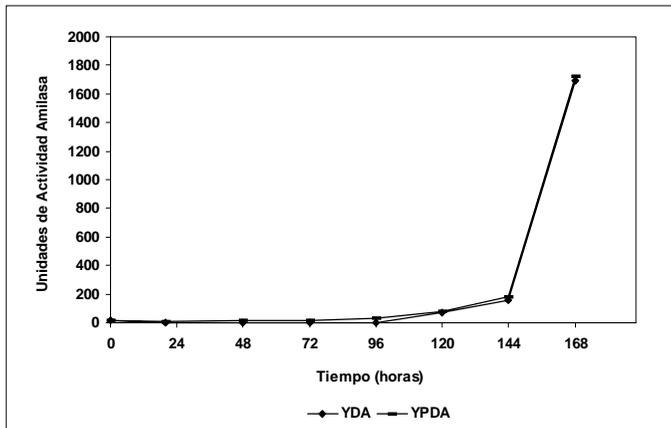


Figura 1. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la actividad amilolítica de un cultivo monoespórico de *B. bassiana* Bb 9205 (5).

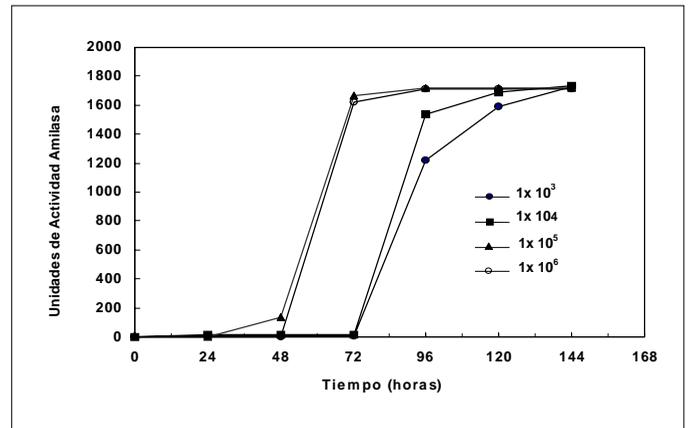


Figura 2. Efecto de la concentración de conidios de *B. bassiana* (Bb 9205) sobre la actividad amilolítica.

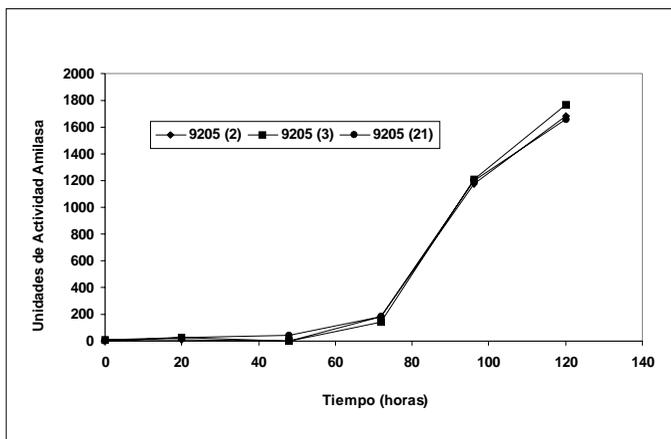


Figura 3. Comportamiento de la actividad amilasa de tres aislamientos monoespóricos obtenidos de *B. bassiana* (Bb 9205).

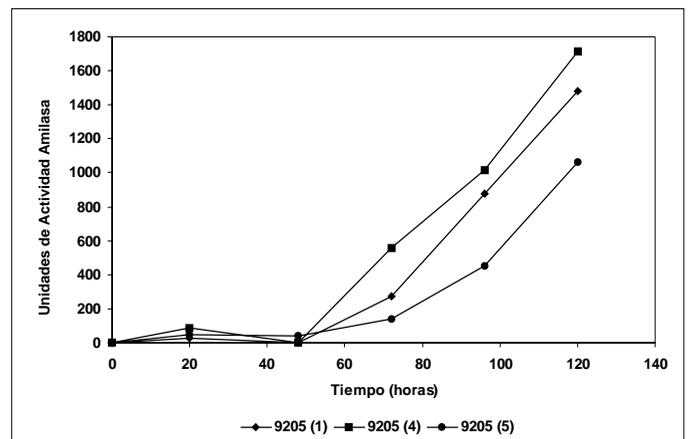


Figura 4. Comportamiento de la actividad amilasa de tres aislamientos monoespóricos obtenidos de *B. bassiana* (Bb 9205).

mente el tiempo requerido para que el desdoblamiento enzimático del almidón se inicie, permitiendo de esta forma que el hongo alcance a completar la digestión total del sustrato.

El hongo en concentraciones de 1×10^3 y 1×10^4 conidios/ml inicia su actividad amilolítica a las 72 h mientras que a concentraciones de 1×10^5 y 1×10^6 esta actividad se hace evidente a partir de las primeras 48 h de cultivo. De esta manera se puede llegar a establecer cuál sería el comportamiento de la producción de amilasas extracelulares de un hongo en función de la concentración y tiempo del crecimiento del mismo. Se podría pensar que bajo condiciones de campo, una mayor concentración del inóculo sobre el insecto hospedero traería como consecuencia un evento más temprano de patógenesis y en consecuencia una muerte más temprana.

El término producción de una enzima está referido tanto a la síntesis de la enzima por parte del hongo como a la actividad de la enzima en el medio una vez que ha

sido producida (Hankin y Anagnostakis 1975). La capacidad de estos hongos para degradar el almidón fue usada en este experimento como un criterio para determinar el potencial de producir enzimas de tipo amilolítico.

Actividad amilolítica

Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4. Los aislamientos 9205 (2), 9205 (3) y 9205 (21) presentan un comportamiento bastante similar entre ellos, mientras que los restantes aislamientos 9205 (1), 9205 (4) y 9205 (5) evidencian un comportamiento de la actividad de la enzima que no se correlaciona con el tipo de monoespórico evaluado. Dado que se trata de cultivos provenientes de aislamientos monoespóricos de *B. bassiana* queda en evidencia que el comportamiento bioquímico de sus enzimas, por lo menos en lo que respecta a las α -amilasas, no sigue un patrón uniforme indicando de esta manera que aún bajo estas condiciones de cultivo se pueden esperar resultados diferentes bajo condiciones de crecimiento en laboratorio y en campo.

La metodología aquí evaluada permitiría conocer, de manera muy rápida, diferencias en cuanto a la actividad de esta importante enzima entre diferentes aislamientos del hongo, las cuales podrían estar correlacionadas con mayor o menor actividad controladora de insectos plaga. La mayor rapidez de estos análisis bioquímicos se fundamenta en el hecho de que mediante el uso de esta metodología no resulta indispensable la purificación o aislamiento de la enzima a partir del medio de cultivo. En caso de ser necesaria la purificación de la enzima; esta tarea sin duda requeriría de mayor tiempo (Hankin y Anagnostakis 1975). Sin duda, las enzimas extracelulares que son producidas por estos hongos son de gran importancia para entender mejor la forma como ellos utilizan y transforman el sustrato sobre el cual crecen.

Zimogramas de actividad enzimática

Los zimogramas de actividad efectuados para las muestras provenientes del medio de cultivo del hongo y desarrollados sobre geles de isoelectroenfoque IEF 3-9

mostraron la presencia de una sola banda de actividad amilasa la cual al parecer representa en *B. bassiana* la totalidad de la actividad de esta enzima (Fig. 5). El *pI* calculado mediante el uso de marcadores de *pI* fue de 6,70, indicando su naturaleza casi neutra. No es muy común en hongos entomopatógenos que la actividad digestiva de un sustrato en particular lo efectúe una sola isoforma de la enzima. Al parecer, y basados en los resultados encontrados en el presente trabajo, el crecimiento de hongos en medio líquido pudiera eventualmente favorecer la actividad de estas enzimas y propiciar que sólo una o muy pocas isoformas se expresen bajo tales condiciones. Por lo tanto, se hace necesario estudiar los patrones de expresión de ésta y otras enzimas cuando se encuentran atacando al insecto.

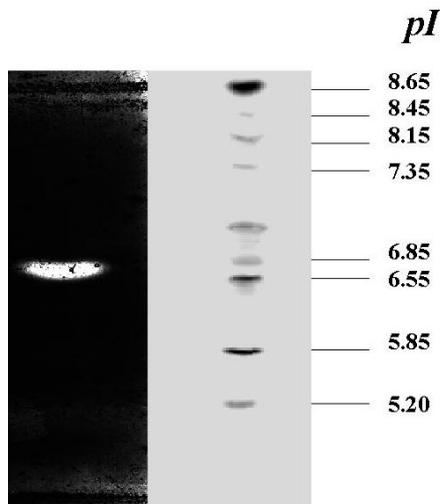


Figura 5. Zimograma de amilasas de *B. bassiana* (Bb 9205), en un gel IEF (3-9) y determinación de su *pI*.

Con base en los resultados presentados se puede señalar que la metodología utilizada y estandarizada en el presente trabajo permitirá no sólo la evaluación rápida y sencilla de la actividad de amilasas provenientes de hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, sino también facilitará el estudio de otros sistemas enzimáticos generados en medios de cultivo conteniendo o no un sustrato específico. Dado que actualmente se sabe que existe una marcada correlación entre la actividad de enzimas digestivas de hongos y su patogenicidad en campo, la implementación de una metodología como la que se plantea en este trabajo

podría facilitar la evaluación y selección de aislamientos de hongos entomopatógenos por su potencial para el control de insectos plaga.

Conclusiones

- Se logró la estandarización de una metodología que permite la evaluación rápida y sencilla de la actividad de α -amilasas provenientes de hongos entomopatógenos que crecen en medio líquido.
- El hongo entomopatógeno *B. bassiana*, bajo condiciones de cultivo en medio líquido, produce al parecer una sola isoforma de α -amilasa con un *pI* cercano a la neutralidad.
- En razón a las diferencias encontradas entre aislamientos monospóricos en cuanto a la actividad de esta enzima, esta variable podría ser utilizada como un nuevo criterio de selección de aislamientos del hongo por su potencial para el control de insectos plaga.

Recomendaciones

- Adelantar nuevos estudios que exploren los patrones de expresión de esta y otras enzimas en el sistema insecto-hongo.
- Proponer trabajos de investigación que correlacionen la patogenicidad de diferentes aislamientos de hongos entomopatógenos y los niveles de actividad de α -amilasas.

Literatura citada

BIDOCHKA, M. J.; KACHATOURIANS, G. G. 1987. Purification and properties of an extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1679-1684.

BRIDGE, P. D.; ABRAHAM, Y. J.; CORNISH, M. C.; PRIOR, C.; MOORE, D. 1990. The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) isolates from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Mycopathologia* 11(2): 85-90.

CARLSEN, M.; SPOHR, A. B.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. 1996. Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnology & Bioengineering* 49 (3): 266-276.

GILLESPIE, A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge, M. (Ed) *Fungi in biological control systems*. Manchester University Press, Manchester, England. 269 p.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.

HOPKINS, R. H.; BIRD, R. 1954. The action of some α -amylases on amylose. *Biochemical Journal* 56: 86-96.

LEOPOLD, J.; SAMSINAKOVA, A. 1970. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 34-44.

MAY, B.; ROBERTS, D. W.; SOPER, R. S. 1979. Intraspecific genetic variability in laboratory strains of *Entomophthora* as determined by enzyme electrophoresis. *Experimental Mycology* 3: 289-297.

MICALES, J. A.; BONDE, M. R.; PETERSON, G. L. 1986. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* 27: 405-449.

PATERSON, R. R. M.; BRIDGE, P. D.; CROSSWAITE, M. J.; HAWKSWORTH, D. L. A. 1989. A reappraisal of the *Terverticillate penicillia* using biochemical, physiological and morphological features. III. An evaluation of pectinase and amylase isoenzymes for species characterization. *Journal of General Microbiology* 135: 2979-2991.

RATH, A. C.; CARR, C. J.; GRAHAM, B. R. 1995. Characterization of *Metarhizium anisopliae* strain by carbohydrate utilization (API50CH). *Journal of Invertebrate Pathology* 65(2): 152-161.

ST. LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 81-84.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 907-912.

SWAMY M. V.; SEENAYYA G. 1996. Thermostable pullulanase and α -amylase activity from *Clostridium thermosulfurogenes* SV9- optimization of culture conditions for enzyme production. *Process Biochemistry* 31 (2): 157-162.

Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV

Implementation of quality control techniques for the production of a biopesticide based on the granulovirus *Phthorimaea operculella* PhopGV

LAURA VILLAMIZAR¹, JEAN-LOUIS ZEDDAM²; CARLOS ESPINEL¹ ALBA MARINA COTES¹

Resumen. La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lep.; Gelechiidae) es una de las plagas más limitantes del cultivo en Venezuela, Colombia y Ecuador y se revela como de difícil control mediante el uso de insecticidas químicos. Su control biológico con el granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) ha sido, tanto en Colombia como en otros países andinos, uno de los principales componentes para su manejo. Corpoica posee con una planta, registrada ante el Instituto Colombiano Agropecuario, para manufacturar un bioplaguicida a base de este virus. Dada la importancia que tiene la confirmación de la calidad del producto, el objetivo del trabajo fue estandarizar e implementar pruebas de control de calidad en el proceso productivo. Se fijaron como parámetros críticos la identidad y concentración del virus, las características fisicoquímicas del producto y su actividad biocontroladora; posteriormente se estandarizaron metodologías para evaluar dichos parámetros y se implementaron estos controles en el proceso productivo. Se confirmó la identidad del virus como *P. operculella* por métodos microscópicos, inmunológicos y moleculares. Para controlar la concentración del virus, se determinaron las concentraciones letales del virus y se fijó el rango de aceptación de dicha variable. El bioplaguicida se elaboró con base en los resultados. La concentración letal noventa fue de 8×10^5 cuerpos de inclusión (CI).mL⁻¹; en consecuencia, el producto terminado se adaptó para presentar una concentración de 10^5 CI.g⁻¹. El control de calidad de tres lotes elaborados presentó baja variabilidad indicando la repetibilidad del proceso. Las características promedio de los lotes fueron una concentración de 10^5 CI.g⁻¹, humedad del 0.57%, voluminosidad 0.93mL.g⁻¹, pH 9.52 y eficacia del 97.25%.

Palabras clave: Baculovirus. Control biológico. Polilla guatemalteca de la papa.

Summary. The Guatemalan potato moth *Tecia solanivora* (Lep.; Gelechiidae) is one of the most limiting pests of this crop in Venezuela, Colombia and Ecuador and its control through the use of chemical insecticides has not been very effective. Its biological control with the granulovirus *Phthorimaea operculella* (PhopGV) has been one of the principal components of its management in Colombia and other Andean countries. Corpoica has a plant, registered through the Colombian Agricultural Institute, for manufacturing a biopesticide based on this virus. Given the importance of confirming product quality, the objective of this work was to standardize and implement quality control tests during the manufacturing process. Virus identity and concentration, physical-chemical characteristics of the product and biopesticide efficacy were established as critical parameters; methodologies for evaluating these parameters were then standardized and implemented in the production process. Virus identity was confirmed as *P. operculella* by microscopic, immunological, and molecular techniques. To control viral concentration, lethal viral concentrations were determined and acceptable limits for this variable were established. The biopesticide was elaborated based on these results. The lethal concentration (LC₉₀) was 8×10^5 occlusion bodies (OB).mL⁻¹ and based on this result, the final product was adapted to give a concentration of 10^5 OB.g⁻¹. Three batches of the product were manufactured and quality control showed low variability, indicating the repeatability of the process. Mean product characteristics were concentration 10^5 OB.g⁻¹, moisture content 0.57%, voluminosity 0.93 mL.g⁻¹, pH 9.52 and efficacy 97.25%.

Key words: Baculovirus. Biological control. Guatemalan potato tuber moth.

Introducción

La "Polilla guatemalteca de la papa" *Tecia solanivora* (Povolny) 1973, originaria de Centroamérica, pertenece al complejo de polillas o palomillas que ataca al cultivo de la papa y es considerada como una de las principales plagas de dicho cultivo en la región Andina si se tiene en cuenta el daño que ocasiona al tubérculo tanto bajo condiciones de campo como de almacenamiento (Niño y Notz 2000).

Frente a esta problemática, se han generado varios componentes para su control,

dentro de un Programa de manejo Integrado de Plagas de la Papa (MIPP), tales como el control cultural, el etológico y el químico. Sin embargo, la medida más utilizada por los agricultores sigue siendo el uso indiscriminado de productos químicos, de los cuales muchos son de categoría toxicológica I, es decir extremadamente tóxicos y la mayoría son ineficientes para el control del insecto (Niño y Notz 2000).

Una alternativa promisoría para su control es el uso del granulovirus de *Phthorimaea operculella*, un virus perteneciente

a la familia Baculoviridae, el cual es altamente específico y ha sido considerado con otros virus por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la herramienta más promisoría para el control de plagas (CIP 2000).

Este virus interactúa inicialmente con su hospedero a nivel intestinal lo que implica que para que se infecten las larvas es necesario que las partículas virales sean ingeridas. Posteriormente, las larvas se vuelven lentas en sus movimientos, se

1 Autores para correspondencia: Investigadores, Programa MIP, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Km 14 vía Mosquera, acotes@corpoica.org.co

2 Institut de Recherche pour le Développement – IRD, 213, rue La Fayette, 75480 Paris cedex 10, zedd@ecnet.ec

retrasa su crecimiento, toman una coloración blanca, se produce la desintegración de los tejidos internos y la muerte ocurre entre los 12 y 21 días, no llegando ninguna larva al estado de pupa (CIP 2000).

Para la multiplicación del virus se emplean larvas del hospedero, las cuales cuando están infectadas, se muelen en fresco, congeladas, secas o liofilizadas. El Centro Internacional de la Papa (CIP), desarrolló una formulación en forma de polvo seco para protección de semilla en almacenamiento, la cual consiste en macerar 20 larvas infectadas y diluirlas en un litro de agua. Esta preparación se mezcla manualmente con un kilo de material inerte tal como talco, caolín, etc., hasta obtener una pasta que se extiende sobre un plástico en una superficie horizontal protegida de la luz para secarla al ambiente y después de dos semanas, se muele con un rodillo manualmente hasta obtener un polvo que es empacado y distribuido para su uso (CIP 2000). Sin embargo, este proceso artesanal puede dar origen a productos de calidad variable ya que no se conoce la concentración viral del producto, no se conocen sus concentraciones efectivas y las operaciones de manufactura no incluyen ningún tipo de control durante el proceso (Zeddám *et al.* 2003).

En Corpoica, desde su existencia, se estableció el Laboratorio de Control Biológico como apoyo al Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas (MIP). La función de este laboratorio es la de hacer investigación y desarrollar bioplaguicidas. En el año 2000, este Laboratorio se enfrentó al reto de producir el producto a base de baculovirus, para responder a la emergencia sanitaria causada por la polilla guatemalteca. Inicialmente se obtuvo la cepa del virus proveniente de la Secretaría de Agricultura de Boyacá y se adoptó la tecnología de formulación desarrollada por el CIP. Sin embargo, dicho proceso artesanal no permitía asegurar la calidad de los diferentes lotes de producción, presentándose inconsistencias en los resultados de eficacia del producto. Por tales razones y con miras a producir cantidades comerciales del bioinsecticida que permitieran suplir las necesidades del sector, se planteó como meta la tecnificación del proceso productivo, dentro de una filosofía de "calidad total", para lo cual fue necesario construir una planta de producción que cumpliera con las especificaciones técnicas para este tipo de industrias, se adquirieron los equipos para realizar cada parte

del proceso como una operación unitaria independiente y estandarizable; todas las operaciones unitarias se estandarizaron y se determinaron los puntos críticos de cada una de ellas. Así mismo, se corroboró la identidad del agente biocontrolador, se ajustó su concentración efectiva en el producto y se validaron y documentaron las técnicas de control de calidad en los Procedimientos Operacionales Estándar (POEs).

Materiales y Métodos

Identificación viral

La identificación del virus se realizó en el Instituto de Investigaciones para el Desarrollo de Francia (IRD). Para tal fin, larvas infectadas provenientes de la unidad de propagación viral de la Planta Semicomercial de Baculovirus fueron liofilizadas y analizadas en dicho instituto.

Microscopía electrónica: Larvas frescas se fijaron con glutaraldehído al 2% y fijadas nuevamente con tetraóxido de osmio al 2%; estas dos soluciones se prepararon en tampón cacodilato (pH 6.8, 0.1M). Las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol (20 a 100%) y luego fijadas en parafina y cortadas con micrótopo en tajadas de 10 micras de espesor. Secciones del insecto fueron cubiertas con oro con un micrótopo Reichert Jung, modelo 2030 y observadas en un microscopio electrónico Phillips 515.

Purificación viral y análisis molecular del ADN. Larvas infectadas con el virus fueron homogeneizadas en solución de sodio dodecil sulfóxido (SDS) al 0,1% en agua destilada. El homogeneizado se filtró a través de una tela y la suspensión resultante se ubicó sobre un gradiente de sacarosa de 45% a 80% y se centrifugó por una hora a 32.500g. La banda blanca formada por los cuerpos de inclusión se recuperó, se diluyó en tres volúmenes de agua destilada y se centrifugó por 1 hora a 20.000g. El sedimento que contenía los cuerpos de inclusión fue suspendido en 1 mL de agua destilada. Se tomó 1 mL de la suspensión de virus purificado y se mezcló con el mismo volumen de una solución de carbonato de sodio (1M, pH 11) por 30 minutos, seguido de la adición de 2mL de tampón Tris (1M, pH 8.0). La solución resultante se centrifugó por 1 hora a 75.000g. El sedimento (viriones) se resuspendió en 1 mL de tampón Tris y se extrajo sucesivamente tres veces con fenol, dos veces con cloroformo: alcohol isoamílico (1:24) y dos veces con

éter. La fase acuosa fue recuperada y precipitada toda la noche (-20°C) con 2.5 volúmenes de etanol absoluto en presencia de acetato de sodio (pH 5.5) a una concentración final de 0.3M. El ADN sedimentado se lavó con etanol al 95%, se secó y disolvió en tampón Tris. Posteriormente, se aplicaron las enzimas de restricción *Eco* RV, *Bgl* II, *Sal* I, *Eco* RI, *Pvu* II, *Sac* I, *Cla* I y *Bam* HI, según las recomendaciones del fabricante (Boehringer). Terminada la digestión se corrió una electroforesis del ADN digerido usando un gel de agarosa al 1% en tampón TEP (9 mM Tris-fosfato, 2 mM EDTA, pH 8.0) (Zeddám *et al.* 1999). Los tratamientos consistieron en larvas provenientes de la Planta Semicomercial de Baculovirus y un tratamiento control consistente en ADN de PhopGV patrón.

Inmunodifusión. El virus purificado se analizó en un gel de agarosa mediante la técnica de inmunodifusión (Ouchterlony 1948). El antisuero utilizado se produjo sobre ratón por inyección de cuerpos de inclusión de PhopGV previamente disueltos con carbonato de sodio. Los tratamientos fueron los cuerpos de inclusión de larvas provenientes de la Planta Semicomercial de Baculovirus y un tratamiento control consistente en cuerpos de inclusión de larvas infectadas con PhopGV patrón.

Validación de la técnica de cuantificación viral

De la suspensión viral preparada en la Planta Semicomercial de Baculovirus se tomaron ocho muestras que fueron filtradas usando una jeringa de filtración con un filtro de 0,8 micras. Posteriormente, con una micropipeta se tomó un volumen de la muestra y se colocó en la cámara de Neubauer, la cual se cubrió con su respectiva laminilla de cuarzo y observada en el microscopio de campo oscuro a 400X, ajustando la cuadrícula central de la cámara. Se tomó una fotografía de la imagen con una cámara digital acoplada al microscopio y se imprimió para realizar el conteo de cuerpos de inclusión. El conteo de las partículas virales se realizó en cada uno de los 25 cuadrados que conformaron el cuadrante. Los resultados se promediaron y se utilizó el factor de conversión de la cámara para calcular el número de cuerpos de inclusión por mL.

El procedimiento descrito se repitió con cada muestra. Para la evaluación de repetibilidad, las ocho muestras evaluadas se tomaron de la misma suspensión viral y

se evaluaron con los mismos equipos, en el mismo día y con el mismo analista.

Determinación de las concentraciones letales

Para determinar la concentración letal media y noventa del PhopGV, tres larvas muertas de *T. solanivora* con síntoma viral fueron maceradas y llevadas a 100mL con una solución de Tween 80 al 0,1%, consistiendo ésta en la dilución 10^0 , a partir de la cual se prepararon 100mL de las diluciones decimales 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , determinando su concentración mediante conteo en cámara de Neubauer en microscopio de campo oscuro siguiendo la metodología descrita anteriormente después de haber sido validada. En cada dilución se sumergieron tres tubérculos de papa pastusa lavada durante 1 minuto, momento en el cual las papas fueron retiradas del líquido y puestas sobre un papel servilleta al ambiente para permitir el secado. Cada papa seca se ubicó en un recipiente plástico de 16 onzas y fue infestada con 20 larvas de *T. solanivora* de primer ínstar. Los recipientes se cerraron y se ubicaron aleatoriamente en un estante ubicado en un cuarto con temperatura promedio 25°C. Se contó con un testigo absoluto en el cual los tubérculos no fueron inoculados. Pasados 30 días, se registró la mortalidad de las larvas en cada unidad experimental mediante una evaluación destructiva de los tubérculos. Los insectos se clasificaron como vivos (larvas con movimiento y pupas) y muertos (larvas sin movimiento y larvas desaparecidas, lo que sugiere que murieron en estado neonato). Los resultados se utilizaron para calcular el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Ciba Geigy 1973) y se empleó el análisis Probit para determinar las concentraciones letales.

Elaboración del bioplaguicida

Una vez determinadas las concentraciones letales del aislamiento, se ajustó el proceso de manufactura del bioplaguicida para que la concentración final del producto fuera la concentración letal noventa (CL_{90}) determinada. Para tal fin se calculó la concentración requerida en la suspensión viral a partir de la cual se elaboró la formulación y basados en la desviación estándar de los resultados de la validación de la técnica de cuantificación viral se fijaron los límites de aceptación para dicha variable. Una vez fijado este parámetro, se elaboraron tres lotes del bioplaguicida en la Planta Semicomercial de Baculovirus.

Validación de técnicas de control de calidad

Con los productos se validaron las pruebas de control de calidad para el producto terminado. Dichas pruebas consistieron en la determinación del pH, la voluminosidad, el tamaño de partícula y la eficacia biocontroladora.

pH. Éste se midió con un potenciómetro, para lo cual se pesaron 10g de producto y se suspendieron en 100mL de agua destilada, a esta suspensión se le determinó el pH con el equipo previamente calibrado. La determinación se realizó a cinco muestras aleatorias provenientes de los tres lotes de bioplaguicida.

Voluminosidad. Es el volumen ocupado por un material sólido. Para su determinación se pesaron 50g de producto y se dejaron caer libremente en una probeta de 100 mL. Posteriormente, se leyó el volumen ocupado por este material en la probeta (VI) y se calculó la voluminosidad con la fórmula: $Voluminosidad = VI/50g$. Este parámetro se realizó a cinco muestras aleatorias provenientes de los tres lotes de bioplaguicida.

Tamaño de partícula. Se tomaron 100g de producto y se ubicaron en el primer tamiz de una columna de tamices organizados según el tamaño de poro de manera descendente de arriba hacia abajo, los cuales se aseguraron a un agitador vibratorio. El agitador se accionó por 10 minutos y terminada la agitación se pesó el material retenido en cada tamiz y se estableció en cual de ellos quedó la mayor cantidad de peso retenido. La determinación se realizó a cinco muestras aleatorias provenientes de los tres lotes de bioplaguicida.

Eficacia. Se realizaron bioensayos en los cuales la unidad experimental consistió en un tubérculo de papa ubicado en un recipiente plástico de 16 onzas infestado con 20 larvas de primer ínstar de la polilla guatemalteca. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento y estos consistieron en tubérculos pelletizados con el producto a base de PhopGV y un testigo absoluto que consistió en tubérculos lavados y secos. Pasados 30 días se realizó la evaluación destructiva de los tubérculos estableciendo el porcentaje de mortalidad. Los resultados se utilizaron para calcular el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Ciba Geigy 1973). La determinación se realizó a cuatro muestras aleatorias provenientes de los tres lotes de bioplaguicida.

Resultados y Discusión

Identificación viral

Microscopía electrónica

En las imágenes de microscopía electrónica de las muestras se observaron estructuras ovoides que coincidieron con la descripción típica de los cuerpos de inclusión del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (Fig. 1). Los cuerpos de inclusión aparecieron como corpúsculos de forma de bastón con un ancho aproximado de 260 a 280 nm y un largo aproximado de 460 a 480 nm. Estas características coincidieron con las reportadas para los granulovirus, los cuales han sido descritos como estructuras de esta forma con un tamaño entre 160 y 300 nm de ancho y entre 300 y 500 nm de largo (Caballero *et al.* 2001).

Análisis molecular del ADN

Los patrones de distribución de los fragmentos de ADN generados por la muestra digerida con las ocho enzimas de restricción, coincidieron con los obtenidos con el tratamiento control para las diferentes enzimas utilizadas. Este resultado confirma la identidad del virus como el granulovirus de *Phthorimaea operculella*.

La gran similitud en el ADN de diferentes aislamientos de este virus facilita su identificación por este método. La razón para la alta conservación de los sitios de restricción en las secuencias de ADN viral es desconocida, esta conservación además no es única de los granulovirus (Zeddiam *et al.* 1999). A pesar de que se

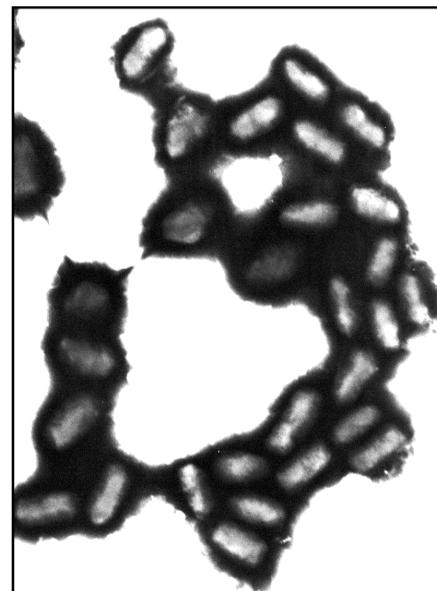


Figura 1. Microscopía electrónica de cuerpos de inclusión del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (10.000 x)

han reportado algunas pequeñas variaciones, como en el caso de granulovirus patógenos de *Pieris brassicae* y *Pieris rapae*, los cuales mostraron algunas diferencias en los patrones de distribución de los fragmentos de ADN, las diferencias mínimas encontradas no han dificultado su identificación por esta técnica molecular (Crook 1986).

Inmunodifusión

La reacción de inmunodifusión mostró bandas idénticas en los dos tratamientos consistentes en la muestra proveniente del principio activo del bioplaguicida y del tratamiento control (Fig. 2). Esto sugiere que el virus presente en la muestra es antigénicamente estrechamente relacionado con el PhopGV.

Los resultados de la aplicación de las técnicas de microscopía, serología y biología molecular son coherentes y permiten concluir que las larvas de *Tecia solanivora* examinadas estaban infectadas masivamente por un granulovirus. Las características establecidas por éste permitieron concluir que se trataba del granulovirus de *Phthorimaea operculella* descrito por primera vez en 1967 por Steinhilber y Marsh.

Validación de la técnica de cuantificación viral

Al observar las muestras en el microscopio de campo oscuro se observaron los cuerpos de inclusión (CI) como puntos brillantes con un ligero movimiento Browniano. Los resultados de concentración expresada como CI.mL⁻¹ para cada una de las ocho muestras evaluadas fueron 3,61 x 10⁶, 4,75 x 10⁶, 6,73 x 10⁶, 4,23 x 10⁶, 4,40 x 10⁶, 5,71 x 10⁶, 6,49 x 10⁶ y 4,47 x 10⁶ y el valor medio fue de

5,04 x 10⁶. Los resultados se transformaron calculando el logaritmo decimal de cada valor y con dichos valores se calcularon la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación de los datos. El coeficiente de variación expresado como porcentaje fue del 1,38%, indicando baja variabilidad y alta repetibilidad; en consecuencia, éstos sugieren que la técnica utilizada para evaluar la variable concentración de cuerpos de inclusión en la suspensión viral es precisa y confiable, por lo que puede utilizarse para el control de calidad del producto en proceso. Este método es el más utilizado para la cuantificación de cuerpos de inclusión en suspensiones acuosas puras o semipuras y se recomienda para facilitar la lectura un número de cuerpos de inclusión entre 20 y 40 por cuadrícula (Caballero *et al.* 2001). La implementación de dicho control en la manufactura del bioplaguicida permitió establecer una concentración fija y constante del virus en el producto.

Determinación de las concentraciones letales

Una vez validada, la técnica de cuantificación viral se utilizó para ajustar la concentración de diferentes suspensiones virales. Al evaluar las diferentes concentraciones del virus se encontró que a mayor concentración viral inoculada en los tubérculos, mayor número de larvas muertas y las pocas que se encontraban vivas, presentaron la sintomatología típica de la infección viral expresada como retardo en el crecimiento, disminución de la movilidad y una coloración blanca lechosa a través del integumento, la cual fue más notoria en la zona ventral (Fig. 3). A menor concentración del virus se encontró mayor número de pupas y larvas vivas de mayor tamaño. En el tratamiento control, en el cual no se aplicó virus, se obtuvo un 5% de mortalidad, 88% de los individuos se encontraban en estado de pupa y el 7% como larvas vivas y sanas sin sintomatología viral. Los porcentajes de eficacia para las diferentes concentraciones del virus correspondientes a 10², 10³, 10⁴, 10⁵ y 10⁶ CI.mL⁻¹ fueron del 5,26%, 14%, 59,5%, 59,7% y 92,9% respectivamente. Estos resultados indican que la concentración del virus es directamente proporcional a la mortalidad de las larvas de la Polilla guatemalteca de la papa.

El programa Probit determinó como concentración letal media 1.4x10⁴ CI.mL⁻¹ y como concentración letal noventa 8.0x10⁵ CI.mL⁻¹ (Tabla 1). Existen algu-

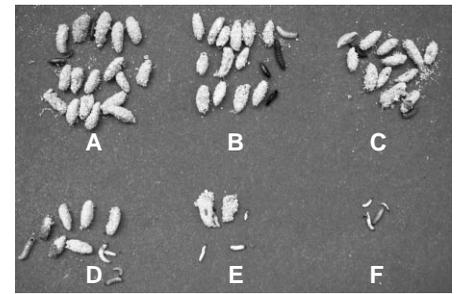


Figura 3. Pupas y larvas sobrevivientes a la infección con diferentes concentraciones del virus. (A) Testigo, (B) 10² CI.mL⁻¹, (C) 10³ CI.mL⁻¹, (D) 10⁴ CI.mL⁻¹, (E) 10⁵ CI.mL⁻¹, (F) 10⁶ CI.mL⁻¹.

nos trabajos en los que se ha buscado determinar las concentraciones letales de aislamientos de baculovirus, sin embargo, en la mayoría de los casos se ha utilizado el número de larvas o equivalentes larvales (E.L.) para medir las concentraciones y no la cuantificación de partículas virales por lo que los resultados han sido inconsistentes. Al trabajar con equivalentes larvales las concentraciones virales son variables pues cada larva puede tener un contenido diferente de cuerpos de inclusión dependiendo de cómo se haya desarrollado la infección.

Con un aislamiento de PhopGV procedente de Yemen se estableció como concentración letal media un valor de 7.3 x 10⁴ CI.mL⁻¹, mediante un experimento en el cual se expusieron neonatos de *P. operculella* a tubérculos tratados con diferentes concentraciones del virus (Kroshel *et al.* 1996 citado por Zeddani 1999). Esta concentración es similar a la obtenida en el presente trabajo con *T. solanivora*, a pesar de que el virus empleado en los dos estudios es un granulovirus de *Phthorimaea operculella*, por lo que se esperaba que presentara mayor patogenicidad contra su hospedero natural.

Alcázar *et al.* (1992) establecieron la CL₅₀ para un aislamiento de PhopGV para el control de *P. operculella* en 3.83 x 10³ CI.mL⁻¹, resultado aproximadamente 10 veces menor del encontrado en el presente estudio. Esto podría sugerir que dicho aislamiento es más patógeno que el evaluado en este trabajo o que *P.*

Tabla 1. Concentraciones letales de Baculovirus sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora*.

Concentración letal	Concentración (CI/mL)
CL ₁₀	2.4x10 ²
CL ₅₀	1.4x10 ⁴
CL ₉₀	8.0x10 ⁵

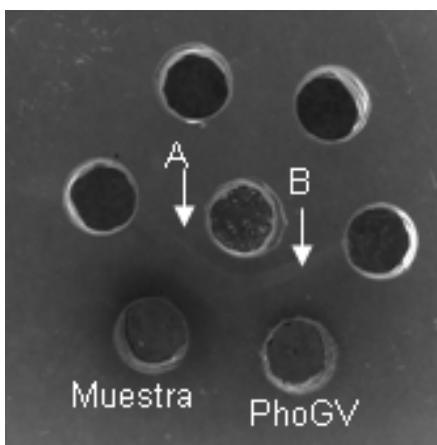


Figura 2. Evaluación serológica de la muestra. (A) y (B) bandas de reacción antígeno anticuerpo positivas para PhopGV.

operculella es más susceptible a este virus que *T. solanivora*.

Zeddami *et al.* (1999), establecieron la CL_{50} de diferentes aislamientos de PhopGV en *Phthorimaea operculella* para lo que prepararon diferentes dosis del virus utilizando como variable los equivalentes larvales. Con dichas suspensiones inocularon tubérculos de papa que infestaron con larvas de segundo o tercer ínstar de la polilla. Los autores concluyeron que todos aislamientos virales presentaron la misma patogenicidad y sus CL_{50} oscilaron entre 15.6 y 18.5 E.L.100mL⁻¹.

Después de determinar la CL_{50} del virus, se realizaron los cambios necesarios en el proceso de manufactura del bioplaguicida para ajustar en el producto una concentración final equivalente por unidad de peso, ésta fue de 8.0×10^5 CI.g⁻¹ y se estableció como concentración óptima en el producto con la cual se fijaron los límites de aceptación para la concentración de la suspensión viral utilizada para elaborar el formulado entre 2.0×10^6 y 6.2×10^6 CI.mL⁻¹. De esta forma, cada vez que se elabora un lote de bioplaguicida, se realiza como control de calidad la determinación de la concentración de la suspensión viral. Así el producto solo se usaría cuando se encuentra dentro de dicho rango. Esto ha permitido asegurar que todos los lotes de producto tengan la misma concentración viral y en consecuencia una eficacia biocontroladora constante.

Validación de técnicas de control de calidad

Para la variable pH se obtuvieron resultados que oscilaron entre 9.33 y 9.64 (Tabla 2), valor que se debe al soporte inerte utilizado como vehículo de la formulación. Los valores obtenidos presentaron baja variabilidad entre las diferentes muestras, con un bajo coeficiente de variación del 1.47%, que sugiere que la técnica es confiable y precisa y puede ser utilizada como un control de calidad para el producto. Con el resultado promedio y la desviación estándar de los datos se estableció como límite de aceptación para esta característica un rango entre 9.38 a 9.66.

Para la voluminosidad del bioplaguicida, característica que determina la facilidad en la manipulación del producto durante los procesos de llenado de empaques (Voight y Bomschein 1982), se obtuvieron valores entre 0.88 mL.g⁻¹ y 0.96 mL.g⁻¹ (Tabla 3) que se consideran bajos y están determinados por la voluminosidad del vehículo inerte.

Tabla 2. Valores de pH en diferentes muestras del producto a base de Baculovirus. SD: Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación.

Muestra	pH
1	9.33
2	9.61
3	9.64
4	9.43
5	9.63
Promedio	9.52
SD	0.14
C.V.	1.47

te. Estos valores se consideran adecuados según la industria farmacéutica, la cual recomienda voluminosidades inferiores a 3 mL.g⁻¹ para asegurar que no presentará problemas de manipulación durante el proceso de manufactura y empaque (Voight y Bomschein 1982). Los resultados presentaron una baja variabilidad entre réplicas, con un coeficiente de variación del 3.59%, el cual indicó que esta técnica también es altamente repetible y puede ser utilizada como un control de calidad confiable. Los límites de aceptación para esta característica se fijaron entre 0.60 mL.g⁻¹ y 1.26 mL.g⁻¹ y se estableció que dicho control debe realizarse al producto antes de iniciar la operación de llenado de envases.

En la determinación del tamaño de partícula del producto, la mayor cantidad de peso retenido se obtuvo en el tamiz con tamaño de poro 59 micras (Tabla 4). También se observó que en el colector de polvos finos quedó retenido un 40.72% del material, resultado que indica que un alto porcentaje de las partículas presentan un tamaño inferior a 59 micras. Este aspecto asegura una buena adherencia sobre la superficie de los tubérculos. Los resultados de las diferentes muestras presentaron coeficientes de variación inferiores al 5%, valores bajos que indicaron que la técnica es precisa,

Tabla 3. Valores de voluminosidad en diferentes muestras del producto a base de Baculovirus. SD: Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación.

Muestra	Voluminosidad (mL/g)
1	0.96
2	0.95
3	0.96
4	0.93
5	0.88
Promedio	0.936
SD	0.336
C.V.	3.5914

Tabla 4. Distribución de tamaños de partícula del producto a base de Baculovirus. SD: Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación.

Tamaño de poro (micras)	Porcentaje promedio de peso retenido(%)	S.D.	C.V.
280	0	0	0
200	0	0	0
100	11.4	0.51	4.56
59	47.94	0.42	0.89
Colector	40.72	0.68	1.687

con alta repetibilidad y es adecuada como control de calidad del producto.

En cuanto a la evaluación de la eficacia del bioplaguicida, los resultados con las cuatro muestras oscilaron entre 89.2% y 100% (Tabla 5), valores que muestran que el producto es eficiente para el control de la plaga. Estos resultados además presentaron un coeficiente de variación del 5.5%, considerado bajo para este tipo de ensayos biológicos; este indica que la metodología empleada para el bioensayo es precisa y de alta repetibilidad. Si se tiene en cuenta que la técnica desarrollada es sencilla, rápida y económica, puede considerarse óptima para el control de calidad del producto.

La validación de estas técnicas permitió elaborar Procedimientos Operativos Estándar (POE's) que describen la metodología detallada de cada prueba y un formato para el registro de los resultados parciales y finales de cada evaluación. Con base en dicha documentación el laboratorio de control de calidad Bio-técnica adscrito al laboratorio de Control Biológico de Corpoica se registró ante el ICA. Éste presta el servicio de control de calidad a la Planta de Producción de Baculovirus y es el único laboratorio registrado en el país para desarrollar dichos análisis.

Tabla 5. Actividad biocontroladora de diferentes muestras del producto a base de Baculovirus. SD: Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación.

Muestra	Eficacia (%)
1	100
2	100
3	89.2
4	100
Promedio	97.25
S.D.	5.4
C.V.	5.5

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a Colciencias por su apoyo financiero para el desarrollo del presente trabajo.

Literatura citada

- ALCÁZAR, J.; CERVANTES, M.; RAMAN, K. 1992. Caracterización y patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*. Revista Peruana de Entomología. 35: 107-111.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.; WILLIAMS, T. 2001. Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial Phytoma. Navarra-España. 479p.
- CIBA- GEIGY. 1973. Manual de ensayos de campo. 215 p.
- CIP. 2000. Control Biológico de la polilla de la papa con *Baculovirus phthorimaea*. Boletín de Capacitación CIP -2, Lima, 43p.
- CROOK, N. 1986. A comparison of the granulosis virus isolated from *Artogeia rapae* and *Pieris brassicae*. Journal of General Virology. 67: 781-787.
- NIÑO, L.; NOTZ, A. 2000. Patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado de Mérida, Venezuela. Boletín Entomológico de Venezuela. 15(1): 39-48.
- OUCHTERLONY, O. 1948. Antigen-antibody reaction in gel. Ark. Keni. Miner. Geol. (B) 26: 16.
- STEINHAUS, E.; MARSH, G. 1967. Previously unreported accessions for diagnosis and new records. Journal of Invertebrate Pathology. 9: 436-438.
- VOIGHT, R & BOMSCHEIN, M. 1982. Tratado de tecnología farmacéutica. Editorial Acribia. España. p. 42-211.
- ZEDDAM, J.L.; POLLET, A.; MANGOEN-DIHARJO, S.; HARIS RAMADHAN, T.; LÓPEZ FERBER, M. 1999. Occurrence and virulence of a granulovirus in *Phthorimaea operculella* (Lep. Gelechiidae) populations in Indonesia. Journal of Invertebrate Pathology 74: 48-54.
- ZEDDAM, J-L., VÁSQUEZ, M., VARGAS, Z., LAGNAOUI, A. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Plagas, 29(4), pp. 659-667.

Recibido: 14-dic-04 • Aceptado: 25-jul-05

Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad y actividad biocontroladora de *Nomuraea rileyi* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Effect of cryopreservation on the viability and the biocontrol activity of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

LISSETTE TORRES¹, ALBA MARINA COTES²

Resumen. El hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* constituye una de las alternativas más prometedoras para el control de *Spodoptera frugiperda*, la plaga más limitante del maíz en Colombia. En un trabajo previo se seleccionó un aislamiento nativo de *N. rileyi* que ocasionó una mortalidad del 100% sobre larvas de la plaga en laboratorio. Sin embargo, la actividad biocontroladora de los microorganismos puede verse afectada por aspectos como el método de conservación. En este estudio se determinó el efecto de la crioconservación en glicerol con agua peptonada a -70°C, sobre la viabilidad y actividad biocontroladora del hongo a través del tiempo. A partir de una suspensión de 1×10^7 conidios.ml⁻¹, se determinó el porcentaje de germinación, el número de unidades formadoras de colonia (UFC) y el porcentaje de eficacia del microorganismo sobre larvas, antes de su crioconservación (control), a las 24 horas, a los 12 meses y a los 18 meses. Al evaluar su viabilidad expresada como porcentaje de germinación y como UFC, 24 horas después de la crioconservación, no se evidenció reducción con respecto al control; pero a partir de los doce meses se presentó un retardo de 18 horas en alcanzar un porcentaje de germinación superior al 90% y una pérdida de un exponente para UFC. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en la mortalidad de las polillas en cada uno de los tiempos evaluados, siendo ésta superior al 96.4%. Se puede concluir que la crioconservación durante dieciocho meses no afecta la germinación ni la actividad biocontroladora del microorganismo pero sí su UFC.

Palabras clave: Conservación. Entomopatógeno. Gusano cogollero del maíz.

Summary The entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* is one of the most promising alternatives for the control of *Spodoptera frugiperda*, the most important pest of maize in Colombia. In previous work, a native isolate of *N. rileyi* was selected that caused 100% mortality on larvae of the pest under laboratory conditions. However, biocontrol activity of microorganisms may be affected by different factors such as preservation method. This study determined the effect of cryopreservation in glycerol and peptone at -70°C on its viability and biocontrol activity over time. From a suspension of 1×10^7 conidia.ml⁻¹, germination percentage, number of colony-forming units (CFU) and percent efficacy of the microorganism on larvae were determined before cryopreservation (control), after 24 hours, 12 months and 18 months. An effect on the viability of the microorganism expressed as percent germination and as CFU was not evident 24 hours after cryopreservation with respect to the control; but after 12 months there was a delay of 18 hours to reach a percent germination above 90% and a one exponent loss to CFU. However, no significant differences were detected in moth mortality in any of the evaluated times, being higher than 96.4%. It is concluded that cryopreservation over 18 months does not affect the germination or the biocontrol activity but does affect the CFU.

Key words: Conservation. Entomopathogen. Fall army worm.

Introducción

El cultivo del maíz ocupa un lugar muy importante dentro de los sistemas de producción agrícola de Colombia al ser el segundo cereal más producido después del arroz. Dicha producción para el 2003 fue de 1.173.800 toneladas, que en términos de rendimiento representó 2.1 toneladas por hectárea (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2004). Sin embargo, el rendimiento de este cultivo se ha visto reducido hasta en un 35% debido al daño ocasionado por el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Fernández 2003 citado por Castillo 2003), el cual se ha convertido

en la plaga más limitante del cultivo si se tiene en cuenta que, además de ser una plaga polífaga, se encuentra ampliamente distribuida en las zonas productoras de maíz afectándolo en las diferentes etapas de su desarrollo. Ante esta problemática se han venido utilizando diferentes métodos de control, como el cultural el cual, no ha sido suficiente para disminuir los daños ocasionados por la plaga, el control químico ha traído consigo un uso exagerado e inadecuado de plaguicidas que han afectado severamente el ambiente al alterar las poblaciones de enemigos naturales, fauna y flora asociada, así como también ha originado problemas de contaminación. Es así como el control biológico, mediante el uso de

hongos entomopatógenos, aparece como una alternativa frente a las debilidades de los demás métodos de control, ya que puede representar una solución duradera y efectiva, amigable con el medio ambiente y altamente específica hacia su hospedero (García *et al.* 2002).

En el control biológico de *S. frugiperda* se ha destacado la actividad del hongo *Nomuraea rileyi*, el cual se encuentra distribuido en diferentes agroecosistemas y zonas geográficas donde frecuentemente ocasiona epizootias naturales sobre este insecto y otros lepidópteros de importancia económica como *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepi-

1 Autor para correspondencia B.Sc. Investigadora Laboratorio de Control Biológico. C.I, Tibaitatá. Corpoica. E-mail: lissettetorres@yahoo.es

2 Ph.D. Investigador principal. Laboratorio de Control Biológico. C.I, Tibaitatá. Corpoica. E-mail: acotes@corpoica.org.co

doptera: Noctuidae), *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Helicoverpa virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Es así como este microorganismo se ha convertido en un excelente agente de control biológico con gran potencial para ser utilizado dentro de estrategias de Manejo Integrado de la Plaga (León y Pulido 1991).

Estudios realizados en Venezuela, reportaron una incidencia del 100% sobre larvas de *S. frugiperda* alimentadas con hojas de maíz provenientes de campo e infectadas con *N. rileyi* (García y Clavijo 1985). Así mismo, Lezama-Gutiérrez *et al.* (2000), reportaron a *N. rileyi* como el entomopatógeno con mayor ocurrencia en larvas de *S. frugiperda*, en comparación con *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* Metschnikov 1879, *Hirsutella* sp. y *Entomophthora* sp. Por otra parte, según estudios realizados por García *et al.*, (2002), aplicaciones de este entomopatógeno en forma de cebo en lotes comerciales de maíz en el Valle del Cauca, ocasionaron porcentajes de eficacia superiores al 90% por un tiempo mayor a 20 días después de su aplicación. A pesar de este potencial como agente biocontrolador, no existe ningún bioplaguicida registrado a base de este microorganismo ni en Colombia ni en el mundo (Villamizar *et al.* 2004).

En este sentido, el Laboratorio de Control Biológico del Programa de Manejo Integrado de Plagas de Corpoica, con su compromiso de producir insecticidas microbianos seguros, eficaces y confiables, ha destinado gran parte de sus esfuerzos de los últimos años hacia el aislamiento, evaluación, producción y formulación de *N. rileyi*. Es así como actualmente cuenta con el aislamiento nativo Nm006 de este microorganismo obtenido a partir de larvas de *S. frugiperda* recolectadas en un cultivo de maíz ubicado en el departamento del Meta, que ha ocasionado una mortalidad del 100% sobre éstas, bajo condiciones de laboratorio (Bosa *et al.* 2004).

A pesar que *N. rileyi* es un microorganismo exigente en cuanto a los requerimientos necesarios para su adecuado crecimiento y esporulación (Boucias *et al.* 2000), Villamizar *et al.* (2004) estandarizaron un medio para su producción masiva con el que se han alcanzado rendimientos de 3.0×10^9 conidios.gramo⁻¹. Así mismo, se desarrollaron diferentes preformulaciones a base de este microorganismo, seleccionándose un concentrado emulsionable con

la cual se han obtenido porcentajes de eficacia del 96.6% (L. Villamizar, com. pers.).

Dada la importancia de garantizar la estabilidad de las características necesarias para su producción y para su actividad biocontroladora, el microorganismo fue incorporado al Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico, el cual tiene como propósito preservar las características originales de los aislamientos allí presentes. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue el de evaluar el efecto de la criopreservación en el tiempo sobre la viabilidad y actividad biocontroladora de *Nomuraea rileyi* contra *Spodoptera frugiperda*.

Materiales y Métodos

Se determinó la viabilidad y la actividad biocontroladora del aislamiento Nm006 de *N. rileyi* antes de su criopreservación y a las 24 horas, a los 12 meses y a los 18 meses después de ésta. Para la evaluación de la viabilidad se determinó el porcentaje de germinación y el número de unidades formadoras de colonia (UFC) y para la evaluación de la actividad biocontroladora, se determinó el porcentaje de eficacia y el tiempo letal noventa (TL₉₀) mediante bioensayos bajo condiciones de laboratorio.

Efecto de la criopreservación sobre la viabilidad del aislamiento

A partir del microorganismo crecido y esporulado sobre Agar Extracto de Levadura – Extracto de Malta (YM), se preparó una suspensión madre en el criopreservante, que consistió en una mezcla de glicerol y agua peptonada. Dicha suspensión se ajustó a la concentración de 1×10^7 conidios ml⁻¹ y partir de ésta se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} ; para determinar el porcentaje de germinación se utilizó la suspensión madre y la dilución 10^{-1} sembrando 100 mL de cada una de ellas en cajas de Petri con medio YM. Posteriormente, las cajas se incubaron a 25°C y a partir de las 18 horas de incubación se determinó el porcentaje de conidios germinados en el tiempo hasta que éste superó el 90%. Para ello se registró el número de conidios totales presentes en 10 campos ópticos seleccionados aleatoriamente de tres cajas de Petri. Los resultados se expresaron como el porcentaje de conidios germinados.

Para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC), se sembraron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-5} de la

misma manera descrita anteriormente y se hicieron observaciones diarias hasta evidenciar el crecimiento puntual de las colonias.

Por otra parte y con el fin de determinar la viabilidad del microorganismo después de su criopreservación, se prepararon los crioviales necesarios para hacer estas evaluaciones en el tiempo, sirviendo 1 mL de la suspensión que contenía 1×10^7 conidios.ml⁻¹ por criovial. Posteriormente, todos los crioviales se mantuvieron en un ultracongelador a -70°C durante 24 horas, 12 meses y 18 meses. Transcurridos cada uno de estos períodos, se tomó al azar un criovial, se descongeló a 37°C y se determinaron el porcentaje de germinación y el número de UFC siguiendo la metodología anteriormente descrita; así mismo, se determinó el efecto de la criopreservación en el tiempo sobre la actividad biocontroladora del microorganismo contra *S. frugiperda*.

Para la evaluación del porcentaje de germinación y del número de UFC del microorganismo antes y después de su criopreservación, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento, siendo cada repetición una caja de Petri, y los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANAVA) y a la prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$).

Efecto de la criopreservación sobre la actividad biocontroladora

Para determinar el efecto de la criopreservación sobre la actividad biocontroladora de *N. rileyi*, se realizaron cinco bioensayos en el tiempo, en los cuales se evaluó esta actividad antes de la criopreservación y 24 horas, 6 meses, 12 meses y 18 meses después de ésta. Para tal fin, a partir del microorganismo mantenido en Agar YM antes y después de su criopreservación durante cada uno de los tiempos evaluados, se preparó una suspensión en el tensoactivo Tween 80 al 0.1% ajustada a una concentración de 1×10^7 conidios.ml⁻¹. Posteriormente, por medio de un aspersor manual se asperjó sobre 30 hojas de higuera (*Ricinus communis*) a razón de 1.2 mL sobre el haz y el envés de cada hoja, previamente desinfectada en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%. La unidad experimental consistió en un recipiente plástico de 16 onzas, en cuyo interior se ubicó un papel húmedo, una hoja de higuera y una larva de tercer ínstar de *S. frugiperda*, proveniente de una cría establecida en el Laboratorio de Control Biológico. Estos se mantuvieron

bajo condiciones de laboratorio a 25°C y 55% de humedad relativa. Se tomaron datos de mortalidad cada tercer día a partir del quinto día del montaje del bioensayo hasta alcanzar un porcentaje de mortalidad del 100%. Los resultados se corrigieron calculando el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider – Orelli (Ciba – Geigy 1973):

$$\text{Porcentaje de eficacia} = (b - k) / (100 - k) \times 100$$

Donde **b** equivale al porcentaje de individuos muertos en el tratamiento y **k** equivale al porcentaje de individuos muertos en el testigo absoluto.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 30 repeticiones por tratamiento, en el cual cada larva fue una repetición. Los tratamientos correspondieron a un testigo absoluto (hojas de higuera sin ninguna aplicación), un testigo tratado en el cual se asperjó Tween 80 al 0.1% sobre hojas de higuera y a la aplicación del entomopatógeno antes y después de su crioconservación. Debido a que los resultados no se comportaron como una normal, los datos se sometieron a la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$). Adicionalmente, se determinó el tiempo letal 90 (TL_{90}) del microorganismo antes y después de su crioconservación; los datos de mortalidad se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$).

Resultados y Discusión

Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad del aislamiento

Se encontró que el porcentaje de germinación fue superior al 90% a las 48 horas de lectura antes de la crioconservación y 24 horas después de la crioconservación. Sin embargo, a partir de los 12 meses después de la crioconservación, se evidenció este mismo porcentaje aproximadamente a las 18 horas de lectura (Tabla 1).

Este retraso en la germinación, que fue más evidente a partir de los 18 meses, podría estar relacionado con un efecto de latencia inducido por el tiempo de crioconservación si se tiene en cuenta que se obtuvo un porcentaje de germinación inferior al 17% al comienzo del período de recuperación del microorganismo que correspondió a 18 horas después de la descongelación y cultivo sobre medio agar YM, pero a medida que este período de recuperación aumentó, también lo hizo su germinación. Así

Tabla 1. Efecto de la crioconservación en el tiempo sobre el porcentaje de germinación (%) del aislamiento Nm006 de *N. rileyi*.

Tratamiento	Tiempo de lectura				
	18 horas	24 horas	42 horas	48 horas	66 horas
Antes	15.18	26.74	57.89	91	
24 horas después	14.2	16.12	61.70	97.61	
12 meses después	17.77	46.75	71.22	84	95.08
18 meses después	4.66	19.65	63.75	70	95.45

mismo, el tiempo requerido por el microorganismo para alcanzar el 90% de germinación después de los 12 meses de su crioconservación, fue significativamente superior (57.37 horas) con respecto a los tiempos requeridos por el microorganismo antes y 24 horas después, que fueron de 47.47 horas y 44.25 horas, respectivamente (Tabla 2).

Los resultados podrían indicar que la crioconservación afectó el tiempo de germinación de los conidios, pero no su capacidad de germinar. Lo anterior concuerda con estudios realizados por Bahamón *et al.* (2001), quienes atribuyeron el retardo en la germinación de *Beauveria bassiana* después de su crioconservación durante seis meses a la latencia inducida del microorganismo por el choque osmótico de los criopreservantes o por cambios en la permeabilidad de la membrana.

Sin embargo, los resultados demostraron que el glicerol favorece la germinación de *N. rileyi* después del período de recuperación sobre el medio de cultivo, lo que podría deberse a la capacidad del glicerol de penetrar la pared celular y la membrana citoplasmática de las células, protegiéndolas de la desecación y del daño producido por los cristales intracelulares (Simione 1998). Esta misma capacidad, también se ha evidenciado en la conservación de virus, bacterias, micoplasmas, mixomycetes, otros hongos filamentosos, levaduras, algas y protozoos (Hubálek 2003). Adicionalmente, la

Tabla 2. Tiempo en el cual se obtuvo el 90% de la germinación del aislamiento Nm006 de *N. rileyi* antes y después de su crioconservación.

Tratamientos	Tiempo (horas)
Antes	47.47 a
24 horas después	44.25 a
12 meses después	57.37 b
18 meses después	59.59 b

(*) Letras distintas indican diferencias significativas a un nivel de significancia 0.05 (Prueba LSD).

peptona usualmente es usada como diluyente para microorganismos que van a ser sometidos al proceso de crioconservación, ofreciéndoles protección durante la congelación y la descongelación. Al utilizar este compuesto en combinación con el glicerol, se pudo acentuar el efecto protector de este último (Hubálek 2003).

A pesar de que no se observó pérdida en la germinación de los conidios, a partir de los 12 meses de la crioconservación se presentó una reducción de un exponente en el número de unidades formadoras de colonia (UFC) (Tabla 3). Ésta podría deberse a la alteración de los mecanismos fisiológicos involucrados en la formación de micelio. Sin embargo, es necesario desarrollar trabajos de investigación que generen respuestas a este supuesto, ya que existe una gran cantidad de factores que afectan la eficiencia de la crioconservación de los microorganismos. Tal es el caso de la especie, el aislamiento, el tamaño y forma de las células, la tasa y fase de crecimiento, la temperatura de incubación, la composición del medio de cultivo, el pH, la osmolaridad, la aireación, el contenido de agua celular, la composición del medio de cultivo, la densidad de congelamiento, la tasa de enfriamiento, la temperatura y duración del almacenamiento, la tasa de calentamiento y el medio de recuperación (Hubálek 2003). Sin embargo, uno de los factores más importantes es la composición del medio usado para suspender el microorganismo congelado; aunque al-

Tabla 3. Efecto de la crioconservación en el tiempo sobre el número de unidades formadoras de colonia (UFC) del aislamiento Nm006 de *N. rileyi*.

Tratamientos	UFC.mL ⁻¹
Antes	2,46 x 10 ⁶ a
24 horas después	3,29 x 10 ⁶ a
12 meses después	3,03 x 10 ⁵ b
18 meses después	1,54 x 10 ⁵ b

(*) Letras distintas indican diferencias significativas a un nivel de significancia 0.09 (Prueba LSD).

gunos microorganismos han sido capaces de sobrevivir a condiciones de congelamiento sin uso de aditivos protectores, la presencia de éstos favorece la supervivencia considerablemente (Hubálek 2003).

Smith y Tomas (1997) al observar mediante un microscopio criogénico de luz la viabilidad de siete aislamientos de hongos durante su congelación y descongelación, encontraron que la ausencia de criopreservantes favoreció la formación de hielo intracelular y el encogimiento de las hifas; características que no fueron letales para el microorganismo, pero que en muchos casos afectaron su tasa y calidad de crecimiento, en contraste con los resultados obtenidos al utilizar glicerol y dimetil- sulfóxido (DMSO).

Aunque no existen registros que hayan determinado el efecto de la criopreservación sobre la viabilidad de *N. rileyi*; se han realizado algunos trabajos con otros microorganismos. Ryan *et al.* (2001) en su estudio relacionado con los efectos de la criopreservación y liofilización sobre la viabilidad, fisiología y estabilidad genética de aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium oxysporum* Link ex Gray y *Serpula lacrymans* (Wulfen) J. Schröt.; encontraron que algunas de sus características pueden afectarse por la preservación. Tal es el caso de los perfiles de metabolitos secundarios y la producción de enzimas extracelulares, incluso se detectaron mediante la técnica de PCR fingerprinting, polimorfismos en dos aislamientos de *M. anisopliae* después de su criopreservación y liofilización. Sin embargo, al criopreservar una cepa de *Beauveria bassiana* durante seis meses en nitrógeno líquido a -196°C usando glicerol al 10% como criopreservante, se obtuvo un incremento en el porcentaje de germinación siendo éste del 70% y del 90.5% al inicio y al final de la evaluación respectivamente (Bahamón *et al.* 2001).

Por otra parte, Mota *et al.* (2003) evidenciaron un incremento en el crecimiento micelial, en la producción de biomasa y en la esporulación de los hongos controladores de nematodos *Arthrobotrys robusta* Dudd y *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler) de Hoog & van Oorschot al ser criopreservados durante 18 meses en glicerol al 10% y nitrógeno líquido a -196°C , con respecto a su conservación a 4°C sin ningún preservante. Así mismo, al conservar especies de hongos entomopatógenos como *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (Hyphomycete), *Smittium culisetae* Lichtwardt, 1964 (Trichomycete)

y *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Oomycete), bajo diferentes métodos tales como agua desionizada, aceite mineral, sílica gel y criopreservación a -20°C y a -80°C , no presentaron pérdida en su viabilidad al ser mantenidas durante 3, 6, 12 y 18 meses bajo este último método (Lastra *et al.* 2002).

Efecto de la criopreservación sobre la actividad biocontroladora

No se presentaron diferencias significativas entre los porcentajes de eficacia (actividad biocontroladora) antes y después de su criopreservación; siendo estos superiores al 96% al final de la evaluación (Fig. 1).

Estos resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Bahamón *et al.* (2001), quienes al evaluar la actividad biocontroladora de un aislamiento de *B. bassiana* contra la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) después de seis meses de su conservación en glicerol, obtuvieron un porcentaje de mortalidad del 91.6%. Según Clarkson y Charnley (1996), la capacidad patogénica de un hongo entomopatógeno, como *N. rileyi*, depende en gran medida de la actividad del complejo enzimático encargado de degradar la cutícula o exoesqueleto del insecto. Tal es el caso de las proteasas, quitinasas y lipasas, las cuales pueden presentar reducción en su actividad a temperaturas entre -12°C y -75°C debido a cambios estructurales en su sitio activo (Shikama y Yamasaki 1961 citados por Bahamón *et al.* 2001). Sin embargo, el uso del glice-

rol y de la peptona en la conservación del aislamiento Nm006 de *N. rileyi*, al actuar como osmoreguladores en la célula pudieron reemplazar las moléculas de agua perdidas, manteniendo la hidratación de las proteínas, especialmente las de bajo peso molecular. Así mismo, el glicerol al ser excluido del dominio de la proteína, pudo evitar la inestabilidad en su composición (Crowe *et al.* 1984; Crowe *et al.* 1990 y Fink 1986 citados por Bahamón *et al.* 2001). Esta misma acción estabilizante ha sido observada en la producción de enzimas ligninolíticas por diferentes Basidiomycetes criopreservados en DMSO y en glicerol (Stoychev *et al.* 1998; Croan *et al.* 1999).

Lastra *et al.* (2002) no encontraron pérdida en la actividad biocontroladora de los hongos entomopatógenos *Smittium culisetae* y *Leptolegnia chapmanii* al ser evaluados contra *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae), después de 18 meses de su criopreservación a -80°C . También, se ha podido comprobar el efecto protector del glicerol en los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, *Colletotrichum fragariae* Brooks y *Phomopsis obscurans* Ellis & Everh. [stat. anam.] (1894), ya que no presentaron pérdidas en su viabilidad al ser conservados a -85°C , durante 21 meses, ni presentaron cambios en su patogenicidad después de cuatro años de su conservación bajo las mismas condiciones (Legard y Chandler 2000).

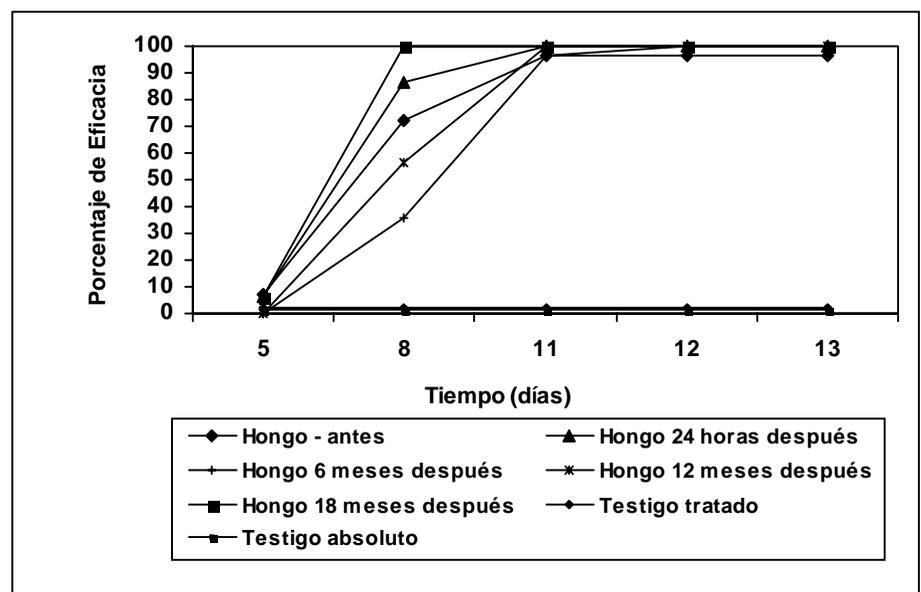


Figura 1. Efecto de la criopreservación en el tiempo sobre la actividad del aislamiento Nm006 de *N. rileyi* contra *S. frugiperda*.

El TL_{90} del aislamiento Nm006 de *N. rileyi* crioconservado durante 18 meses, correspondió a 7.67 días y fue significativamente inferior con respecto a los TL_{90} obtenidos para el microorganismo antes de su crioconservación y 24 horas y 12 meses después de ésta, los cuales correspondieron a 11.25, 10.79 y 11.45 días, respectivamente (Tabla 4). Estos resultados podrían indicar un efecto potencializador de la crioconservación durante 18 meses sobre la actividad biocontroladora del microorganismo. Los polioles, especialmente aquellos de bajo peso molecular como el glicerol, el eritritol y la trehalosa juegan un papel muy importante en el balance osmótico de las células, brindando protección a la membrana y a las proteínas. De igual manera, estos compuestos se han asociado con la tolerancia a ciertas condiciones ambientales, con la aceleración de la germinación e incluso con el incremento en la patogenicidad y en la vida de almacenamiento de los propágulos fúngicos, como ha sido demostrado para los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Paecilomyces farinosus* (Holm:Fr.) Brown & Smith (Hallsworth y Magas 1996). Es posible que el glicerol utilizado como agente criopreservante en el presente estudio hubiera sido acumulado en la pared celular y en la membrana citoplasmática de las células del microorganismo protegiéndolas; además los polioles u otros metabolitos producidos por éste una vez fue descongelado y sembrado sobre medio de cultivo YM, favoreció la germinación de *N. rileyi* y su actividad biocontroladora contra *S. frugiperda*. Debe considerarse que la realización de diferentes bioensayos en el tiempo, impidió el uso de larvas de *S. frugiperda* provenientes de una misma colonia y de una misma generación; hecho que podría estar relacionado con una mayor susceptibilidad del insecto frente al ataque del hongo entomopatógeno, especialmente al llevarse a cabo la evaluación después de los 18 meses de la crioconservación,

Tabla 4. TL_{90} del aislamiento Nm006 de *N. rileyi* antes y después de su crioconservación.

Tratamientos	TL_{90} (días)
Antes	11.25 a
24 horas después	10.79 a
6 meses después	11.45 a
12 meses después	11.22 a
18 meses después	7.67 b

(*) Letras distintas indican diferencias significativas a un nivel de significancia 0.05 (Prueba LSD).

repercutiendo en los resultados del efecto de la crioconservación; hay que tener en cuenta que los datos de número de UFC cambiaron a través del tiempo, y en estas evaluaciones no se tuvieron en cuenta los insectos, por consiguiente se podría decir que si hay un efecto de la crioconservación. Sin embargo, es necesario continuar con estas evaluaciones durante un mayor tiempo para poder confirmar la repetibilidad de las observaciones realizadas. De ser así, esta metodología podría ser incorporada dentro del desarrollo tecnológico del biocontrolador ya que permitió el incremento de la actividad biocontroladora de *N. rileyi*.

Conclusiones

La crioconservación del aislamiento Nm006 de *Nomuraea rileyi* en glicerol y agua peptonada durante 18 meses, no afectó su germinación ni su actividad biocontroladora, pero sí su número de UFC.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Sistema de Bancos de Germoplasma financiado mediante el convenio tripartito entre Corpoica, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y el Instituto Colombiano Agropecuario.

Literatura citada

BAHAMÓN, T.; AYCARDI, E.; OROZCO, J.; MARÍN, P.; BUSTILLO, A. 2001. Preservación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin (Moniliales: Moniliaceae) contra la broca del café en diferentes sistemas. Revista Colombiana de Biotecnología 3 (1): 80-90.

BOSA, C. F.; CHÁVEZ, D.; TORRES, L.; PARÍS, A.; VILLAMIZAR, L.; COTES, A. M. 2004. Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología 30 (1): 94-97.

BOUCIAS, D. G.; TIGANO, M. S.; SOSA – GÓMEZ, D. R.; GLARE, T. R.; INGLIS, P. W. 2000. Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Biological Control (19): 124-38.

CASTILLO, L. F. 2003. Efecto de la composición del medio de cultivo en la virulencia de *Nomuraea rileyi* sobre el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Trabajo de grado de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Microbiología Industrial. Bogotá. 149 p.

CIBA – GEIGY. 1973. Cómo realizar un bioensayo. Manual de ensayos de campo. 215 p.

CLARKSON, J.; CHARNLEY, A. K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends in Microbiology 4 (5) 197-202.

CROAN, S. C.; BURDSALL, H. H.; RENTMEESTER, R. M. 1999. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes. Mycologia 91 (5): 908-916.

GARCÍA, J. L.; CLAVIJO, S. 1985. Incidencia del hongo *Nomuraea* sp (Deuteromycete: Ascomycotina) en larvas de *Spodoptera frugiperda* criadas en el laboratorio y alimentadas con plantas provenientes de campos comerciales de maíz. Boletín de Entomología Venezolana. N. S. 4(7): 53-59.

GARCÍA, F.; MOSQUERA, M.; VARGAS, C.; ROJAS, L. 2002. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), plaga del maíz y otros cultivos en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 28 (1): 53-60.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. 1996. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. Applied and Environmental Microbiology 62 (7): 2435-2442.

HUBÁLEK, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology 46 (3): 205-229.

LASTRA, C.C.; HAJEK, A. E.; HUMBER, R. A. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Canadian Journal of Botany 80(10):1126-1130.

LEGARD, D. E.; CHANDLER, C. K. 2000. Cryopreservation of the strawberry pathogens *Colletotrichum gloeosporoides*, *C. acutatum*, *C. fragariae* and *Phomopsis obscurans* in a -95°C mechanical ultra-low temperature freezer. HortScience 35 (7): 1357-1361.

LEÓN, M.; PULIDO, J. L. 1991. Importancia del control natural del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Memorias. Seminario *Spodoptera frugiperda* (El Gusano Cogollero) en sorgo, maíz y en otros cultivos. p. 78-82. Cali.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; JAMM, J.; MOLINA-OCHOA, J.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; PESCADOR-RUBIO, A.; GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M.; STYER, E. 2000. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. Armyworm Symposium. México. 8 p.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, 2004. Colombia:

- Producción, superficie y rendimiento de productos agropecuarios web site. <http://www.comunidadandina.org/estadisticas/comp9099/agro-col.xls>. Fecha último acceso: 24 septiembre 2004.
- MOTA, M.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J. V. 2003. Sporulation, radial growth and biomass production of *A. robusta* and *M. thaumasiium* submitted to different methods of preservation. *Brazilian Journal of Microbiology* 34 (2): 157-160
- RYAN, M.; JEFFRIES, P.; BRIDGE, P.; SMITH, D. 2001. Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function. *CryoLetters* (22) 125-134.
- SIMIONE, F. 1998. Cryopreservation Manual. American Type Culture Collections – Nelsong International Corp. Estados Unidos. 8 p.
- SMITH, D.; THOMAS, V. E. 1997. Cryogenic light microscopy and the development of cooling protocols for the cryopreservation of filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 (1): 49-57.
- STOYCHEV, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F.; LISÁ, L. 1998. Activities of ligninolytic enzymes in some white-rot basidiomycete strains after recovering from cryopreservation in liquid nitrogen. *International Journal of General and Molecular Microbiology* 73 (3): 211-214.
- VILLAMIZAR, L.; ARRIERO, C.; BOSA, F.; COTES, A. 2004. Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control del *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología* 30 (1): 99- 105.

Recibido: 14-dic-04 • Aceptado: 21-jun-05

Caracterización biológica de los compuestos de la feromona sexual de *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)

Biological characterization of the sex pheromone compounds *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)

CARLOS FELIPE BOSA O.¹, PETER WITZGALL², MARIE BENGTSSON², ALBA M. COTES P.¹

Resumen. Se identificaron y caracterizaron química y biológicamente los diferentes compuestos constituyentes de la feromona sexual de *Tecia solanivora*. Su identificación se realizó con el espectrómetro de masas, la caracterización química y biológica de la feromona mediante las técnicas de cromatografía de gases y electroantenografía, y la evaluación de diferentes mezclas y proporciones de los compuestos mediante ensayos biológicos en condiciones de túnel de viento. Con el propósito de seleccionar una mezcla de la feromona eficiente en la captura de machos de *T. solanivora* en campo, se evaluaron los compuestos activos de la feromona en tres áreas rurales correspondientes a Mosquera (Cundinamarca), Siachoque y Toca en Boyacá. La combinación de los compuestos E3-12Ac y 12Ac en la proporción (10:2) respectivamente, fue la que originó las mayores capturas con 32 machos por trampa. Por el contrario, con el compuesto E3-12Ac evaluado en forma individual, el cual constituye la feromona utilizada comercialmente, se capturaron 16 machos por trampa.

Palabras clave: Polilla guatemalteca de la papa. Trampas. Captura. Papa.

Summary. The different constituent compounds of the sex pheromone of *Tecia solanivora* were identified and characterized chemically and biologically. Identification was done with a mass spectrometer, chemical and biological characterization of the pheromone with gas chromatography and electroantennographic detection techniques, and evaluation of the different proportions and blends of the compounds through biological assays under wind tunnel conditions. In order to select the most promising pheromone blend for the efficient capture of *T. solanivora* males in the field, active pheromone compounds were evaluated in three rural areas corresponding to Mosquera (Cundinamarca), Siachoque and Toca (Boyacá). The highest male captures were obtained with the combination of the compounds E3-12Ac and 12Ac in the proportion (10:2), respectively, with 32 males per trap. However when the main compound was tested alone, which constitutes the commercial pheromone, only 16 males per trap were caught.

Key words: Guatemalan potato tuber moth. Traps. Sampling. Potato.

Introducción

Las feromonas sexuales presentan un amplio rango de aplicaciones en programas de manejo integrado de plagas, cabe mencionar su utilización en la detección de poblaciones de insectos, mediante el empleo de trampas como atrayentes, su combinación con esterilizantes o insecticidas y su utilización para producir la confusión sexual en machos e interrupción de la cópula en adultos (Pedigo 1996). Las feromonas son sustancias no tóxicas que son liberadas al aire en cantidades mínimas, debido a su alta especificidad no son adversas a insectos benéficos. Hasta el momento, nunca ha sido documentada la aparición de resistencia en insectos (Haynes y Baker 1988). Cualquier tipo de feromona sexual está constituida por varios compuestos denominados primarios y secundarios, donde grupos funcionales como aldehídos, alcoholes, acetatos, cetonas entre otros la constituyen (Dekramer y

Hemberger 1987). Estos compuestos en proporciones exactas y específicas ejercen un efecto complementario y sinérgico en la atracción sexual de los individuos de una población (Primo 1991; Arnini y Lizárraga 2000). En los últimos años, se ha logrado extraer la glándula productora de la feromona generalmente presente en hembras de diferentes especies de insectos, con el propósito de identificar su composición y realizar ensayos biológicos (Altstein *et al.* 1989).

En programas de detección y vigilancia para el monitoreo de insectos plaga, se ha reportado la importancia de evaluar y combinar más de dos compuestos de una feromona, para producir una mayor respuesta de atracción de machos en trampas en diferentes aplicaciones de las feromonas (Bäckman *et al.* 1997; Coracini *et al.* 2001; Witzgall *et al.* 2001). Hasta el momento no existen estudios profundos, que involucren

la identificación completa y la evaluación de todos los compuestos constituyentes de la feromona de *T. solanivora*. Los estudios existentes se han basado en los reportes preliminares realizados por Nesbitt *et al.* en 1985, los cuales identificaron únicamente el compuesto E(3)-dodecenyl acetato y su isomero Z3-12Ac.

Cabe destacar que *T. solanivora* es uno de los principales problemas fitosanitarios en el cultivo de la papa tanto en el país como en algunos países de Centro y Sur América (Corredor y Flórez 2003), por lo tanto es necesario aunar esfuerzos para lograr un control eficiente de la plaga. Actualmente este insecto está presente en más del 80% de las zonas productoras del país de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia, donde las larvas se alimentan exclusivamente de los tubérculos afectando tanto aquellos destinados para semilla mantenidos en

1 Autores para correspondencia: Investigadores del Laboratorio de Control Biológico del Programa de Manejo Integrado de Plagas de Corpoica. Km 14 vía Mosquera. A.A. 240142 Las Palmas, Parque Central Bavaria. Bogotá. felipebosa@vv.slu.se, acotes@corpoica.org.co

2 Investigadores del grupo de Ecología química de la Universidad Agrícola de Suecia SLU. Box 44, SE-230-53 Alnarp, Sweden. peter.witzgall@vv.slu.se

almacenamiento, como aquellos presentes en campo, provocando una disminución en los rendimientos superior al 30% (Arévalo 2003).

Por su parte, para el control de esta plaga se han realizado esfuerzos en diferentes áreas; sin embargo, no se han desarrollado productos biológicos para su control y como alternativa química sólo se cuenta con algunos insecticidas aprobados con licencia de uso expedida por el ICA tales como: Clorpirifos, Profenofos y Acefato (organofosforados), y Permetrina (Arévalo y Castro 2003). Por las características químicas de estos productos, su uso prolongado y frecuente podría generar resistencia genética de las poblaciones del insecto, si se tiene en cuenta que los productores de papa, realizan hasta doce aplicaciones de insecticidas por ciclo de cultivo para el control de esta plaga (Sánchez 1999).

Dada la complejidad de *T. solanivora*, la dificultad para su control y considerando que el seguimiento de sus poblaciones en campo constituye una herramienta importante para la toma de decisiones MIP, es fundamental contar con técnicas efectivas de seguimiento y detección oportuna de las poblaciones. En este sentido, sólo se cuenta con la feromona comercial producida por el Centro Internacional de la Papa basada en los estudios iniciales de Nesbitt *et al.* (1985). Sin embargo, en estudios realizados por Barreto y Martínez (2003), la feromona comercial presentó baja estabilidad y persistencia en condiciones de campo a través del tiempo. Esto indica la necesidad de desarrollar alternativas complementarias en la detección de machos de *T. solanivora* en campo. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fueron: identificar los compuestos de la feromona sexual de *T. solanivora*, realizar su caracterización química y biológica, y determinar la atracción y captura de machos del insecto en trampas cebadas con diferentes proporciones y combinaciones de esta feromona.

Materiales y Métodos

La investigación se desarrolló dentro de un proyecto colaborativo entre la Universidad Agrícola de Suecia y Corpoica.

Análisis químico de extractos de la feromona sexual

A partir de una cría del insecto establecida en el laboratorio de entomología de la Universidad Agrícola de Suecia y mantenida en dieta natural constituida por tubérculos, hembras vírgenes de dos días de emergidas fueron colectadas para la

obtención de las glándulas de la feromona ubicadas al final del abdomen. Para la extracción de la feromona, las glándulas fueron disectadas de las hembras y colectadas en grupos de 50 por vial. La feromona contenida fue solubilizada en un solvente orgánico (heptano al 99% de pureza) y los extractos crudos obtenidos fueron almacenados en capilares para la identificación y separación de los compuestos presentes mediante las técnicas de espectrometría de masas (Hewlett Packard 5970B, Palo Alto) y cromatografía de gases (CG: Hewlett Packard 5890, J & W Scientific Folsom) respectivamente. Una vez identificados los compuestos de la feromona, extractos de la feromona fueron inyectados en el cromatógrafo de gases en conexión con el electroanténografo (EAG: Syntech, Hilversum), obteniéndose así simultáneos registros procedentes tanto del CG como del EAG. De esta manera, los compuestos de la feromona que indujeron las respuestas más significativas en los impulsos nerviosos procedentes de las antenas de machos de dos días de edad, fueron seleccionados para ser evaluados bajo diferentes concentraciones y combinaciones en condiciones de túnel de viento.

Ensayos biológicos bajo condiciones de túnel de viento

Respuestas de la trayectoria de vuelo de machos de *T. solanivora* frente a los diferentes compuestos de la feromona sexual fueron evaluadas en un túnel de viento de 63 x 90 x 200 centímetros, de acuerdo con Witzgall *et al.* (2001). En la parte anterior del túnel de viento, una corriente de aire de 30 cm por segundo conducida previamente a través de cilindros de carbón activado, permitió la dispersión de los respectivos tratamientos de la feromona colocados dentro del túnel de viento. Al final del túnel un extractor permitió la salida del aire impregnado con la feromona hacia el exterior, a un distancia de 35 cm del extractor se liberó un macho de dos días de edad evaluándose su trayectoria de vuelo durante dos minutos, desde el punto de su liberación hasta la fuente de la feromona. Estos ensayos siempre fueron realizados 5 minutos después de iniciado el período de luz, debido a que la mayor actividad sexual y de vuelo de machos fue observada para este período en etapas previas. Para el análisis de la trayectoria de vuelo, se consideraron las siguientes etapas: actividad, vuelo inicial desde el origen, trayecto-

ria de vuelo a 50, 100 y 150 cm desde el punto de liberación de los machos, aterrizaje en la fuente emisora, cortejo e intento de cópula con la fuente de la feromona. Para estos ensayos biológicos, se utilizó una temperatura entre 20 y 22°C y una intensidad lumínica de 12 lux.

Los compuestos de la feromona evaluados fueron formulados en diferentes mezclas utilizando como solvente heptano al 99% de pureza. Se emplearon cauchos rojos de goma como material portador de las mezclas (a razón de 100 µl de cada solución por caucho). Cada repetición por tratamiento de la feromona estuvo constituida por quince machos con cuatro repeticiones por tratamiento realizadas en días diferentes (n=60). Un tratamiento constituido por hembras vírgenes que liberaban la feromona fue evaluado como control bajo las mismas condiciones metodológicas descritas anteriormente. Los resultados de la trayectoria de vuelo de machos frente a los diferentes tratamientos, fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

Los tratamientos de la feromona que originaron las respuestas de vuelo más significativas en machos, fueron posteriormente evaluados bajo condiciones de campo en diferentes zonas productoras de papa en Cundinamarca y Boyacá durante noviembre de 2003 a marzo de 2004.

Determinación en campo de la eficiencia de atracción y captura de machos

En los laboratorios de Ecología química de la Universidad Agrícola de Suecia, los compuestos sintéticos en sus diferentes combinaciones fueron dispensados en cauchos de goma de color rojo (100 ml por caucho). Una vez evaporado el solvente en cada caucho, se procedió a su almacenamiento en refrigeración hasta su uso. Para las pruebas de campo, los cauchos de goma impregnados con las diferentes combinaciones de compuestos fueron colocados en el interior de trampas tipo delta, las cuales contenían en el fondo papeles amarillos pegantes con cuadrícula para facilitar el conteo de machos capturados, en cada caso un caucho de goma con la feromona fue colocado por trampa. Se evaluaron seis tratamientos donde se varió la concentración de los compuestos sintéticos de la feromona (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos de la feromona sexual de *T. solanivora* evaluados bajo condiciones de campo en Colombia.

Compuestos (Proporciones)	Tratamientos					
	1	2	3	4	5	6
n *	10	10	10	10	10	10
E3-12Ac	10	10	10	10	10	10
Z3-12Ac		0,1			0,1	0,5
12Ac			2	10	2	10

*Número de repeticiones por tratamiento

Diseño experimental. Estos tratamientos se evaluaron en tres localidades con presencia de cultivos de papa, correspondientes a variedad parda pastusa Mosquera (Cundinamarca) y Siachoque (Boyacá) y variedad Tuquerreña en Toca (Boyacá). Como soportes para el montaje de las trampas, se utilizaron listones de madera de 120 cm de longitud por 2,5 cm de ancho. Cada trampa fue colocada a una altura de 80 cm a nivel del suelo, a lo largo de la hilera de plantas de papa y ubicadas en el sentido de la dirección del viento para permitir la adecuada dispersión de la feromona en el aire (Fig. 1). Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con seis tratamientos para cada localidad, donde la distancia entre cada trampa fue de 15 metros y de 30 m entre bloques de tratamientos. La unidad experimental fue cada trampa y la variable evaluada fue el número de machos capturados por trampa por semana. Así mismo, una vez por semana se realizó el registro de la temperatura máxima - mínima y la precipitación por localidad. Los resultados de la eficiencia de atracción y captura

de machos en trampas frente a los diferentes compuestos de la feromona, fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza y pruebas de comparación de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

Resultados y discusión

Identificación química y caracterización biológica de la feromona

Se identificaron seis compuestos mediante el espectrómetro de masas. De estos, el compuesto denominado E3-12Ac presente en mayor proporción es el principal constituyente de la feromona con un tiempo de retención en la fase estacionaria del cromatógrafo de gases de 10,16 minutos, un área de 7,1 y con 0,43 hg por ml de extracto de la feromona. Los cinco restantes son compuestos secundarios y complementarios de la actividad de la feromona (Tabla 2). Trabajos previos realizados por Nesbitt *et al.* (1985), reportaron como únicos compuestos constituyentes el E3-12Ac y su isómero el Z3-12Ac, la presente investigación permitió identificar nuevos compuestos (Tabla 2).

Teniendo en cuenta los registros simultáneos procedentes del CG y del EAG relacionados con los tiempos de retención de los compuestos y con las respuestas antenales de machos respectivamente (Tabla 2), se seleccionaron los compuestos E3-12Ac, Z3-12Ac y 12Ac por inducir las más significativas respuestas antenales en machos del insecto, compuestos que fueron posteriormente evaluados en diferentes proporciones y combinaciones en mezcla en un túnel de viento.

Ensayos biológicos bajo condiciones de túnel de viento

En el túnel de viento se determinó la respuesta y trayectoria de vuelo de machos frente a los diferentes compuestos de la feromona. Estos resultados fueron comparados con un tratamiento control correspondiente a hembras vírgenes de dos días de edad que liberaban la feromona.

Se realizaron ensayos previos de estandarización para determinar la respuesta de vuelo mínima efectiva en machos frente a diferentes rangos de concentración de los compuestos de la feromona. Así mismo, un mayor número de tratamientos de la feromona fueron evaluados, sin embargo a continuación se presentan los resultados más relevantes.

Las respuestas más significativas de machos durante toda la trayectoria de vuelo en el túnel de viento, se obtuvieron con la utilización de hembras vírgenes que liberaban la feromona, donde un 90% de los machos presentó una alta actividad representada por movimientos de alas y desplazamiento desde el punto de liberación, y un 60% de los individuos alcanzó exitosamente la fuente emisora (Tabla 3). Esto obedeció posiblemente, a que la proporción de los compuestos, su tasa de liberación en el aire y las características intrínsecas de estos compuestos *in vivo* en las glándulas de la feromona de hembras, son mantenidos constantes y biológicamente estables, a diferencia de la utilización de compuestos obtenidos por síntesis química en el laboratorio. Coracini *et al.* (2002) reportaron resultados similares en túnel de viento al utilizar como fuente emisora de la feromona hembras

**Figura 1.** Trampa pegante tipo delta conteniendo en su interior un cacho de goma impregnado con la feromona.**Tabla 2.** Compuestos constituyentes de la feromona sexual de *T. solanivora* identificados y caracterizados mediante las técnicas de espectrometría de masas, cromatografía de gases (CG) y electroantenografía (EAG).

Compuestos	Estructura corta	Tiempo de retención en el CG (minutos)	Área bajo la curva	ng/μl de extracto de feromona	Respuesta antenal de machos (CG-EAG)
n		9	9	9	9
-Dodecyl acetato ^b	12Ac	10.03±0.02	0.6	0.04	++++
-(E)-3-dodecenyl acetato ^{a,c}	E3-12Ac	10.16±0.02	7.11	0.43	+++++
-(Z)-3-dodecenyl acetato ^a	Z3-12Ac	10.16	NC	0.01	+++
-(E)-5-tetradecenyl acetato ^b	E5-14Ac	12.15±0.02	0.5	0.03	+
-(Z)-5-tetradecenyl acetato ^b	Z5-14Ac	12.15	NC	0.03	
-(E,E)-9,11-tetradecenyl acetato ^b	E9,E11-14Ac	12.31±0.02	0.21	0.01	

n = número de repeticiones^a Compuestos previamente reportados por Nesbitt *et al.* en 1985,^b Compuestos identificados y caracterizados por Bosa *et al.* (2005)^c Principal compuesto constituyente de la feromona sexual de *T. solanivora* CG: Cromatógrafo de gases; EAG: Electroantenógrafo NC: No calculado +++++: 100% de respuesta del impulso nervioso en antenas de machos; +++++: 80%; +++: 60%; +: 20%

Tabla 3. Porcentaje de respuesta de atracción en machos de *T. solanivora* frente a los compuestos de la feromona evaluados bajo condiciones de túnel de viento.

Tratamientos (proporciones)	1	2	3	4	5	6	Hembras vírgenes
(E)-3-dodecenyl acetato	1	1	1	1	1	1	
(Z)-3-dodecenyl acetato	-	0,01	0,05	-	-	0,05	
Dodecyl acetato	-	-	-	0,05	1	1	
n	60	60	60	60	60	60	60
-Trayectoria de vuelo en el túnel de viento	%±DS	%±DS	%±DS	%±DS	%±DS	%±DS	%±DS
Actividad	63±2 b	75±1 ab	88±1 a	52±3 b	72±2 b	48±2 b	90±2 a
Vuelo inicial desde el punto de liberación	62±1 b	75±1 ab	88±1 a	47±3 b	66±2 b	47±2 b	87±3 a
Hasta 50cm	27±2 b	68±1 b	78±1 ab	27±2 b	50±2 b	28±2 b	80±3 a
hasta 100cm	18±2 c	52±2 b	57±1 b	21±2 bc	38±2 b	18±2 c	77±3 a
hasta 150cm	18±2 c	42±2 b	35±2 b	20±2 bc	35±2 b	17±2 c	70±2 a
Aterrizaje en la fuente emisora de la feromona	10±1 c	28±1 b	28±2 b	9±1 c	22±2 bc	10±2 c	60±2 a
Cortejo e intento de cópula	10±1 c	28±1 b	28±2 b	9±1 c	20±2 bc	7±1 c	60±2 a

n = número de individuos por tratamiento. DS: desviación estándar. Porcentajes entre tratamientos que comparten la misma letra dentro de una misma etapa de la trayectoria de vuelo no presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey con un α de 0,05

vírgenes de *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae), las cuales originaron las mayores respuestas de vuelo en machos de este insecto, donde un 72% de los machos evaluados alcanzaron a las hembras emisoras.

Las mayores respuestas obtenidas utilizando hembras de *T. solanivora* fueron seguidas por las originadas con la combinación del E3-12Ac más su isomero Z3-12Ac en las proporciones de (1:0,01) y (1:0,05) respectivamente, donde un 28% de los individuos alcanzó la fuente emisora de la feromona para ambas proporciones (Tabla 3). En este caso, la variación en la proporción del isomero de 0,01 a 0,05 no originó una diferencia significativa en la respuesta de vuelo en machos.

Respuestas de vuelo intermedias se obtuvieron con la combinación del E3-12Ac y el compuesto secundario 12Ac en la proporción (1:1) respectivamente, donde un 22% de los machos alcanzaron esta fuente emisora; de otra parte, cuando se evaluaron estos mismos compuestos en la proporción de (1:0,05) tan solo un 9% de los machos alcanzó esta fuente emisora. Aunque estos resultados no fueron significativamente diferentes entre sí, una mayor respuesta de machos se originó cuando se evaluaron estos compuestos en la proporción (1:1), debido posiblemente a la mayor concentración del 12Ac utilizada en esta combinación (Tabla 3, tratamientos 4 y 5).

Menores respuestas de vuelo en machos se consiguieron, cuando se evaluó el compuesto E3-12Ac en forma individual, donde un 10% de los machos alcanzaron la fuente emisora. Similares resultados se obtuvieron con la combinación de los tres compuestos de la feromona en las proporciones de (1:0,05:1), donde tan solo un 10% de los machos alcanzaron esta

fueron evaluados bajo condiciones de túnel de viento. En este caso, las bajas respuestas de vuelo posiblemente se debieron a un efecto antagonístico originado por alguno de los compuestos o por los tres compuestos en combinación, o posiblemente debido a que las concentraciones utilizadas de estos compuestos, no fueron adecuadas para inducir una respuesta de vuelo positiva en machos, o que la combinación de estos compuestos originó un efecto disuasivo en la respuesta de vuelo en machos. De acuerdo con estos resultados obtenidos *in situ*, se procedió a la evaluación de estos compuestos en tres áreas experimentales bajo condiciones de campo en Colombia.

Determinación en campo de la eficiencia de atracción y captura de machos

Para el área ubicada en Siachoque (Boyacá), se observó que las capturas más significativas de machos se obtuvieron por la combinación de los compuestos E3-12Ac y su isomero Z3-12Ac en la pro-

porción (10:0,1), seguida por la combinación del E3-12Ac y 12Ac en la proporción (10:2), obteniéndose 26 y 24 machos capturados por trampa respectivamente. Una actividad intermedia se observó con la combinación del principal compuesto y el 12Ac (proporción 10:10) con 14 machos. Por otra parte, con los tratamientos (1, 5 y 6) se obtuvieron capturas significativamente menores a las anteriores (Fig. 2).

Se obtuvieron significancias menores cuando se evaluó el principal compuesto de la feromona E3-12Ac en forma individual con 11 machos capturados por trampa, y cuando se combinaron los compuestos E3-12Ac, Z3-12Ac y 12Ac en las proporciones de (10:0,1:2) y (10:0,5:10) respectivamente, con 3 y 10 machos capturados por trampa respectivamente. Esto se debió posiblemente a un efecto sinérgico originado por el incremento en la concentración del 12Ac de 2 a 10 en esta mezcla de la feromona (Fig. 2).

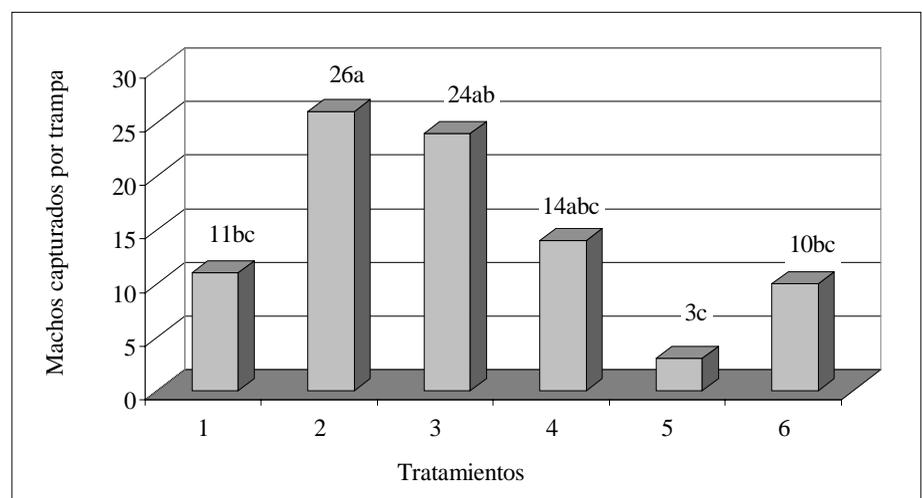


Figura 2. Machos capturados en trampas cebadas con la feromona de *T. solanivora* en Siachoque (Boyacá), (ver Tabla 1).

En general durante todo el período de evaluación, las precipitaciones no fueron altas, aunque se observó una relación inversamente proporcional entre la precipitación y el número de capturas de machos.

Por otra parte, en el área experimental ubicada en Toca (Boyacá), se observó una tendencia similar a la obtenida en Siachoque, donde las mayores capturas (23 machos por trampa) fueron obtenidas por la combinación de los compuestos E3-12Ac y 12Ac en la proporción (10:2) respectivamente (Fig. 3). Entre tanto, cuando se evaluó el compuesto E3-12Ac en forma individual o combinado con su isomero Z3-12Ac, se registraron tan sólo 14 machos capturados por trampa, aunque estos resultados no fueron significativamente diferentes con los anteriores ni con los obtenidos en los demás tratamientos en los que se encontraron rangos de capturas entre 9 y 15 machos por trampa, exceptuando únicamente por las significativamente menores capturas obtenidas con el tratamiento seis con dos machos por trampa (Fig. 3).

A pesar de registrarse temperaturas entre 18 y 23°C, así como bajas precipitaciones entre 0 y 5 milímetros, propicias para el incremento de las poblaciones del insecto en campo, no se observaron tales incrementos representados en mayores capturas de machos en las trampas. Este comportamiento, pudo deberse a un deterioro de las mezclas de la feromona en los cauchos portadores debido a temperaturas y/o radiación solar, lo cual pudo afectar negativamente la persistencia y eficiencia de estas feromonas en el campo.

Al comparar los resultados anteriores con los obtenidos en el área experimental de Tibaitatá (Mosquera, Cundinamarca), se observó una tendencia similar, encontrándose las mayores capturas con la combinación de los compuestos E3-12Ac y 12Ac en las proporciones de (10:2) y (10:10) con 44 y 50 machos capturados por trampa respectivamente. Sin embargo, estas capturas no presentaron diferencias estadísticas con los demás tratamientos (Fig. 4).

Con la mezcla de los tres compuestos de la feromona en la proporción (10:0,1:2) se capturaron 20 machos por trampa, a diferencia de 13 machos cuando se evaluó el principal compuesto E3-12Ac en forma individual, o combinado con su isomero Z3-12Ac donde se capturaron 10 machos por trampa (Fig. 4). Autores como Coracini *et al.* (2001) al comparar las capturas de machos del minador del manzano *Bonagota cranaodes* Meyrick

(Lepidoptera: Tortricidae), encontraron menores capturas utilizando en forma individual el principal compuesto de la feromona (E,Z)-3,5-dodecadienyl acetato (E3,Z5-12Ac), a diferencia de las mayores capturas cuando se combinaron cuatro de los compuestos constituyentes de esta feromona.

De otra parte, al compararse las capturas originadas por los tratamientos 5 y 6, cuando se incrementó la proporción del compuesto 12Ac de 2 a 10, se produjo posiblemente un efecto negativo y antagónico en las capturas, reduciéndose casi a la mitad las capturas de machos (Fig. 4, Tratamiento 6). Efectos antagónicos similares han sido reportados por otros autores como Witzgall *et al.* (2001), quienes encontraron efectos negativos en las respuestas de atracción de machos de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), cuando se evaluaron mezclas de

compuestos que contenían mayores concentraciones del E,Z isómero del principal compuesto de esta feromona denominada "codlemone". Resultados similares, se obtuvieron al evaluar trampas cebadas con una mezcla de tres compuestos de la feromona de la mosca de la arveja *Contarinia pisi* (Diptera: Cecidomyiidae), donde se capturaron menos machos del insecto en comparación a cuando se combinaron en mezcla únicamente dos compuestos de esta feromona en proporciones específicas (Hillbur *et al.* 2000). Estos reportes, indican que tanto la combinación de ciertos compuestos de una feromona, como la utilización de proporciones específicas de éstos, juegan un papel definitivo en la comunicación y respuesta sexual de una especie dada, lo cual requiere de estudios continuos y complementarios para el conocimiento adecuado de la biología y comportamiento de una especie.

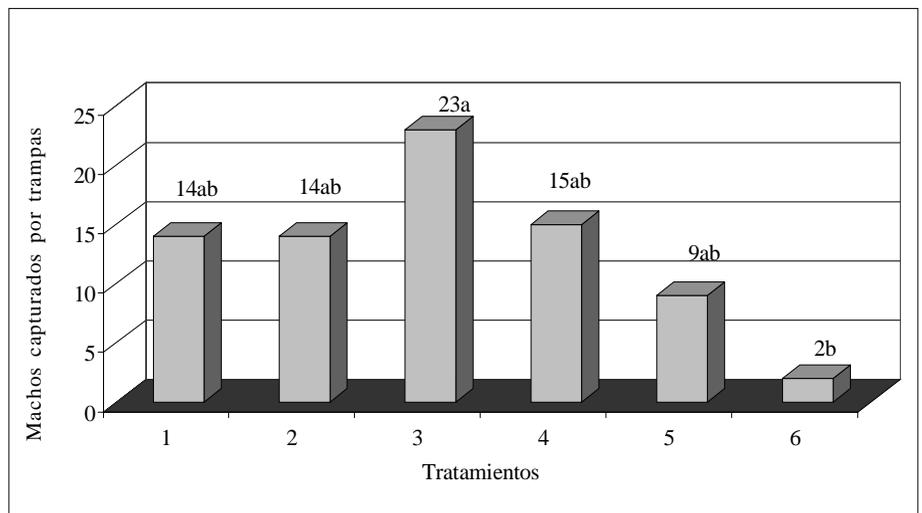


Figura 3. Machos capturados en trampas cebadas con la feromona de *T. solanivora* en Toca (Boyacá).

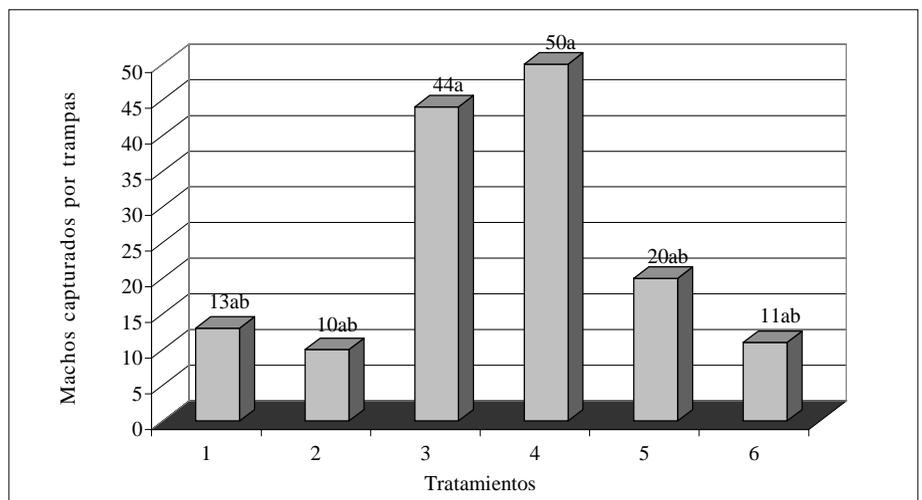


Figura 4. Machos capturados en trampas cebadas con la feromona de *T. solanivora* en Tibaitatá (Mosquera).

Al comparar las capturas de las tres localidades, se observó un comportamiento muy similar en los tratamientos. Las mayores capturas de machos se observaron en Mosquera, seguidas por las de Siachoque y las menores en Toca. Entre tanto, se observó una tendencia ligeramente mayor en las capturas de machos con la combinación del compuesto E3-12Ac y 12Ac en la proporción (10:2) respectivamente (Tratamiento 3). Las menores capturas fueron obtenidas con la combinación de los tres compuestos de la feromona (E3-12Ac, Z3-12Ac y 12Ac) en la proporción (10:0,5:10) respectivamente; sin embargo, no se puede concluir que la adición de más de dos compuestos en combinación, pueda originar un efecto negativo en las capturas, sino por el contrario, se debe continuar con la evaluación y optimización de estas proporciones de los compuestos de la feromona mediante pruebas complementarias en campo. La presente investigación indica la importancia de evaluar diferentes proporciones y combinaciones de los compuestos constituyentes de la feromona sexual, con el propósito de seleccionar un método de detección y vigilancia oportuna de machos de *T. solanivora* en campo que sea eficiente y óptimo dentro de un manejo integrado de la plaga.

Conclusiones y Recomendaciones

- Se encontraron seis compuestos constituyentes de la feromona sexual de *T. solanivora*, de los cuales tres produjeron las más significativas respuestas tanto en antenas de machos como en la trayectoria de vuelo de machos en condiciones de túnel de viento.
- En condiciones de campo, se seleccionó el tratamiento constituido por los compuestos E3-12Ac y 12Ac en la proporción 10:2 por producir las mayores capturas de machos de *T. solanivora* en trampas.
- Se recomienda evaluar un mayor número de mezclas de compuestos correspondientes a la feromona de *T. solanivora* en diferentes proporciones. Además de evaluar estos compuestos activos de la feromona en otras áreas productoras de papa del país.
- Se recomienda optimizar la formulación y el material portador de los compuestos de la feromona para mejorar su persistencia en campo.

Agradecimientos

Esta investigación contó con el apoyo financiero del Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural y de Corpoica durante su desarrollo en Colombia, y de la agencia Swedish Foundation for International Research and Higher Education (STINT) en Suecia. Los autores agradecen el invaluable apoyo científico del doctor Aristóbulo López-Ávila, así como el apoyo técnico del auxiliar de laboratorio Jesús Gómez y de los agricultores de las áreas experimentales empleadas.

Literatura citada

- ALTSTEIN, M., HAREL, M.; DUNKEBLUM, E. 1989. Effect of a neuroendocrine factor on sex pheromone biosynthesis in the tomato looper, *Chryso deixis chalcifex* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry*. 19: 645-649.
- ARÉVALO, A. 2003. Análisis de la problemática de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae) en Colombia. Memorias del II taller nacional sobre *T. solanivora* "Presente y futuro de la investigación sobre *Tecia solanivora*". CEVIPAPA. p. 129-133. Bogotá.
- ARÉVALO, A.; CASTRO, R. 2003. Evaluación post-registro de los insecticidas con licencia de uso para controlar la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae) en Colombia. Memorias del II taller nacional sobre *T. solanivora* "Presente y futuro de la investigación sobre *Tecia solanivora*". p. 86-89. CEVIPAPA. Bogotá.
- ARNINI, I.; LIZÁRRAGA, A. 2000. Control Etológico: Uso de feromonas, trampas de colores y luz para el control de plagas en la agricultura sostenible. RAAA. 197 p.
- BÄCKMAN, A.; BENGTTSSON, M.; WITZGALL, P. 1997. Pheromone release by individual females of codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Chemical Ecology*. 23 (3): 807-815.
- BARRETO, N.; MARTÍNEZ, L. 2003. Evaluación de la vida útil de la feromona sexual de *T. solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en condiciones de campo. Memorias del II Taller nacional sobre *T. solanivora*. p. 83. Cevipapa. Bogotá.
- CORACINI, M.; BENGTTSSON, M.; RECKZIEGEL, A.; LÖFQVIST, J.; FRANCKE, W.; VILELA, E.; EIRAS, A.; KOVALESKI, A.; WITZGALL, P. 2001. Identification of a four-component sex pheromone blend in *Bonagota cranaodes* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economical Entomology* 94 (4): 911-914.
- CORACINI, M.; BENGTTSSON, M.; RECKZIEGEL, A.; ALVARO, E.; VILELA, E.; ANDERSON, P.; FRANCKE, W.; LÖFQVIST, J.; WITZGALL, P. 2002. Behavioural effects of minor sex pheromone components in Brazilian apple leafroller *Bonagota cranaodes* (Lepidoptera: Tortricidae). p. 1-13. En: *Semiochemicals claim territory - Sex pheromones and plant volatiles for control of codling moth and Brazilian apple leafroller*. Coracini, M (ed.). 2002. Doctoral thesis in Chemical ecology, Department of crop science. Swedish University of Agricultural Sciences. Agraria 366. Alnarp, Sweden. ISSN: 1401-6249, ISBN: 91-576-6193-6. 28 p.
- CORREDOR, D.; FLÓREZ, E. 2003. Estudios básicos de la biología y comportamiento de la polilla de la papa en un área piloto en el municipio de Villapinzón. Memorias del II Taller nacional sobre *T. solanivora*. p. 23-31. Cevipapa. Bogotá.
- DEKRAMER, J.; HEMBERGER, J. 1987. Pheromone Biochemistry. p. 433-472. G.D. Preswich (Ed.). Academic Press Inc. New York. USA. 563 p.
- HAYNES, K.; BAKER, T. 1988. Potential for evolution of resistance to pheromones. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1547-1560.
- HILLBUR, Y.; EL-SAYED, A.; BENGTTSSON, M.; LÖFQVIST, J.; BIDDLE, A.; PLASS, E.; FRANCKE, W. 2000. Laboratory and field study of the attraction of male pea midges *Contarinia pisi* to synthetic sex pheromone components. *Journal of Chemical Ecology*. 26 (8): 1941-1952.
- NESBITT, B.; BEEVOR, P.; CORK, A.; HALL, D.; MURILLO, R.; LEAL, H. 1985. Identification of components of the female sex pheromone of the potato tuber moth, *Scrobipalopsis solanivora*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 38: 81-85.
- PEDIGO, L. 1996. Management by modifying insect development and behavior. p. 461-478. Chapter 13. En: *Entomology and Pest Management*. Academic Press. New York. USA. 987 p.
- PRIMO, E. 1991. Ecología química: Nuevos métodos de lucha contra insectos. p. 75-149. Editorial Mundi Prensa. Madrid. 354 p.
- SÁNCHEZ, M. 1999. Efecto de la trampa de feromona sexual en el monitoreo de poblaciones de la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora* Povolny. Trabajo de grado de Biología. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá. 143 p.
- WITZGALL, P.; BENGTTSSON, M.; RAUSCHER, S.; LIBLIKAS, I.; BÄCKMAN, A.; CORACINI, M.; ANDERSON, P.; LÖFQVIST, J. 2001. Identification of further sex pheromone synergists in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 101: 131-141.

Evaluación de la técnica de la interrupción de la cópula de *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)

Evaluation of the mating disruption technique on *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)

FELIPE BOSA¹, PETER WITZGALL², ALBA M. COTES¹, TAKEHIKO FUKUMOTO³,
NANCY BARRETO¹

Resumen. Una de las aplicaciones más promisorias de las feromonas es su utilización para controlar insectos mediante la interrupción de la cópula, que consiste en crear múltiples fuentes emisoras de una feromona en altas concentraciones para producir confusión sexual en machos, enmascaramiento de la feromona liberada por hembras e interrupción del apareamiento. Con el propósito de evaluar esta técnica para el control de *Tecia solanivora*, dispensadores formulados con una mezcla de la feromona fueron colocados en campo y en almacenamientos de papa. Al hacer seguimiento de las poblaciones del insecto, se registraron 39 machos capturados en campo para el área tratada con dispensadores, con respecto a 1593 machos en el área control. En almacenamiento 39% de incidencia de daño en tubérculos y una severidad del 100% fueron observadas en los cuartos no tratados, en comparación con un 9% de incidencia y menores severidades en los cuartos tratados con dispensadores.

Palabras clave: Feromonas. Capturas. Confusión de machos. Papa.

Summary. One of the promising applications of pheromones is their use to control insects through mating disruption, in which multiple pheromone sources are created at high concentrations to produce male confusion, masking female pheromone detection and disrupting mating. In order to evaluate this technique for *Tecia solanivora* control, dispensers formulated with a pheromone blend were deployed in the field and in potato storage conditions. When adult male populations were monitored under field conditions, 39 males were caught in the area treated with pheromone dispensers, compared to 1593 males in the untreated area. Under storage conditions 39% of damage incidence and 100% of severity in tubers were observed in untreated storage rooms, compared to 9% of incidence and lower severity in rooms treated with pheromone dispensers.

Key words: Pheromones. Sampling. Male confusion. Potato.

Introducción

Uno de los principales problemas fitosanitarios en el cultivo de la papa en algunos países de Centro y Sur América es la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora* Povolny (Corredor y Flórez 2003a). En Colombia este insecto está presente en más del 80% de las zonas productoras de papa de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia, provocando pérdidas significativas en la cadena de producción de papa con una disminución en los rendimientos anuales superiores al 30%. Por sus hábitos monófagos las larvas se alimentan exclusivamente de los tubérculos, afectando tanto los destinados para semilla en condiciones de almacenamiento, como aquellos presentes en campo (Arévalo 2003). Se reporta su distribución desde los 2000 msnm hasta áreas de páramo que superan los 3000 metros de altitud (Herrera 1997).

Varios estudios se han realizado sobre la biología de este insecto, es así como Suárez *et al.* (2003) determinaron que desde la formación de tubérculos en campo, éstos pueden ser susceptibles al ataque por larvas de la polilla, incrementándose el daño durante el llenado de tubérculos. Estudios realizados por Torres (1989), demostraron en campo que los adultos pueden congregarse en los bordes de los cultivos, escondidos en el follaje de las malezas y arbustos, y al atardecer copulan y ovipositan sobre los tubérculos expuestos en el terreno. Así mismo, se han llevado a cabo varios estudios sobre detección y vigilancia de poblaciones de machos en campo utilizando la feromona comercial en trampas (Galindo y Español 2001; Corredor y Flórez 2003a, 2003b; Martínez y Barreto 2003, Barreto *et al.* 2003).

En relación con el control de esta plaga, se han realizado esfuerzos en diferentes

áreas, es así como Corpoica desarrolló un bioplaguicida a base de un virus de la granulosis aislado de *Phthorimaea operculella* para su utilización en condiciones de almacenamiento; este producto que presenta una eficacia superior al 90%, cuenta con registro de producción y se elabora semicomercialmente. Para el manejo de *T. solanivora* en condiciones de campo, no se han desarrollado productos biológicos y como alternativa química sólo se cuenta con algunos insecticidas aprobados por el ICA como: Clorpirifos, Profenofos y Acefato (organofosforados), y Permetrina (Arévalo y Castro 2003). Sin embargo, por sus características químicas y debido al uso prolongado y frecuente, estos insecticidas podrían representar problemas de resistencia genética en las poblaciones del insecto, teniendo en cuenta que los productores de papa realizan hasta doce aplicaciones de insecticidas por ciclo de

1 Autores para correspondencia: Investigadores del Programa de Manejo Integrado de Plagas Corpoica. Km 14 vía Mosquera. A.A. 240142 Las Palmas, Parque Central Bavaria. Bogotá. felipebosa@vv.slu.se, acotes@corpoica.org.co, nbarreto@corpoica.org.co

2 Profesor e investigador del grupo de ecología química de la Universidad Agrícola de Suecia SLU. Box 44, SE-230-53, Sweden. peter.witzgall@vv.slu.se

3 Shin-Etsu Chemical Co., Nakakubiki-gun, Niigata 942-8601, Japan. takehiko.fukumoto@vv.slu.se

cultivo para el control de polilla guatemalteca (Sánchez 1999).

En vista de la actual problemática que afecta la producción de papa y la dificultad para el control de este insecto en campo, es fundamental explorar y evaluar alternativas complementarias, ambientalmente compatibles con el entorno y diferentes de la opción química. En este caso, el control etológico de la plaga mediante el uso de feromonas podría representar una estrategia promisorio para ser incorporada al sistema de producción de papa. En general, las feromonas sexuales de insectos son sustancias activas, altamente específicas si se considera que producen una respuesta en el comportamiento de individuos de una misma especie, su utilización no presenta efectos adversos contra insectos benéficos y no han sido relacionadas con la aparición de resistencia en insectos (Haynes y Baker 1988).

Una feromona está constituida por compuestos primarios presentes en mayor proporción y por compuestos secundarios como análogos, isómeros funcionales, geométricos y/o posicionales (cis y trans) (Dekramer y Hemberger 1987; Arnini y Lizárraga 2000; Raina y Menn 1987). En este sentido, el comportamiento sexual de los individuos de una especie se debe al efecto combinado y sinérgico de varios compuestos de la feromona presentes en proporciones exactas y constantes, los cuales son liberados al aire por las hembras emisoras de la misma (Primo 1991).

Las feromonas sexuales presentan varias aplicaciones en programas de manejo integrado de plagas (MIP), se ha reportado su utilización en la detección de poblaciones de insectos mediante el uso de trampas, su combinación con esterilizantes o insecticidas y su empleo para producir la confusión sexual en machos y la disminución de la cópula (Pedigo 1996). Esta última aplicación es conocida como la técnica de interrupción de la cópula, la cual consiste en introducir en el ambiente múltiples fuentes emisoras de una feromona en altas concentraciones, que puede ser liberada mediante el empleo de dispensadores colocados en campo o a través de la aplicación de una feromona por aspersión, esto con el propósito de saturar el ambiente y mantener constante una alta concentración de feromona en el campo. De esta manera, se genera confusión sexual en los machos blanco, enmascarándose la feromona real liberada por las hembras en el área tratada, con la consecuente

interrupción de la cópula y la disminución gradual de las poblaciones posteriores (Ogawa 1997).

Esta técnica ha sido evaluada exitosamente en campo, cabe destacar los estudios realizados sobre la polilla del manzano *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) por Bäckman (1999) y Witzgall *et al.* (1999); en el barrenador de la hoja del manzano *Bonagota cranaodes* Meyrick 1986 (Lepidoptera: Tortricidae) por Coracini *et al.* (2002) y en la polilla de guisantes *Cydia nigricana* Fabricius 1794 por Witzgall *et al.* (1996a) (Lepidoptera: Tortricidae), entre otros. Considerando que en estudios previos tendientes a la caracterización de la feromona sexual de *T. solanivora*, se encontraron mezclas altamente atractivas para este insecto (Bosa *et al.* 2005), el objetivo del presente estudio fue evaluar y determinar la eficacia de la técnica de la interrupción de la cópula en adultos de *T. solanivora* mediante pruebas experimentales de campo y almacenamiento.

Materiales y Métodos

Evaluación en condiciones de campo

En razón a estudios previos sobre caracterización de la feromona de *T. solanivora* realizados por Bosa *et al.* (2005), para las pruebas de interrupción de la cópula se utilizó una mezcla de la feromona que contenía los compuestos activos (E)-3-dodecenil acetato, (Z)-3-dodecenil acetato y dodecil acetato en la proporción de 100:56:100 formulada y dispensada por la empresa japonesa Shin-Etsu en tubos de polietileno de 20 centímetros de largo (70 miligramos por dispensador). Estos dispensadores que liberan constantemente la feromona con un 99% de pureza, fueron evaluados en condiciones de campo y de almacenamiento de papa en Colombia.

Las pruebas de campo se llevaron a cabo durante el primer semestre de 2004 en el municipio de Mosquera (Centro de Investigación Corpoica-Tibaitatá) 4°41'40" norte y 74°12'08" este, con una altitud de 2543 msnm. Para el montaje de los experimentos, se utilizó un área de 2,5 hectáreas cultivada con papa (*Solanum tuberosum* Gaspard Bauhin 1591) variedad pastusa en estado de floración. En esta área cada 5 metros a modo de cuadrícula se colocó un dispensador formulado con la feromona de *T. solanivora*. Para cada dispensador, se utilizó como soporte un palo de madera de 80 cm de largo x 2,5 cm de diámetro, de esta manera los dispen-

sadores fueron ubicados a la altura de las plantas de papa y a lo largo de los surcos, para un total de 1000 dispensadores cebados con la feromona. Por otra parte, un área sembrada con papa de igual extensión ubicada a un kilómetro de distancia de la anterior, fue utilizada como control, por lo tanto no se trató con dispensadores de feromona.

En ambas áreas experimentales cultivadas con papa en el mismo estado de floración, se colocaron trampas pegantes tipo delta para la detección de machos de la plaga. Estas trampas contenían el principal compuesto de la feromona (E)-3-dodecenil acetato (E3-12Ac). Para ello, seis trampas que contenían una concentración de 20 mg de feromona por caucho y seis trampas que contenían 100 mg por caucho, fueron colocadas en bloques al azar tanto hacia el centro como en el perímetro de cada área experimental. La distancia entre bloques de trampas por concentración fue de 50 metros. Dos veces por semana se registraron el número de machos capturados por trampa, así como las condiciones ambientales de la zona. Las lecturas se iniciaron tres meses antes de la cosecha, los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

Evaluación en condiciones de almacenamiento

Con el propósito de evaluar la eficacia de la interrupción de la cópula en condiciones de almacenamiento de semilla de papa, se llevaron a cabo ensayos biológicos en el municipio de Siachoque (Boyacá), vereda Tocavita (ubicación geográfica 5°28'57,6" latitud norte y 73°15'59,6" longitud este, altitud 2596 msnm). En este lugar se almacenó semilla de papa variedad diacol-capiro en seis cuartos, cada uno de 4 x 5 m aproximadamente. En cada cuarto 124 kilogramos de papa fueron almacenados a granel en un solo foco. Cuatro de estos cuartos fueron tratados con dispensadores de la feromona, a razón de cinco dispensadores por cuarto, colocados en soportes de madera de 2 cm de diámetro, a 30 cm sobre el nivel del suelo y a una distancia de 2,5 m cada uno; estos dispensadores fueron colocados una semana antes de la liberación de los adultos por cuarto, con el propósito de permitir la saturación completa del aire de los cuartos con la feromona sexual.

Los dos cuartos restantes fueron utilizados como tratamientos control sin colo-

car dispensadores. Una semana después, 30 hembras y 30 machos vírgenes de *T. solanivora* de uno a dos días de edad, mantenidos separadamente en frascos de acuerdo con su sexo, fueron liberados en cada uno de los cuartos. A partir de este momento se realizaron cuatro liberaciones de adultos cada 15 días. Transcurridos 90 días de almacenamiento de los tubérculos semilla se realizó la evaluación de incidencia y severidad del daño provocado por *T. solanivora*. Para esta evaluación se recolectó una muestra al azar de 36 kg de tubérculos por cada cuarto, tomándose 12 kg de la parte superior, 12 kg de la parte media y 12 kg de la parte inferior de los tubérculos apilados por cuarto. La severidad por cada tubérculo fue estimada de acuerdo con la escala expresada en la Tabla 1. Los resultados de incidencia en tubérculos, fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza.

Tabla 1. Niveles de severidad observada por tubérculo almacenado.

Niveles	Cuadrantes por tubérculo	Porcentaje del daño
1	1/4	25%
2	2/4	50%
3	3/4	75%
4	4/4	100%

Resultados y discusión

Evaluación de la interrupción de la cópula en campo

En el área de papa no tratada con dispensadores se registraron las mayores capturas de machos de *T. solanivora* con 542 y 1017 machos capturados durante los meses de enero y febrero respectivamente. En contraste en el área tratada las capturas fueron significativamente menores con 2 y 39 machos para éstos meses respectivamente (Fig. 1).

Las bajas capturas obtenidas en las trampas del área tratada, podrían explicarse por el efecto de la interrupción de la comunicación sexual en machos ocasionado por la utilización de los dispensadores emisores de altas concentraciones de la feromona. Resultados similares de interrupción de la cópula fueron reportados por Schroeder *et al.* (2000), quienes encontraron diferencias significativas en las capturas de machos de *Plutella xylostella* (L) (Lepidoptera: Pyralidae), siendo éstas menores en las áreas tratadas y mayores en áreas no tratadas con dispensadores.

Durante el mes de febrero se incrementaron las capturas de machos tanto en el área tratada como aquella no tratada con dispensadores (Fig. 1). Esto podría explicarse por posiblemente se debió a que durante este mes se registraron las mayores temperaturas entre 20 y 24°C,

así como las menores precipitaciones de 0 a 2 mm, lo cual posiblemente favoreció el incremento o la migración de las poblaciones de machos hacia estas áreas en ausencia de factores abióticos de control. Este incremento en las capturas de machos en trampas durante el mes de febrero, también pudo deberse al estado fenológico de la papa presente en ese momento, el cual coincidió con la época de maduración y cosecha de los tubérculos producidos en el campo, produciéndose una mayor liberación de volátiles de papa en el aire originando posiblemente una mayor migración de la plaga hacia estas áreas.

Por otra parte, al realizarse el análisis de capturas según la distribución de las trampas en las áreas, las mayores capturas se obtuvieron con las trampas ubicadas en los bordes con 26 y 957 machos para las áreas tratada y no tratada respectivamente, siendo estos resultados significativamente diferentes entre sí (Fig. 2). A su vez, las menores capturas se registraron en las trampas ubicadas en el centro con 13 y 636 machos para el área tratada y no tratada respectivamente, siendo éstas significativamente diferentes entre sí (Fig. 2). Estos resultados posiblemente indican, que las poblaciones de machos ingresaron por los bordes provenientes de los residuos de cosechas de papa circundantes y posiblemente atraídos por los volátiles (kairomonas) emitidos por las plantas de papa de las áreas de experimentación. Se realizaron observaciones del comportamiento sexual de machos frente a los dispensadores presentes en el área de papa tratada, no evidenciándose ningún tipo de actividad sexual como vuelo o intento de cópula con estos dispensadores, debido posiblemente a la inhibición de la comunicación en machos y a un efecto de repelencia causado por las altas concentraciones de la feromona en los dispensadores. Sin embargo, el comportamiento sexual de machos puede variar de una especie a otra, autores como Witzgall *et al.* (1996b) reportaron respuestas de vuelo de machos de *C. pomonella* (L) atraídos por dispensadores colocados en campo, que contenían la feromona codlemone (E8, E10-12OH).

Al analizarse las capturas de machos por concentración de la feromona, las mayores capturas con 1184 machos fueron obtenidas utilizándose la concentración de 100 mg del compuesto E3-12Ac por caucho, a diferencia de 409 machos capturados con la concentración de 20 mg de la feromona/caucho para el área no

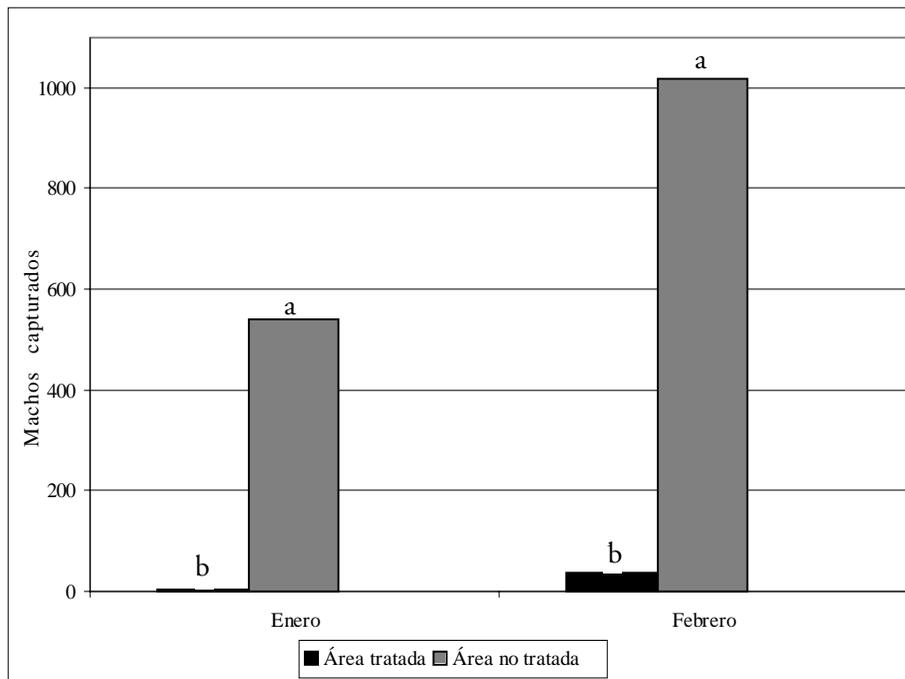


Figura 1. Machos de *T. solanivora* capturados en campo en trampas cebadas con la feromona sexual. Columnas con la misma letra no presentaron diferencias significativas entre sí, según prueba de tukey ($P < 0,05$).

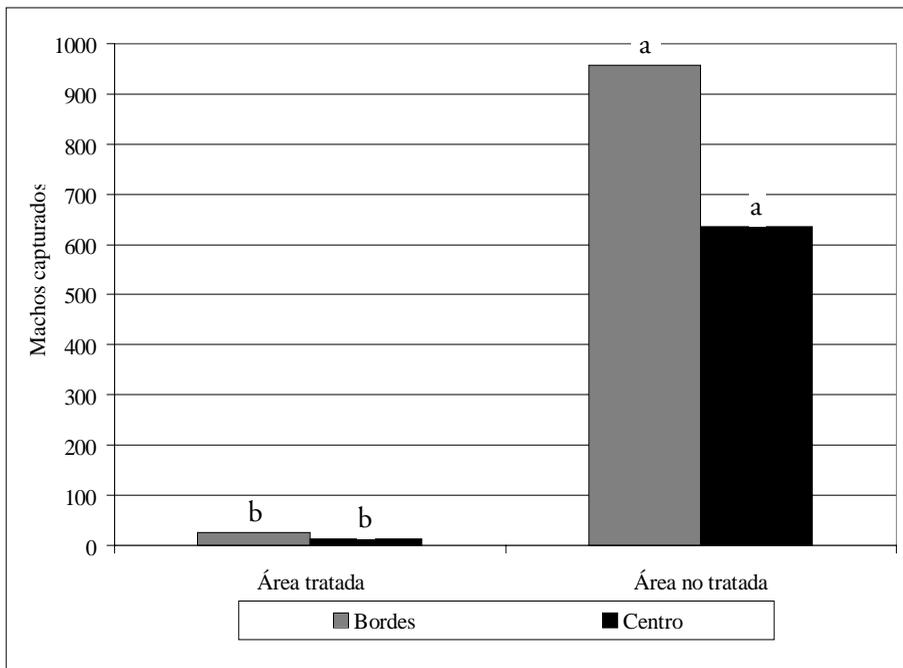


Figura 2. Machos de *T. solanivora* capturados en campo en trampas con la feromona sexual. Columnas con la misma letra no presentaron diferencias significativas entre sí según prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0,05$).

tratada respectivamente (Tabla 2). Para el área tratada con los dispensadores, aún utilizándose la concentración de 100 mg de la feromona por trampa, no se observaron capturas de machos, indicando que la atmósfera de esta área estuvo saturada con las altas concentraciones de la feromona liberada por los dispensadores y corroborándose por la ausencia de capturas en las trampas de muestreo.

Se ha demostrado que la densidad ideal de dispensadores colocados por hectárea, depende principalmente de la concentración de la feromona presente en éstos, en tal caso estudios realizados por Bäckman en (1997), utilizando una concentración por dispensador de 250 miligramos de la feromona "codlemone" para el control de *C. pomonella* (L) en manzanos, recomendaron colocar 400 dispensadores/ha, sin embargo cuando se utilizaron 90 mg por dispensador la densidad recomendada fue de 1000 dispensadores/ha. En el presente trabajo, se utilizó una concentración

Tabla 2. Capturas de machos de *T. solanivora* en trampas cebadas con el compuesto de la feromona E3-12Ac en dos concentraciones. Prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Trampas con la feromona E3-12Ac (µg/caucho/trampa)	Área tratada	Área no tratada
20	13 c	409 b
100	26 c	1184 a

por dispensador de 70 mg de la feromona de *T. solanivora* con una densidad de 400 dispensadores/Ha, la cual demostró ser suficiente para producir la confusión sexual en machos en el área tratada. Sin embargo, para futuros estudios se recomienda realizar la evaluación del daño en tubérculos cosechados, con el fin de determinar si esta densidad de dispensadores empleada, es suficiente para disminuir el daño en tubérculos. También se ha demostrado, que la utilización continua de feromonas para la interrupción de la cópula reduce el daño en los cultivos tratados, es el caso de los estudios realizados por Downhan *et al.* (2001) para el control de *Cylas puncticollis* Boheman y *C. brunneus* Fabricius (Coleoptera: Apionidae), donde se observaron menores porcentajes de infestación en la producción de remolacha en las áreas tratadas con dispensadores de las feromonas de estos insectos en comparación con un área control, aunque los rendimientos a cosecha fueron similares en ambas áreas.

En el presente estudio también se observaron capturas de machos de *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae) la polilla común de la papa, en trampas cebadas con la feromona de *T. solanivora*, capturándose un total de 116 y 135 machos de *P. operculella* en las áreas tratada y no tratada respectivamente. Sin embargo, estos valores no fueron

significativamente diferentes entre sí, lo cual indica que la aplicación masiva y liberación de la feromona de *T. solanivora* en los dispensadores, no originó un efecto de interferencia o confusión en machos de *P. operculella*.

Evaluación de la interrupción de la cópula en condiciones de almacenamiento

En condiciones de almacenamiento se encontró un mayor porcentaje de daño ocasionado por *T. solanivora* en los recintos no tratados con dispensadores, con un 39% de daño en tubérculos en comparación con un 9% de daño para los tubérculos almacenados en los recintos tratados con dispensadores, aunque no se encontraron diferencias estadísticas entre sí (Fig. 3). A pesar de haberse tratado los almacenes con dispensadores se obtuvieron porcentajes de daño por *T. solanivora*, esto podría indicar que se debe incrementar el número de dispensadores por almacen o por metro cuadrado, para interrumpir la cópula de adultos y en consecuencia el daño por este insecto.

Por otra parte, al estimarse la severidad (intensidad del daño) en los tubérculos afectados, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos con y sin dispensadores, sin embargo hubo un mayor número de tubérculos con severidad cuatro (tubérculos totalmente dañados) en los almacenes no tratados con dispensadores (Fig. 4).

Se han realizado estudios de interrupción de la cópula en condiciones de almacenamiento para el control de otros insectos plaga. Fadamiro y Baker (2002) evaluaron esta técnica en maíz infestado con *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) y *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae), encontrando una interrupción de la cópula del 70 y 40% respectivamente y reducciones significativas en la frecuencia de cópula en hembras de ambas especies. El proceso de cópula en insectos involucra señales olfativas las cuales ejercen su acción a largas distancias, aunque también puede involucrar la integración de otras señales visuales, táctiles, auditivas y de mecanorecepción en insectos, que pueden operar a cortas distancias de vuelo (Cardé y Minks 1995). En este caso, las señales procedentes de su entorno pueden incrementarse y ser utilizadas por los insectos, bajo condiciones de confinamiento y/o almacenamiento para garantizar la cópula.

En el presente estudio, con el uso de los dispensadores en condiciones de alma-

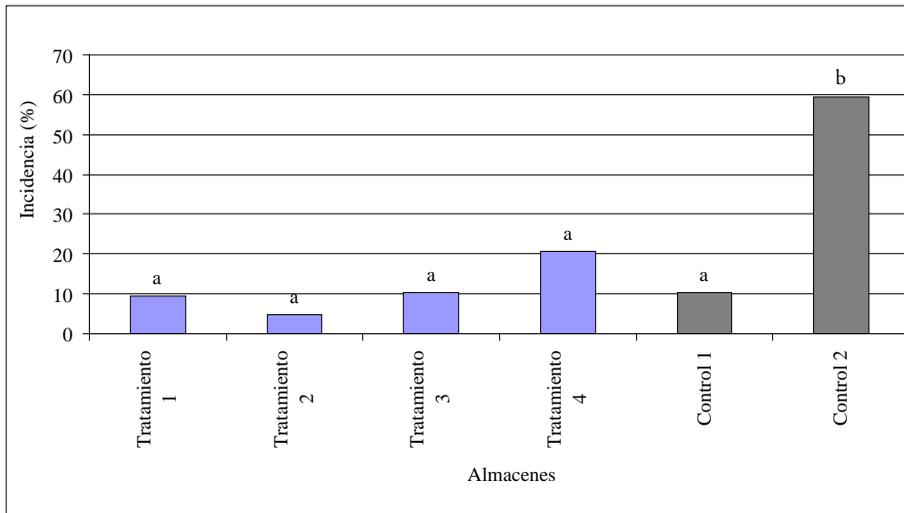


Figura 3. Incidencia en tubérculos en los almacenes control y en los almacenes tratados con dispensadores formulados con la feromona sexual de *T. solanivora*. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí según prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0,05$).

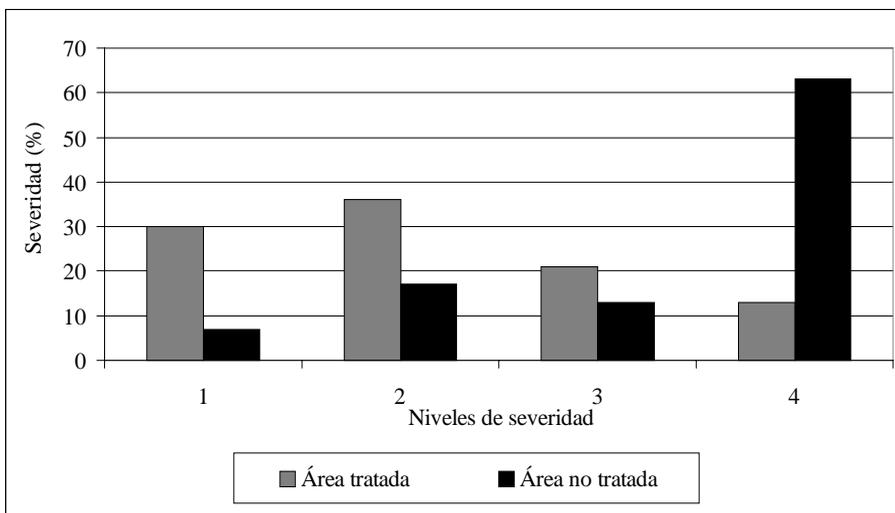


Figura 4. Severidad del daño en tubérculos almacenados en las áreas tratadas con dispensadores de la feromona y en áreas no tratadas.

cenamiento se evidenció una reducción en la incidencia del daño en tubérculos ocasionado por *T. solanivora*, aunque no fue evidente una reducción en la severidad. Esto posiblemente se debió, a la alta densidad de individuos liberados por almacén ya que algunos estudios conducidos en laboratorio o en ambientes simulados reportan la utilización de menores densidades de población de una plaga entre 1 a 5 polillas m^{-2} (Hagstrum y Davis 1982; Prevett *et al* 1989; Mafra-Neto y Baker 1996).

Estudios de Sower *et al.* (1975) indican que la eficacia de una feromona en procesos de interrupción de la cópula en insectos es denso-dependiente, esto

significa que a bajas densidades de población se consiguen mayores porcentajes de eficacia en la interrupción de la cópula, así mismo esta eficacia depende de la tasa de liberación de la feromona formulada en dispensadores.

Conclusiones

- Se determinó que la densidad de 400 dispensadores por hectárea formulados con la feromona de *T. solanivora*, redujo de manera altamente significativa las capturas de machos en trampas de vigilancia.
- Los dispensadores produjeron una disminución en la incidencia de tubérculos afectados por *T. solanivora* en los almacenes tratados.

Recomendaciones

- Evaluar la técnica de interrupción de la cópula mediante el uso de dispensadores en cultivos de papa de mayor extensión.
- Estimar la incidencia del daño en tubérculos en condiciones de campo para áreas tratadas con dispensadores.
- Realizar el seguimiento de machos liberados y la incidencia y frecuencia de cópulas medida como el número de espermátóforos por hembra, en sitios de almacenamiento de papa tratados y no tratados con dispensadores.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos por su apoyo financiero al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la agencia "Swedish Foundation for International Research and Higher Education (STINT)". Igualmente agradecen a la empresa japonesa Shin-Etsu por la elaboración y formulación de los dispensadores de la feromona sexual de *T. solanivora* y a los auxiliares de técnico Rubén Molina y Jesús Gómez por su valioso apoyo logístico.

Literatura citada

- ARÉVALO, A. 2003. Análisis de la problemática de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae) en Colombia. Memorias del II taller nacional sobre *Tecia solanivora* "Presente y futuro de la investigación sobre *Tecia solanivora*". CEVIPAPA. p. 129-133. Bogotá.
- ARÉVALO, A.; CASTRO, R. 2003. Evaluación post-registro de los insecticidas con licencia de uso para controlar la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae) en Colombia. Memorias del II taller nacional sobre *Tecia solanivora* "Presente y futuro de la investigación sobre *Tecia solanivora*". p. 86-89. CEVIPAPA. Bogotá.
- ARNINI, I.; LIZÁRRAGA, A. 2000. Control Etológico: Uso de feromonas, trampas de colores y luz para el control de plagas en la agricultura sostenible. RAAA. 197 p.
- BÄCKMAN, A. 1997. Pheromone release by codling moth females and mating disruption dispensers. Technology transfer in mating disruption. IOBC wprs Bulletin. 20 (1): 175-180.
- BÄCKMAN, A. 1999. Olfactory communication in the codling moth, *Cydia pomonella* L. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Crop Science. Agraria 165. Alnarp, Sweden. p. 1-33.
- BARRETO, N.; ESPITIA, E.; GALINDO, R.; GORDO, E.; CELY, L.; MARTÍNEZ, L.;

- LOZANO, F.; LÓPEZ-ÁVILA, A. 2003. Estudios de fluctuación de poblaciones de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* en tres intervalos de altitud en Cundinamarca y Boyacá. Memorias del II Taller nacional sobre *Tecia solanivora*. p. 119-122. CEVIPAPA. Bogotá.
- BOSA, F.; COTES, A.; FUKUMOTO, T.; BENGTTSSON, M. WITZGALL, P. 2005. Pheromone-mediated communication disruption in Guatemalan potato moth *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 114: 137-142.
- CARDÉ, R.; MINKS, A. 1995. Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. *Annual Review of Entomology*. 40: 559-585.
- CORACINI, M.; BENGTTSSON, M.; RECK-ZIEGEL, A.; ALVARO, E.; VILELA, E.; ANDERSON, P.; FRANCKE, W.; LÖFQVIST, J.; WITZGALL, P. 2002. Behavioural effects of minor sex pheromone components in Brazilian apple leafroller *Bonagota cranaodes* (Lepidoptera: Tortricidae). p. 1-13. En: *Semiochemicals claim territory - Sex pheromones and plant volatiles for control of codling moth and Brazilian apple leafroller*. Coracini, M (ed.). 2002. Doctoral thesis in Chemical ecology, Department of crop science. Swedish University of Agricultural Sciences. Agraria 366. Alnarp, Sweden. 28 p.
- CORREDOR, D.; FLÓREZ, E. 2003 a. Estudios básicos de la biología y comportamiento de la polilla de la papa en un área piloto en el municipio de Villapinzón. Memorias del II Taller nacional sobre *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. Bogotá. p. 23-31.
- CORREDOR, D.; FLÓREZ, E. 2003 b. Evaluación y estandarización de un sistema de monitoreo y vigilancia de la población de *Tecia solanivora* en campo. Memorias del II Taller nacional sobre *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. Bogotá. p. 32-45.
- DEKRAMER, J.; HEMBERGER, J. 1987. Pheromone Biochemistry. p. 433-472. G.D. Preswich (Ed.). Academic Press Inc. New York. USA. 563 p.
- DOWNHAM, H.; SMIT, N.; LABOKE.; HALL, D.; ODONGO, B. 2001. Reduction of pre-harvest infestations of African sweet potato weevils *Cylas brunneus* and *C. puncticollis* (Coleoptera: Apionidae) using a pheromone mating-disruption technique. *Crop protection* 20: 163-166.
- FADAMIRO, H.; BAKER, T. 2002. Pheromone puffs suppress mating by *Plodia interpunctella* and *Sitotroga cerealella* in an infested corn store. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 102: 239-251.
- GALINDO, R.; ESPAÑOL, J. 2001. Trampas de caída tipo malla y trampas pegajosas para la evaluación de adultos del Gusano blanco *Premnotrypes vorax* (Hustache) y la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* en condiciones de campo. <http://www.redepapa.org/malla.pdf>. Programa Nacional de Biometría. Subdirección de Investigación en sistemas de producción.
- HAGSTRUM, D.; DAVIS, L. 1982. Mate seeking behavior and reduced mating by *Ephestia cautella* (Walker) in sex pheromone-permeated atmosphere. *Journal of Economic Entomology*. 88: 507-515.
- HAYNES, K.; BAKER, T. 1988. Potential for evolution of resistance to pheromones. *Journal of Chemical Ecology*. 14: 1547-1560.
- HERRERA, F. 1997. La polilla guatemalteca de la papa. Biología, comportamiento y prácticas de manejo integrado. Corpoica. Regional uno, Bogotá. p. 14.
- MAFRA-NETO, A.; BAKER, T. 1996. Timed, metered sprays of pheromone disrupt mating of *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural Entomology*. 13: 149-168.
- MARTÍNEZ, L.; BARRETO, N. 2003. Evaluación de la vida útil de la feromona sexual de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en condiciones de campo. Memorias del II Taller nacional sobre *Tecia solanivora*. p. 83. CEVIPAPA. Bogotá.
- OGAWA, K. 1997. The key to success in mating disruption. En: *Technology Transfer in Mating disruption*. IOCB wprs Bulletin 20 (1): 1-9.
- PEDIGO, L. 1996. Management by modifying insect development and behavior. p. 461-478. Chapter 13. En: *Entomology and Pest Management*. Academic Press. New York. USA. 987 p.
- PREVETT, P.; BENTON, F.; HALL, D.; HODGES, R.; DOS SANTOS, R. 1989. Suppression of mating in *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Phycitidae) using microencapsulated formulations of synthetic sex pheromone. *Journal of Stored Products Research*. 25: 147-154.
- PRIMO, E. 1991. Ecología química: Nuevos métodos de lucha contra insectos. p. 75-149. Editorial Mundi Prensa. Madrid. 354 p.
- RAINA, A.; MENN, J. 1987. Pheromone Biochemistry. G.D. Prestwich and G.J. Blomquist (eds.). Academic Press. Orlando, USA. p. 159-174.
- 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 de Biología. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá. 143 p.
- SCHROEDER, P.; SHELTON, A.; FERGUSON, C.; HOFFMANN, M.; PETZOLDT, C. 2000. Application of synthetic sex pheromone for management of diamond-back moth, *Plutella xylostella*, in cabbage. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 94: 243-248.
- SOWER, L.; TURNER, W.; FISH, J. 1975. Population-density-dependent mating frequency among *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Phycitidae) in the presence of synthetic sex pheromone with behavioral observations. *Journal of Chemical Ecology*. 1: 335-342.
- SUÁREZ, A.; PRADA, Y.; BARRETO, N. 2003. Evaluación de tres profundidades de siembra y tres formas de aporque sobre el ataque de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* en el cultivo de la papa *Solanum tuberosum* var. pastusa. Resúmenes. XXX Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. p. 87. Cali.
- TORRES, F. 1989. Algunos aspectos de la biología y comportamiento de la polilla guatemalteca de la papa *Scrobipalopsis solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado del Tachira Venezuela. Tesis de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. p. 86.
- WITZGALL, P.; BÄCKMAN, A.; KARG, G.; BENGTTSSON, M.; STREINZ, L.; KIRSCH, P.; BLUM, Z.; LÖFQVIST, J. 1996 a. Behavioral observations and measurements of aerial pheromone in a mating disruption trial against pea moth *Cydia nigricana* F. (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Chemical Ecology*. 22 (2): 191-206.
- WITZGALL, P.; BÄCKMAN, A.; SVENSSON, M.; BENGTTSSON, M.; UNELLIUS, C.; VIKOC, J.; LÖFQVIST, J. 1996 b. Potential of a blend of E8, E10-12OH and E8, E10-12Ac for mating disruption of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Applied Entomology*. 120: 611-614.
- WITZGALL, P.; BÄCKMAN, A.; SVENSSON, M.; KOCH, U.; RAMA, F.; EL-SAYED, A.; BRAUCHLI, J.; ARN, H.; BENGTTSSON, M.; LÖFQVIST, J. 1999. Behavioral observations of codling moth, *Cydia pomonella*, in orchards permeated with synthetic pheromone. *Biocontrol* 44: 211-237.

Capacidad reproductiva de *Supputius cincticeps* (Hemiptera: Pentatomidae): se afectan las hembras con la continua exposición al macho?

Reproductive capacity of *Supputius cincticeps* (Hemiptera: Pentatomidae): are females affected by continual exposure to males?

RODRIGO DINIZ SILVEIRA¹, ADRIÁN JOSÉ MOLINA-RUGAMA¹, JOSÉ COLA ZANUNCIO¹

Resumen. Se estudió la influencia del periodo de exposición al macho sobre la capacidad reproductiva de las hembras de *Supputius cincticeps* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) en laboratorio. El experimento se realizó a una temperatura de $25.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$, humedad relativa de $60.0 \pm 10.0\%$ y fotoperiodo de 12 h. Las hembras se expusieron al macho para apareamiento, durante toda la vida (T1), hasta la primera puesta (T2) y sin exposición (T3). Se registró el número de puestas, el número y la viabilidad de los huevos y la longevidad de las hembras. El número de puestas fue semejante entre T1 y T2 (5.5 ± 0.88 y 4.9 ± 1.09 respectivamente) y mayores que T3, (1.8 ± 0.34). Igualmente, el número y la viabilidad de los huevos de las hembras de *S. cincticeps* entre T1 y T2 fueron semejantes (61.0 ± 10.74 y 49.9 ± 11.97 huevos y 62.2 ± 3.59 y $65.1 \pm 4.09\%$ respectivamente). Las chinches sin aparear (T3) colocaron menor número de huevos por hembra (12.2 ± 2.70) y estas puestas no fueron viables. Por otro lado, la longevidad de las hembras de *S. cincticeps* fue semejante entre los tratamientos con valores de 28.0 ± 2.25 (T1), 24.4 ± 3.48 (T2) y 26.9 ± 2.54 (T3) días, lo que sugiere que esa característica es independiente del apareamiento. Para cría masiva, las hembras y machos de *S. cincticeps* pueden mantenerse en producción por veinte a veinticinco días, pues durante ese periodo obtuvieron más del 80% del total de huevos producidos.

Palabras clave: Control biológico. Chinche predadora. Cría artificial. Selección sexual. Reproducción.

Summary. The influence of the period of male exposure on the reproductive capacity of *Supputius cincticeps* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) females in laboratory was studied. The experiment was conducted at a temperature of $25.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$, relative humidity $60.0 \pm 10.0\%$ and photoperiod 12 h. Females of *S. cincticeps* were exposed to the male for mating during their entire lifetime (T1), until laying the first egg mass (T2) and without male exposure (T3). The variables observed were number of egg masses, number and viability of the eggs and longevity of the female. The number of egg masses was similar between T1 and T2 (5.5 ± 0.88 , and 4.9 ± 1.09 per female respectively), and higher than T3 (1.8 ± 0.34). The number and viability of eggs of *S. cincticeps* were also similar between T1 and T2, (61.0 ± 10.74 and 49.9 ± 11.97 eggs, and $62.2 \pm 3.59\%$ and $65.1 \pm 4.09\%$, respectively). Bugs that did not mate (T3) laid fewer eggs per female (12.5 ± 2.70) and these were not viable. Longevity of females of *S. cincticeps* was similar among treatments with values of 28.0 ± 2.25 (T1), 24.4 ± 3.48 (T2) and 26.9 ± 2.54 (T3) days, showing that this biological characteristic is independent of mating. In terms of mass rearing, the females and males of *S. cincticeps* can be maintained in production for twenty to twenty five days old because during this period the bugs achieved more than 80% of total egg production.

Key words: Biological Control. Predator bug. Artificial rearing. Sexual Selection. Reproduction.

Introducción

Las chinches predadoras de la familia Pentatomidae, subfamilia Asopinae, son agentes importantes de control biológico que se alimentan sobre las diferentes fases de desarrollo de insectos pertenecientes a los ordenes Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera y Hemiptera (Zanuncio *et al.* 1994; De Clercq *et al.* 2002). El establecimiento de estas especies en un ecosistema depende de diferentes factores bióticos y abióticos los cuales pueden afectar su reproducción y

longevidad (Molina-Rugama *et al.* 1997, 1998; Mourão *et al.* 2003). No obstante, el éxito reproductivo de las especies poliándricas puede ser explicado por los apareamientos continuos, como se observa en las hembras de *Podisus* spp. las cuales aparentemente necesitan copular con diferentes machos para mantener una alta viabilidad de los huevos (Torres *et al.* 1997). De esa forma se espera que especies que copulan más de una vez, cuando apareadas en ambientes confinados, presenten una mayor tasa de cópulas y consecuentemente un aumento en el "fitness"

reproductivo (Arnqvist y Nilsson 2000). Sin embargo, un experimento realizado con hembras de la araña *Stegodyphus lineatus* Latreille (Araneida: Eresidae) demostró que el aumento en la tasa de apareamiento redujo el éxito reproductivo en un 35% y afectó la masa corporal de los descendientes (Maklakov *et al.* 2005).

La chinche predadora *Supputius cincticeps* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) se caracteriza por presentar tres cópulas como media (A.J. Molina-Rugama, ob-

1. Departamento de Biología Animal, Universidade Federal de Viçosa/BIOAGRO, 36.570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Fax: 55-31-3899-4012. E-mail: ajmolina@insecta.ufv.br

servación personal) dependiendo de su longevidad, pudiéndolo hacer con machos diferentes o con el mismo macho cuando se mantienen en un mismo ambiente. Esta especie depredadora ha sido encontrada en baja densidad en reforestaciones con eucalipto, lo que hace necesario el desarrollo de estudios sobre su biología, reproducción y cría masiva para que este depredador pueda ser multiplicado y liberado en programas de control biológico (Zanuncio *et al.* 1996-1997). Actualmente, este pentatómido es alimentado con larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae); los adultos son mantenidos dentro de pots plásticos de 500 ml en una proporción ♀ : ♂ de 1:1. En este estudio se determinó el efecto del período de exposición al macho sobre la fecundidad y la supervivencia de las hembras *S. cincticeps*.

Materiales y Métodos

El experimento se realizó en el laboratorio de Entomología Forestal, de la Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. Los adultos de *S. cincticeps* procedentes de la cría mantenida en el referido laboratorio se colocaron en cámaras de crecimiento a una temperatura de 25.0 ± 2 °C, humedad relativa de $60.0 \pm 10\%$ y fotoperíodo de 12 hs. La colonia de *S. cincticeps* se estableció aproximadamente hace cinco años con reintroducción de individuos del campo por lo menos una vez al año para evitar el efecto de consanguinidad. Durante ese periodo los depredadores recibieron como presas larvas o pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae).

Para verificar el efecto del confinamiento de la pareja, la hembra virgen de *S. cincticeps* con aproximadamente 24 h de edad se apareó con un macho de edad semejante, de acuerdo con los siguientes tratamientos: hembras expuestas al mismo macho durante toda la vida (T1); apenas hasta la primera puesta (T2) y sin exposición al macho (T3). Los tratamientos se definieron con base en la metodología de cría de esos insectos en laboratorio (machos y hembras juntos hasta el final de su ciclo de vida) y al período de días necesario para que las hembras coloquen su primera puesta (alrededor de seis días) (Zanuncio *et al.* 2001). Los machos que murieron antes de la hembra correspondiente se substituyeron por otros provenientes de la cría conforme cada tratamiento. Las hembras utilizadas pesaron entre 50.0 y 55.0 mg para evitar el efecto de tamaño sobre las variables reproductivas estudiadas (Zanuncio *et al.* 2002).

La pareja de *S. cincticeps* se mantuvo aislada y alimentada con pupas de *T. molitor* (Zanuncio *et al.* 1996) y diariamente se observó la supervivencia de los adultos y la presencia de puestas, las cuales se retiraron y se colocaron en un pedazo de algodón dentro de una placa de Petri conteniendo otro pedazo de algodón humedecido. De esa forma se determinó: el número de huevos, el número de huevos por puesta, el número de puestas, el porcentaje de huevos viables y la longevidad de las hembras.

El experimento se organizó bajo un diseño completamente aleatorio, con tres tratamientos y 20 repeticiones. Cada unidad experimental estaba constituida por una pareja de *S. cincticeps*. Los datos correspondientes al número de huevos por puesta se transformaron en \sqrt{x} y la viabilidad y la cantidad de huevos por hembra en $n_1 = \arcsen(\sqrt{n/100})$. Los promedios obtenidos se compararon por la prueba de Tukey al nivel de 5% de probabilidad (Gomes 1978).

Resultados

El número de huevos colocados por *S. cincticeps* fue afectado por los diferentes tratamientos estudiados ($F = 6.12$; $df = 2, 39$; $P = 0.0048$). La cantidad de huevos registrados en las hembras apareadas durante toda la vida (T1 = 61.0 ± 10.74) o hasta la primera puesta (T2 = 49.9 ± 11.97) fueron semejantes entre si y mayores a aquellos obtenidos con las hembras vírgenes (T3 = 12.2 ± 2.70). La misma tendencia fue observada para el número promedio de

huevos por puesta ($F = 4.89$; $df = 2, 17$; $P = 0.008$) y el número de puestas por hembra ($F = 4.66$; $df = 2, 39$; $P = 0.015$). Los promedios obtenidos para esas variables fueron similares entre los tratamientos T1 y T2 (11.1 ± 0.64 y 10.3 ± 0.73 ; 5.5 ± 0.88 y 4.9 ± 1.09 , respectivamente), mientras tanto, aquellas del tratamiento T3 tuvieron los menores valores con 6.7 ± 1.07 y 1.8 ± 0.34 , respectivamente. La viabilidad de los huevos fue semejante entre las hembras del T1 y T2, con valores de 62.2 ± 3.59 y $65.1 \pm 4.09\%$, respectivamente ($F = 0.28$; $df = 1, 15$; $P = 0.594$). No hubo eclosión de huevos en las hembras del tratamiento T3, por lo que este grupo no fue incluido en el análisis de varianza.

Al interpretar la curva correspondiente a la viabilidad de los huevos en función del orden de puesta (Fig. 1) se observa que las hembras de *S. cincticeps* del tratamiento T2 tuvieron una drástica reducción en el porcentaje de huevos viables cuando son comparadas con aquellas del tratamiento T1, las cuales mantuvieron un alto porcentaje de eclosión al final de su periodo de reproducción. De otra parte, las hembras de *S. cincticeps* de los tratamientos T1 y T2 comenzaron a realizar puestas entre el quinto y décimo días, llegando a colocar 80% de los huevos en los primeros 25 días (Fig. 2). Por otro lado, la longevidad de las hembras de *S. cincticeps* fue semejante entre los tratamientos ($F = 0.42$; $df = 2, 59$; $P = 0.655$), con valores promedios de 28.0 ± 2.25 , 24.4 ± 3.48 y 26.9 ± 2.54 días para los tratamientos T1, T2 y T3, respectivamente.

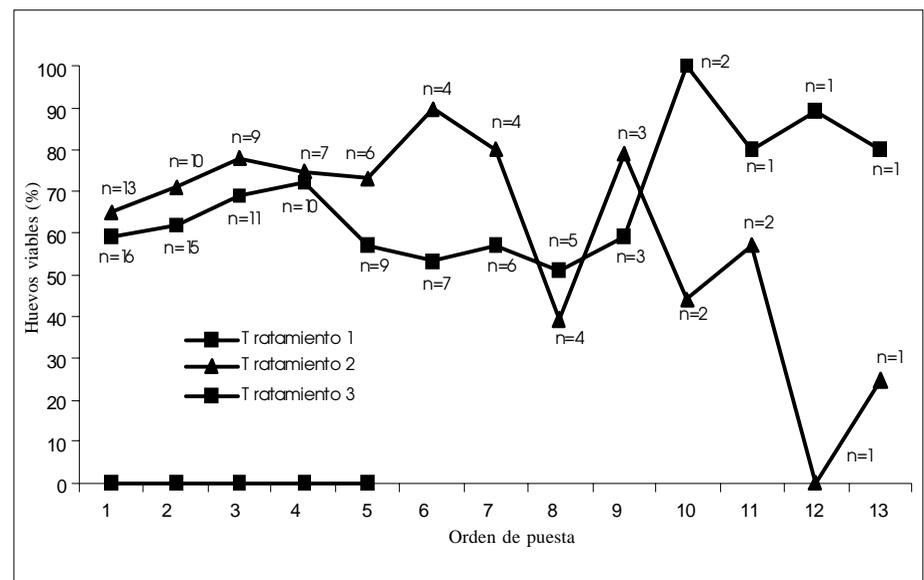


Figura 1. Porcentaje de huevos viables por puesta de las hembras de *Supputius cincticeps* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) mantenidas junto al macho durante toda la vida (T1), apenas hasta la primera puesta (T2) y sin exposición al macho (T3).

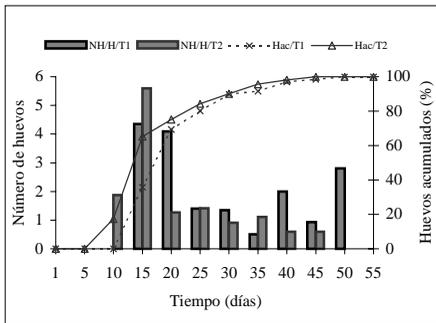


Figura 2. Promedio de huevos producidos por hembras a cada cinco días (NH/H) y porcentaje de huevos acumulados (Hac) de las hembras de *Supputius cincticeps* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) mantenidas junto al macho durante toda la vida (T1) y apenas hasta la primera puesta (T2).

Discusión

La fecundidad de las hembras de *S. cincticeps* no estuvo afectada por el periodo de exposición al macho. Sin embargo, Torres *et al.* (1997) mencionaron que las hembras de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) copuladas durante toda la vida presentaron menor número de huevos en relación con aquellas apareadas una, dos o cuatro veces, lo que puede ser debido a los diferentes cortejos e intensidades de cópula realizados por el macho. Por otro lado, el hecho de que las hembras expuestas al macho durante todo su ciclo de vida (T1) o apenas hasta la primera puesta (T2) hayan presentado desempeño reproductivo similar, demuestra que los machos pueden mantenerse dentro del vaso de cría hasta la primera puesta y posteriormente liberarse en el campo. Mientras tanto, las hembras de *S. cincticeps* vírgenes (T3) presentaron menor número de puestas y de huevos, lo que también fue observado por De Clercq y Degheele (1997) y por Torres *et al.* (1997) para *P. maculiventris* y *P. nigrispinus*, respectivamente.

Aproximadamente, 20% de las hembras de *S. cincticeps* no realizaron puestas, lo que representaría una reducción de casi 244 huevos para un grupo de 20 hembras de este predador. Esto puede estar asociado a la falta de un apareamiento adecuado entre los individuos, ya sea por no ocurrir cópula o inclusive por haber resistencia de las hembras a nuevas cópulas. Rodríguez (1998), estudiando el comportamiento de apareamiento de *Ozophora baranowskii* (Hemiptera: Lygaeidae) observó que durante la cópula, las hembras resistían a la misma golpeando el abdomen del macho con las

patas posteriores, resultando a veces en una reducción del tiempo de cópula y de transferencia de espermatozoides.

Las hembras de *S. cincticeps* pertenecientes al tratamiento T1 o T2 presentaron semejanza en el porcentaje de huevos viables indicando que, aparentemente, no hubo una reducción en la cantidad de espermatozoides transferidos. Esto concuerda con lo encontrado para *P. nigrispinus* (Torres *et al.* 1997) y puede ser un atributo adecuado para que esas chinches se establezcan en un ecosistema agrícola o forestal. Sin embargo, en arañas, la hembra de *S. lineatus* confinada al macho tuvo efecto deletéreo en la producción total de descendientes (Maklakov *et al.* 2005). Estos resultados sugieren que organismos poliándricos presentan diferentes comportamientos cuando la pareja se interrelaciona y que dos o más apareamientos no necesariamente implican un aumento en la eficacia reproductiva de algunas hembras. Además, otros aspectos biológicos pueden ser alterados en las hembras debido a la presencia constante del macho pudiendo reducir la actividad de alimentación como se observó en *Lampetis nigerrima* (Kerremans) (Coleoptera: Buprestidae) (De Nadai 2005) y consecuentemente disminuir el éxito reproductivo (Parra 1991). De acuerdo con Arnqvist y Nilsson (2000) el efecto de múltiples cópulas todavía no es bien entendido y es difícil de predecir, pues los diferentes componentes reproductivos de las hembras son afectados de forma negativa y/o positiva por varios factores como el propio apareamiento, la transferencia adecuada de esperma y las sustancias presentes en el eyaculado.

Al analizarse el comportamiento de eclosión por puesta, se observó que hubo mayor número de huevos infértiles en las últimas puestas para las hembras del tratamiento T2, lo que parece ser semejante entre especies poliándricas como las chinches predadoras (Torres *et al.* 1997; Torres y Zanuncio 2001). Este resultado indica que, probablemente, las hembras de *S. cincticeps* no lograron obtener y almacenar en la espermateca la cantidad de espermatozoides suficientes para fertilizar todos sus óvulos. Este resultado no se encontró en las hembras del tratamiento T1 (confinadas junto al macho durante todo su periodo de reproducción), las cuales mantuvieron una alta fertilidad a lo largo de su periodo reproductivo, demostrando claramente el efecto positivo de múltiples apareamientos en la fertilidad de las hembras (Arnqvist y Nilsson 2000). Por lo tanto,

la transferencia efectiva de espermatozoides debe evaluarse comparándose la eclosión de los huevos en función del orden de puesta y no compararse apenas el promedio de huevos viables debido a que eso puede enmascarar los resultados. Además de ese tipo de beneficio, es posible que las hembras también reciban junto con el eyaculado otras sustancias como agua y nutrientes (Arnqvist *et al.* 2005).

Si bien en grupos relacionados, como algunas especies del género *Podisus*, se ha registrado canibalismo (Richman y Whitcomb 1978), esto no se observó en *S. cincticeps*. La presencia del macho durante toda la vida de las hembras de *S. cincticeps* no tuvo ese efecto negativo debido a que éstas presentaron promedio de longevidad semejante (alrededor de 26 días) en todos los tratamientos. Éstos resultados son próximos a aquellos encontrados por Zanuncio *et al.* (1992) quienes observaron una longevidad de 30 días para hembras de esa misma especie a 25 °C en condiciones de laboratorio.

En conclusión, hembras y machos de *S. cincticeps* pueden mantenerse en una proporción 1:1 en las colonias de laboratorio, por lo menos hasta alcanzar 25 días de edad, debido a que durante ese periodo las chinches acumularon, aproximadamente, 80% de la productividad de huevos. De esa forma se optimizaría la cría de ese predador en laboratorio y consecuentemente el establecimiento de programas de control biológico utilizando ese tipo de enemigo natural. Además el hecho de confinar las parejas de *S. cincticeps* no influyó negativamente en el desempeño reproductivo de las hembras y contribuyó para mantener una alta viabilidad a lo largo de su periodo reproductivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq), a la Fundación de Amparo a la Investigación del Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) y a la Federación de Industrias del Estado de Minas Gerais (FIEMG) por el apoyo financiero recibido para la realización de este experimento.

Literatura citada

- ARNQVIST, G.; NILSSON, T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and females fitness in insects. *Animal Behaviour* 60 (2): 145-267.
- ARNQVIST, G.; NILSSON, T.; KATVALA, M. 2005. Mating rate and fitness in female

- bean weevils. *Behavioral Ecology* 16(1): 123-127.
- DE CLERCQ, P.; DEGHEELE, D. 1997. Effects of mating status on body weight, oviposition, egg load, and predation of the predatory stinkbug *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). *Annals of the Entomological Society of America* 90 (2): 121-127.
- DE CLERCQ, P.; WYCKHUYS, K.; OLIVEIRA, H.N.; KLAPWIJK, J. 2002. Predation by *Podisus maculiventris* on different life stages of *Nezara viridula*. *Florida Entomologist* 85 (1): 197-202.
- DE NADAI, J. 2005. Biología de *Lampetis nigerrima* (Kerremans, 1897) (Coleoptera: Buprestidae) em eucalipto. Tesis de Maestría en Entomología. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 53 p.
- GOMES, F.P. 1978. Curso de estatística experimental. ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. 430 p.
- MAKLAKOV, A. A.; BILDE, T.; LUBIN, Y. 2005. Sexual conflict in the wild: elevated mating rates reduces female lifetime reproductive success. *American Naturalist* 165(5): S38-S45.
- MOLINA-RUGAMA, A.J.; ZANUNCIO, J.C.; TORRES, J.B.; ZANUNCIO, T.V. 1997. Longevidad y fecundidad de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado con *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) y frijol. *Revista de Biología Tropical* 45 (3): 1125-1130.
- MOLINA-RUGAMA, A.J.; ZANUNCIO, J.C.; ZANUNCIO, T.V.; DE OLIVEIRA, M.L.R. 1998. Reproductive strategy of *Podisus rostralis* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae) females under different feeding intervals. *Biocontrol Science and Technology* 8 (4): 583-588.
- MOURÃO, S.A.; J.C. ZANUNCIO; A.J. MOLINA-RUGAMA; E.F. VILELA; M.C. LACERDA. 2003. Efeito da escassez de presas na sobrevivência e reprodução do predador *Supputius cincticeps* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology* 32 (2): 469-473.
- PARRA, J.R.P. 1991. Consumo e utilização de alimentos por insetos. p. 9-66. En: Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. (eds.). *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. Ed. Manole. São Paulo, Brasil. 359 p.
- RICHMAN, D.B.; WHITCOMB, W.H. 1978. Comparative life cycles of four species of predatory stinkbugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Florida Entomologist* 61 (3): 113-119.
- RODRÍGUEZ, R.L.S. 1998. Possible female choice during copulation in *Ozophora baranowskii* (Heteroptera: Lygaeidae): female behavior, multiple copulations, and sperm transfer. *Journal of Insect Behavior* 11 (5): 725-741.
- TORRES, J.B.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, M.C. 1997. Mating frequency and its effect on female reproductive output in the stinkbug predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent*. 62 (2b): 491-498.
- TORRES, J.B.; ZANUNCIO, J.C. 2001. Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator *Podisus nigrispinus*. *BioControl* 46 (4): 469-480.
- ZANUNCIO, T.V.; ZANUNCIO, J.C.; VILELA, E.F. 1992. Aspectos biológicos da fase adulta de *Supputius cincticeps* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae), predador de lagartas desfolhadoras de eucalipto. *Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais* 45 (1): 35-39.
- ZANUNCIO, J.C.; ALVES, J.B.; ZANUNCIO, T.V.; GARCIA, J.F. 1994. Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecology and Management* 65 (1): 65-73.
- ZANUNCIO, J.C.; SAAVEDRA, J.L.D.; OLIVEIRA, H.N.; DEGHEELE, D.; DE CLERCQ, P. 1996. Development of the predatory stinkbug *Brontocoris tabidus* (Signoret) (Heteroptera: Pentatomidae) on different proportions of an artificial diet and pupae of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biocontrol Science and Technology* 6 (4): 619-625.
- ZANUNCIO, J.C.; SAAVEDRA, J.L.D.; ZANUNCIO, T.V.; SANTOS, G.P. 1996-1997. Desarrollo y reproducción de *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) en dieta artificial por dos generaciones. *Revista de Biología Tropical* 44 (3) / 45 (1): 247-251.
- ZANUNCIO, J.C.; MOLINA-RUGAMA, A.J.; SERRÃO, J.E.; PRATISSOLI, D. 2001. Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology* 11 (3): 331-337.
- ZANUNCIO, J.C.; MOLINA-RUGAMA, A.J.; SANTOS, G.P.; RAMALHO, F.S. 2002. Effect of body weight on fecundity and longevity of the stinkbug predator *Podisus rostralis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37(9): 1225-1230.

Tabla de vida de *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) en la mosca blanca *Trialeurodes* *vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae)

Life table of *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) on the whitefly *Trialeurodes*
vaporariorum (Hemiptera: Aleyrodidae)

JAVIER GARCÍA GONZÁLEZ¹, ÉDGAR RICARDO BENÍTEZ S., ARISTÓBULO LÓPEZ-ÁVILA²

Resumen. Se construyó la tabla de vida del depredador *Delphastus pusillus* (Le Conte) (Coleoptera: Coccinellidae), alimentado sobre su presa la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae). A partir de individuos procedentes de una colonia del depredador mantenida en laboratorio, se tomó un grupo de 30 adultos de edad conocida los cuales fueron ubicados en cajas de Petri. A partir de cohortes de 493 y 682 huevos del depredador, se realizaron observaciones de individuos vivos al inicio de cada estado, individuos muertos en cada estado, tiempo de duración de cada estado, longevidad de la hembra, huevos puestos por hembra, tiempo en que la hembra oviposita y proporción de sexos. Con la información colectada se estimaron los parámetros tasa finita de crecimiento (λ), tasa intrínseca de crecimiento natural (r_m), tasa neta reproductiva (R_o), tiempo generacional (T_g), tiempo de duplicación de la población original (D_t), tiempo de fecundidad de la hembra, tasa de oviposición y se obtuvieron las curvas de oviposición y sobrevivencia del depredador. Hubo menor sobrevivencia de *D. pusillus* en los primeros estados de desarrollo, particularmente en los estados de huevo y larva I. Los parámetros estimados para individuos de *D. pusillus* provenientes en una primera y una sexta generación fueron: $R_o = 5.51$ y 3.17 respectivamente, $D_t = 23.0$ y 20.05 , $\lambda = 1.03$ para las dos generaciones, $r_m = 0.03$ para las dos generaciones. Se plantea que hembras depredadoras de una primera generación hacen un mayor aporte de hembras hijas, comparado con el aporte hecho por hembras de una generación seis mantenida en laboratorio.

Palabras clave: Tasa intrínseca de crecimiento natural. Tiempo generacional. Curva de sobrevivencia.

Summary. The aim of this research was to construct the life table of the predator *Delphastus pusillus* (Le Conte) (Coleoptera: Coccinellidae), feeding on its prey, the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae). A group of 30 adults of known age were taken from among individuals reared in a colony maintained in the laboratory, and put into Petri dishes. Based on cohorts of 493 and 682 eggs of the predator, observations were made on the number of individuals alive at the beginning of each development stage, individuals that died in each stage, duration of each stage, female longevity, eggs laid per female, period of oviposition and sex ratio. The information collected was used to calculate the parameters of finite growth rate (λ), intrinsic rate of natural increase (r_m), net reproductive rate (R_o), generation time (T_g), time to population doubling (D_t), time of female fecundity, oviposition rate, and the oviposition and survival curves of the predator. There was lower survival of *D. pusillus* in the early developmental stages, particularly the egg and larva I stages. The estimated parameters obtained from the first and sixth generations were: $R_o = 5.51$ and 3.17 , respectively, $D_t = 23.0$ and 20.5 , $\lambda = 1.03$ for both generations and $r_m = 0.03$ for both generations. It is suggested that first generation female predators make a greater contribution to female daughters compared to the contribution made by females of the sixth generation maintained in laboratory.

Key words: Intrinsic natural growth rate. Generation time. Survivorship curve.

Introducción

Las moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) se conocen de tiempo atrás y han sido estudiadas por más de 250 años. De las cerca de 1200 especies de mosca blanca reconocidas e identificadas a nivel mundial, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) difieren de las otras especies por los graves daños económicos que causan

a la agricultura en muchas regiones del mundo (Gerling 2000). En Colombia *T. vaporariorum* es la especie predominante en el trópico alto y valles interandinos atacando principalmente cultivos de fríjol, habichuela, tomate y papa (Quintero *et al.* 1999).

Como medidas de control de *T. vaporariorum* el uso de plaguicidas químicos es casi la única herramienta empleada. A

partir de un diagnóstico con agricultores se determinó que el 46% de ellos han tenido que abandonar alguna vez el cultivo por mal control de la plaga, por lo que cuestionan el empleo de insecticidas. El número de ingredientes activos usados contra moscas blancas asciende a 32, siendo los grupos insecticidas más utilizados los organofosforados, carbamatos, piretroides y los de nueva generación (Rendón *et al.* 2000).

1 Autor para Correspondencia. Ingeniero Agrónomo M.Sc. Entomología. Investigador cooperante, Área de Entomología Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas MIP. Corpoica C.I. "Tibaitatá". jgarcia@corpoica.org.co

2 Ph. D. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas MIP. Corpoica C.I. "Tibaitatá".

En la búsqueda de alternativas de manejo de la plaga, se han adelantado estudios con el insecto depredador *Delphastus pusillus* (Le Conte) (Coleoptera: Cocci-nellidae), el cual se alimenta de las dos especies de mosca blanca de mayor importancia económica *T. vaporariorum* y *B. tabaci* y se encuentra ampliamente distribuido en el país en los departamentos de Guajira, Cesar, Santander, Boyacá, Cundinamarca, Tolima, y Huila (López-Ávila *et al.* 2001).

Antes de liberar un enemigo natural en campo es necesario conocer algunos atributos biológicos y ecológicos que permitan identificar su efecto regulador. Uno de ellos es la capacidad de crecimiento de la población del depredador con respecto a su presa (Rodríguez del Boque 1994). Algunas características de la población en estudio pueden ser obtenidas con la construcción de tablas de vida. La tabla de vida es un componente importante en el entendimiento de la dinámica de población de una especie. Deevy (1947) citado por Southwood (1978), fue el primer investigador que enfocó su atención en la importancia de estas tablas. Las tablas de vida han sido usadas para determinar la expectativa de vida de un candidato biológico y la expectativa de vida de un estado específico del organismo. Ya que muchos insectos tienen generaciones discretas y sus poblaciones no son estacionarias, las tablas de vida "de tipo horizontal o específicas por edades" son más aplicables que las tablas de vida de "temporales o verticales". Las primeras se basan en la mortalidad real de una cohorte en la que los individuos pertenecen a la misma generación, mientras que las tablas de vida temporales o verticales se basan en la muerte de una cohorte imaginaria encontrada por determinación de estructura de edad en un punto específico de desarrollo de la misma (Southwood 1978; Rabinovich 1980).

En la obtención de una tabla de vida se deben estimar tres parámetros de la población para que esta sea lo más completa posible. El primero es el número de individuos vivos que entran a cada estado del ciclo de vida del insecto; el segundo la mortalidad a partir de factores específicos en cada estado de vida y el tercero la fecundidad (Bellows *et al.* 1992). Con el presente trabajo se estimaron parámetros de la tabla de vida para *Delphastus pusillus* y se obtuvieron las curvas de sobrevivencia para el depredador criado en una primera y una sexta generación mantenidas en laboratorio.

Materiales y Métodos

Con el fin de determinar diferencias en los parámetros de la tabla de vida por efecto de las condiciones de cría en laboratorio, se establecieron diferencias para *D. pusillus* entre una generación reciente y una generación antigua, generaciones I y VI.

A partir de individuos procedentes de la colonia del depredador, se tomó un grupo de 30 adultos de edad conocida, los cuales fueron ubicados por parejas en cajas de Petri de vidrio de 5 cm de diámetro. Al interior de las que se ubicaron foliolos infestados con inmaduros de mosca blanca; los foliolos fueron renovados cada dos días, con el fin de retirar las posibles posturas así como para renovar el alimento al depredador. Las cajas de petri donde se ubicaron las posturas de *D. pusillus*, fueron debidamente identificadas con la fecha de oviposición y la pareja de adultos de la cual provenían. Con el fin de determinar el comportamiento biológico del depredador en condiciones de cría, se construyó la tabla de vida para una primera y una sexta generación; a partir de una cohorte de 493 y 682 huevos del depredador respectivamente. Se realizaron las observaciones en los diferentes estados por los que pasa el insecto. Se registró el número de individuos vivos al inicio de cada estado, individuos muertos en cada estado, tiempo de duración de cada estado, longevidad de la hembra, huevos puestos por hembra, tiempo en que la hembra fue fecunda y proporción de sexos.

Con estos registros se estimaron los siguientes parámetros de fecundidad del depredador: tiempo de fecundidad de la hembra definido por el tiempo que la hembra ovipositó dividido por su longevidad, tasa de crecimiento reproductivo (G_{RR}), tasa de oviposición promedio día, tasa neta reproductiva (R_0), tasa intrínseca de crecimiento natural (r_m) y tasa finita de creci-

miento (λ). Posteriormente se obtuvieron parámetros adicionales no relacionados con la fecundidad de *D. pusillus*: tiempo generacional (T_g), tiempo de duplicación de la población inicial (D_i) y longevidad de la hembra. Finalmente se determinó el comportamiento de sobrevivencia y mortalidad de las poblaciones del depredador en estudio.

La información se analizó con ayuda del procedimiento propuesto por Maia *et al.* (2000) y el paquete estadístico SAS® (1999). La comparación de los parámetros estimados para las dos generaciones en estudio se realizó con la prueba t de una cola.

Resultados y discusión

La prueba t de una cola presentó diferencias significativas entre las generaciones uno y seis para las variables tiempo de fecundidad, tasa de crecimiento reproductivo (G_{RR}), tasa neta reproductiva (R_0) y tasa de oviposición hembra/día (Tabla 1).

El tiempo de fecundidad, definido como el tiempo de vida en que la hembra ovipositó dividido por su longevidad, para hembras de *D. pusillus* en la primera generación fue de 69,3 días. En este tiempo, la hembra depredadora presentó una tasa de crecimiento reproductivo (G_{RR}) de 185,3 huevos y una tasa de oviposición diaria de 0,84 (Tabla 1). Las hembras en la sexta generación mostraron un tiempo de fecundidad de 49,0 días, una G_{RR} de 84,2 huevos y una tasa de oviposición hembra/día de 0,61 (Tabla 1).

Para la variable tasa neta reproductiva (R_0) se obtuvo un valor estimado de 5,51 hembras hijas/hembra madre para la primera generación; para la generación seis el aporte de hembras hijas/hembra madre fue de 3,17. Los resultados muestran que hembras del depredador en la primera generación hacen un mayor aporte de hembras hijas respecto al aporte hecho

Tabla 1. Parámetros de fecundidad de hembras de *D. pusillus* en las generaciones uno y seis mantenidas en laboratorio.

Variable	Generación uno	Generación seis
Tiempo de fecundidad de la hembra (días)	69,30 *	49,0 *
Tasa crecimiento reproductivo (G_{RR})	185,30 *	84,20 *
Tasa de oviposición promedio/hembra/día	0,84 *	0,61 *
Tasa neta reproductiva (R_0) (hembras/hembra)	5,51 *	3,17 *
Tasa intrínseca de crecimiento (r_m)	0,03 NS	0,03 NS
Tasa finita de crecimiento (λ)	1,03 NS	1,03 NS

* Valores significativamente diferentes al nivel del 5%. NS valores no significativos, según la prueba t de una cola

por hembras de una generación seis mantenida en laboratorio.

El significado del valor de R_0 en ecología de poblaciones, señala el crecimiento, disminución o estabilidad de una población de generación en generación; valores de R_0 mayores de la unidad indican que la población en estudio se encuentra en estado de crecimiento, caso observado para la población de *D. pusillus*, donde dichos valores son mayores que la unidad (Southwood 1978; Rabinovich 1980).

La cría de insectos en condiciones de laboratorio puede generar adaptaciones no genéticas temporales, o cambios genéticos permanentes como resultado de selección, deriva y endocría. Ambos tipos de cambios pueden influenciar el comportamiento del insecto benéfico al ser liberado en campo y puede afectar su desempeño en programas de control biológico. Por ello la implementación de un esquema de control de calidad es importante en un programa de manejo de plagas cuando se utilizan enemigos naturales producidos en laboratorio (De Clercq *et al.* 1998). A partir de la información obtenida se hace necesario determinar a partir de que generación del depredador hay mayor reducción del valor R_0 , para introducir poblaciones de *D. pusillus* de campo y mitigar la disminución de hembras hijas.

La prueba t no detectó diferencias significativas para las variables tasa intrínseca de crecimiento (r_m) y tasa finita de crecimiento (λ), en las generaciones de *D. pusillus* evaluadas. La variable tasa intrínseca de crecimiento (r_m), para las dos generaciones presentó un valor de 0,03 hembras/hembra/día; mientras que para la variable tasa finita de crecimiento (λ) el valor fue 1,03.

La igualdad en los parámetros r_m y λ estimados para las dos generaciones en estudio se podría explicar por que éstos son considerados intrínsecos de la especie y están regidos por factores genéticos. Al respecto Rabinovich (1980), menciona que r_m , como una tasa intrínseca de crecimiento natural, es un parámetro genéticamente determinado y refleja una capacidad potencial de multiplicación de la población.

En condiciones naturales los factores que afectan el equilibrio de una población están dados por el nacimiento, muerte, inmigración y emigración de los individuos. En condiciones controladas los dos últimos factores no son considerados. En

condiciones controladas el parámetro r_m está regido por la natalidad y la mortalidad de individuos de la población, las cuales para las condiciones de estudio fueron similares.

En términos demográficos el valor de λ está determinado por el ambiente y por el ciclo de vida de las especies. Este parámetro caracteriza la dinámica potencial de una población de una forma simplificada y sirve para discutir efectos de escenarios más complejos. Además sirve como punto de partida de manejo de poblaciones ya sea para reducir la diseminación de la plaga o para incrementar la dispersión de una especie introducida (Neubert y Caswell 2000).

En la mayoría de las hembras evaluadas se observó que la primera postura no fue viable, pero fue de importancia para ubicar sitios de oviposición seguros; algunos sitios usados por la hembra de *D. pusillus* para proteger sus posturas fueron las nervaduras de las hojas, debajo del cuerpo de adultos de mosca blanca muertos y en el interior de exuvias pupales de mosca blanca; al parecer, este

comportamiento reduce la probabilidad de que los huevos sean atacados por otros enemigos naturales.

La curva de oviposición hembra/día (Fig. 1a), para hembras en la primera generación presentó dos picos. El primero a los 32 días y el segundo a los 48 días de vida de la hembra con un promedio de 15,6 y 16,4 huevos/hembra/día respectivamente. Después del día 48 disminuyó la cantidad de huevos puestos, hasta ser cero al último día de vida de la hembra (día 104)

La curva de oviposición acumulada para hembras de la primera generación mostró una tendencia sigmoide. Desde el día cero hasta el día 24 de vida de la hembra, se observó un leve incremento de oviposición. Entre los días 30 y 68 de vida de la hembra se presentó un incremento acelerado de oviposición (Fig. 1b), determinado por los mayores picos de oviposición. Después del día 68 de emergida la hembra, se redujo la tasa de oviposición que concuerda con los períodos finales de vida de la hembra (Fig. 1b).

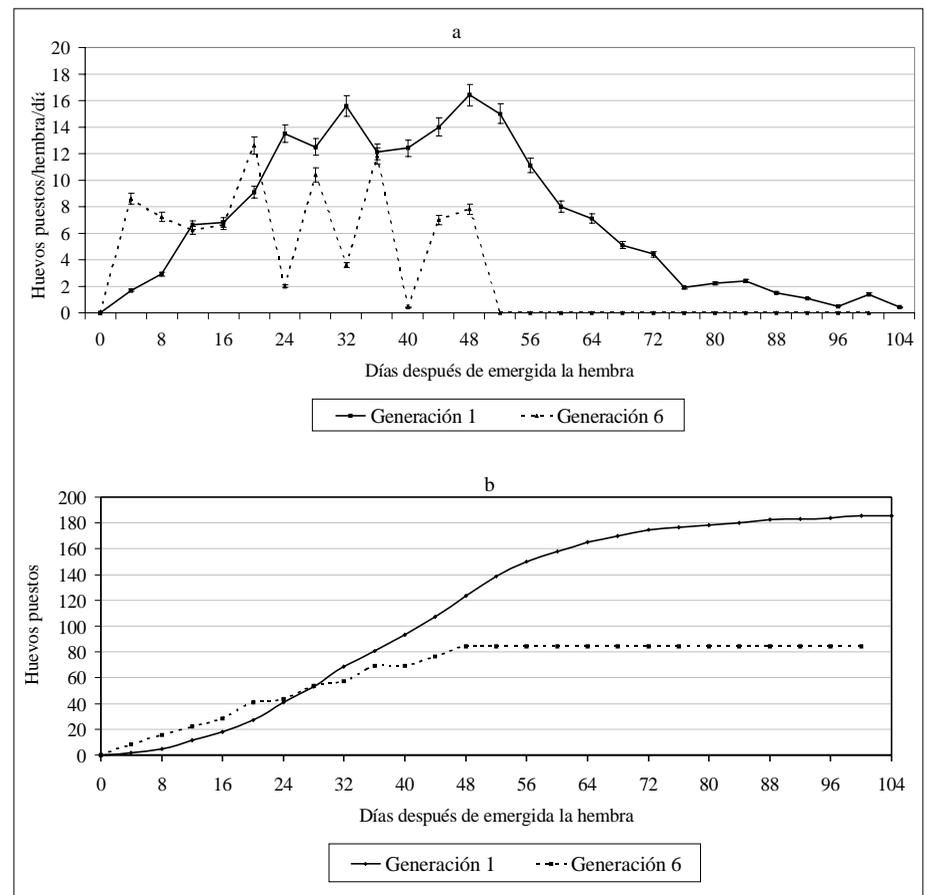


Figura 1. Fecundidad de la hembra de *D. pusillus* (Le Conte) observada para las generaciones 1 y 6 mantenidas en laboratorio **a.** Oviposición promedio/día **b.** Curva de oviposición acumulada.

La curva de huevos puestos/hembra/día para hembras de *D. pusillus* en una sexta generación mostró picos de alta oviposición seguidos por períodos de baja oviposición (Fig. 1a). Este comportamiento junto al hecho de que la hembra presentó un bajo tiempo de fecundidad respecto a hembras de la primera generación, redujo en gran medida la G_{RR} para la sexta generación (Tabla 1). La curva de oviposición acumulada para hembras de la sexta generación mostró un incremento en la cantidad de huevos puestos desde el día 4 hasta el día 48 de vida de la hembra. Después de esta fecha no se observaron posturas, por lo que la curva se estabilizó hasta la muerte de la última hembra producida al día 100 (Fig. 1b).

A partir de las curvas de oviposición acumulada se evidencia la diferencia que existe en la fecundidad de hembras de la primera y la sexta generación de *D. pusillus*. La oviposición total acumulada para hembras de la primera y la sexta generación respectivamente fue de 185,3 y 84,2 con un promedio de 1,8 y 0,8 huevos puestos/hembra/día respectivamente. El período de finalización de la oviposición, representado por el tiempo en que la curva se estabiliza, se observó en los días 84 y 48 de emergida la hembra para las generaciones uno y seis respectivamente (Fig. 1b).

Algunos de los factores descritos como limitantes de la fecundidad de especies mantenidas en laboratorio son la calidad y cantidad del esperma producido por el macho (Jervis y Copland 1996). Otro factor limitante es la endocría, en la que algunas características biológicas de la especie como la fecundidad y la proporción de sexos se afectan negativamente, al cruzar individuos con algún parentesco (De Clercq *et al.* 1998).

El procedimiento seguido para calcular parámetros de la tabla de vida permitió obtener estimativos para otras variables diferentes a la fecundidad y que correspondieron a longevidad, tiempo generacional (T_g) y tiempo de duplicación de la población original (D_i).

La prueba t mostró diferencias significativas para el tiempo de duplicación de la población original, pero no evidenció diferencias para el tiempo generacional y longevidad de la hembra, en las generaciones evaluadas (Tabla 2). De acuerdo con los parámetros estimados *D. pusillus* en una primera generación requiere 23,0 días para duplicar su población inicial; mientras que el depredador en la generación seis, requiere 20,5

Tabla 2. Parámetros de la tabla de vida estimados para poblaciones del depredador *D. pusillus* mantenidas en laboratorio.

Variable	Generación uno	Generación seis
Tiempo generacional (T_g)	35,20 NS	36,62 NS
Tiempo de duplicación (D_i)	23,0 *	20,05 *
Longevidad de la hembra (días)	82,50 NS	79,80 NS

* Valores significativamente diferentes al nivel del 5%. Ns valores no significativos según la prueba de *t* de Student.

días (Tabla 2). Es probable que *D. pusillus* trate de remediar la reducción en la fecundidad con la disminución en el tiempo necesario para duplicar la población original. La variable longevidad en las hembras de *D. pusillus* fue de 82,5 días para hembras en la primera generación. Para hembras de la sexta generación la longevidad de la hembra fue de 79,8 días en promedio (Tabla 2).

De los parámetros estimados, el tiempo de duplicación de la población inicial (D_i) fue el único que se vio afectado por las crías sucesivas en laboratorio. Posiblemente existe una relación directa entre (D_i) con los parámetros de fecundidad tasa neta reproductiva (R_0), tiempo de fecundidad, tasa de crecimiento reproductivo (G_{RR}) y tasa de oviposición hembra/día, los cuales fueron significativamente diferentes en las dos generaciones evaluadas (Tabla 1). Como lo muestran los datos, la cría sucesiva del depredador en laboratorio reduce algunos componentes de fecundidad por lo que se debe determinar la generación a partir de la cual se reduce de manera significativa la fecundidad para introducir poblaciones del depredador en campo.

Algunas investigaciones han mostrado la efectividad de la cría continuada de insectos en laboratorio. Cohen y colaboradores (1999), demostraron casos de crías continuadas de insectos en laboratorio por más de 25 años. Se cita el ejemplo del insecto depredador *Geocorys punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) depredador generalista con el cual se ha mantenido una cría continuada por más de 150 generaciones y la colonia se ha llevado por cerca de 15 años en laboratorio. Para que esta colonia se estabilizara en el tiempo, fue necesario realizar una selección de individuos que permitiera obtener aquellos con capacidades de sobrevivencia en laboratorio. Una vez superado este paso, la colonia del depredador se ha mantenido.

Al analizar la proporción de individuos vivos de *D. pusillus* durante su tiempo de vida, los resultados mostraron una reducción significativa desde los estados iniciales de desarrollo del insecto; la disminución en la sobrevivencia fue más acelerada en individuos de la sexta generación del depredador respecto a aquellos obtenidos en la primera generación (Fig. 2).

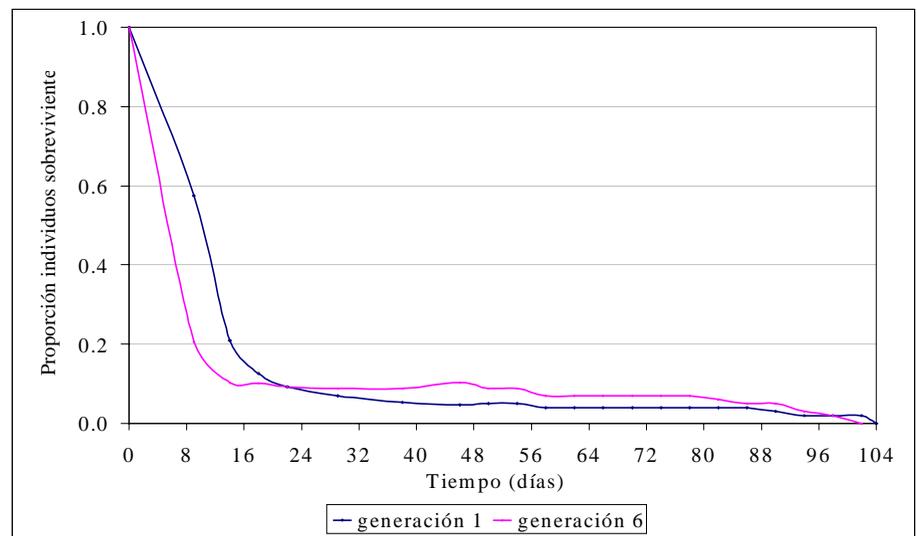


Figura 2. Curvas de sobrevivencia para dos generaciones de *Delphastus pusillus* (Le Conte) mantenidas en laboratorio.

En la primera generación se observó una reducción en la proporción de individuos vivos al pasar de 1,0 a 0,13 desde el día cero hasta el día 18 de puesto el huevo. Después del día 18 y hasta el día 104 la probabilidad de individuos vivos presentó disminuciones mínimas con 0,13 individuos vivos al día 18, con 0,09 individuos vivos al día 22, con 0,05 al día 54, con 0,04 al día 86 y con 0,02 sobrevivientes al día 102 (Fig. 2). Igual tendencia se observó con individuos de la generación seis, aunque la reducción en la probabilidad de sobrevivientes fue más acelerada al inicio del tiempo de vida de los individuos. En los primeros 14 días, la probabilidad de vida del depredador se redujo de 1,0 a 0,10. Después del día 14 y hasta el día 54, la probabilidad de vida del depredador se redujo de 0,1 a 0,09 individuos vivos. Desde el día 54 al día 78 la probabilidad de vida se redujo de 0,09 a 0,07. A partir de esta fecha la probabilidad de vida se redujo hasta ser cero al último día de vida del adulto.

Los resultados de sobrevivencia de los diferentes estados de *D. pusillus*, mostraron una reducción importante durante los primeros días de vida del depredador. Este período coincidió con los estados de huevo y larva1. Individuos del depredador en una primera generación tienen mayor probabilidad de sobrevivir en los primeros estados de desarrollo del insecto comparado con aquellos de una sexta generación. Individuos de la primera generación tuvieron una probabilidad de vida de 0,21 al día 14; mientras que individuos de una sexta generación tuvieron una probabilidad de vida de 0,10.

La reducción de la sobrevivencia en los primeros días de vida de *D. pusillus*, se debió a la cantidad de huevos que no fueron fertilizados. Otro factor de mortalidad observado en el estado de huevo se debió en menor grado a huevos depredados por larvas del mismo depredador. Cuando ocurrieron oviposiciones en grupo, las larvas que primero emergieron tuvieron la posibilidad de consumir huevos de su especie.

En el estado de larval las causas de mortalidad observadas fueron intrínsecas y extrínsecas. Aquellas larvas que no tienen alimento en su vecindad salen en búsqueda de presas. Si en el transcurso de 20 a 30 minutos la larva no encuentra alimento, muere. En estos casos la característica de la hoja juega un factor esencial. En el caso de folíolos con gran cantidad de tricomas se interfiere el proceso de búsqueda y encuentro de presas por el depredador ya que se dificulta el

contacto entre depredador y presa. Estudios para determinar el efecto de la cantidad de tricomas presentes en la superficie de la hoja sobre el comportamiento reproductivo y alimenticio de *D. pusillus*, han demostrado que el depredador presenta mayor fecundidad y consumo de ninfas de mosca blanca cuando la hoja posee baja cantidad de tricomas (Heinz *et al.* 1994).

Aquellos individuos que superaron los estados mencionados tuvieron mayor probabilidad de vida, lo que se evidenció con la estabilidad de las curvas de sobrevivencia (Fig. 2). Después del día 22 de vida y hasta la muerte del último adulto al día 104, individuos de la primera generación presentaron menor probabilidad de vida respecto a la probabilidad observada en individuos de la sexta generación. Este resultado se tradujo en una menor sobrevivencia de los estados de larva2, larva3, larva4, pupa y adulto para individuos de la primera generación.

De acuerdo con los principales tipos de curvas de sobrevivencia propuestos en la literatura *D. pusillus* asemeja una curva tipo IV, (Fig. 3). Una curva de sobrevivencia tipo IV se caracteriza por que la mortalidad natural afecta fundamentalmente a los individuos jóvenes de la población.

Cuando se han superado las etapas juveniles, la mortalidad natural se reduce en forma considerable y la sobrevivencia de los individuos de la población se estabiliza (Rabinovich 1980; Southwood

1978). En condiciones de cría se hace necesario suministrar suficiente alimento y de buena calidad nutricional al depredador en los primeros instares larvales y facilitar la consecución de presas sanas para la larva recién emergida con el fin de incrementar la probabilidad de sobrevivencia de estos estados.

Al comparar los parámetros estimados para el depredador *D. pusillus* con los registros obtenidos para otros insectos entomófagos se puede tener una idea del comportamiento del enemigo natural sobre la especie hospedera/presa. Se compararon los parámetros de población de *D. pusillus* con los registrados en la literatura para los insectos *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) y *Eretmocerus californicus* (Hymenoptera: Aphelinidae), respectivamente un insecto depredador y un insecto parasitoide (Cocuzza *et al.* 1997; López y Botto 1997). Los parámetros tasa intrínseca de crecimiento r_m , tasa finita de crecimiento λ y tiempo generacional T_g fueron menores para el depredador en estudio *D. pusillus* respecto a los enemigos naturales mencionados. Para las variables longevidad, tasa reproductiva de crecimiento (G_{RR}), tiempo de duplicación (D_t) y tasa neta reproductiva R_0 , *D. pusillus* presentó valores mayores comparado con *O. laevigatus* (Tabla 3).

Como lo muestran los parámetros estimados y presentados en la Tabla 3, insectos depredadores como *D. pusillus* presentan valores de R_0 , r_m y λ bajos com-

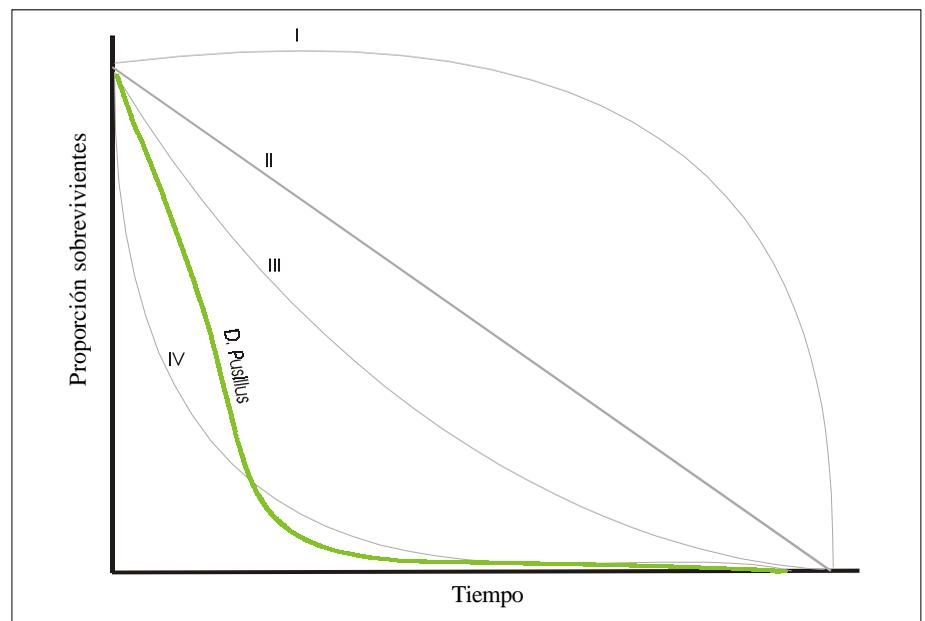


Figura 3. Curva de sobrevivencia obtenida para dos generaciones de *Delphastus pusillus* (Le Conte) y curvas de sobrevivencia propuestas por Rabinovich (1980) (I-IV).

Tabla 3. Comparación de los parámetros estimados para el depredador *D. pusillus* y los estimados para otros insectos benéficos.

Especie benéfica	Especie presa / hospedero	Parámetro de la población						
		R_0	r_m	λ	T_g	D_i	G_{RR}	Longevidad (días)
<i>D. pusillus</i> (Gen. 1)	<i>T. vaporariorum</i>	5,51	0,03	1,03	35,20	23,0	185,30	82,50
<i>D. pusillus</i> (Gen 6)	<i>T. vaporariorum</i>	3,17	0,03	1,03	36,62	20,05	84,20	79,80
<i>Orius laevigatus</i> ¹	<i>F. occidentalis</i>	2,86	0,105	1,11	28,2	6,60	67,80	29,20
<i>E. californicus</i> ²	<i>T. vaporariorum</i>	100,8	0,195		23,7			12,8

¹Tomado de Cocuzza *et al.* (1997) ²Tomado de López y Botto (1997)

parados con los observados por insectos parasitoides, caso específico *E. californicus*. Estos resultados se explican en el hecho que los parámetros mencionados se fundamentan en la producción de hembras hijas por unidad de tiempo o por generación. Los insectos depredadores requieren del consumo de una cierta cantidad de presas para poder alcanzar su estado adulto y así producir, de acuerdo a la proporción de sexos, una hembra (Hassell 1980).

El hecho de requerir más de una presa para desarrollarse, incrementa el riesgo de mortalidad del depredador en los diferentes estados inmaduros. El efecto biocontrolador de los depredadores se fundamenta en el hecho que tanto larvas como adultos del depredador requieren consumir más de una presa para cumplir con sus funciones vitales. En el caso de la larva para completar su ciclo de vida, mientras que el adulto lo utiliza para funciones reproductivas. Caso contrario ocurre en los parasitoides, donde la relación parasitoide/huesped es por lo menos 1:1, es decir por cada huesped parasitado se asegura el alimento al inmaduro y la formación de mínimo un adulto (Hassell 1980).

Conclusiones

De los resultados obtenidos en los diferentes experimentos se puede concluir que:

- Los primeros estados de desarrollo de *Delphastus pusillus* (Le Conte) son los más sensibles a los factores de mortalidad natural. Cuando se superan dichos estados la mortalidad de la población tiende a equilibrarse.
- Características intrínsecas del depredador reflejadas por los valores similares de r_m y λ en las dos generaciones evaluadas permiten proponer la cría continuada en laboratorio del depredador.
- Hembras de una primera generación respecto a hembras de una sexta generación hacen un mayor aporte a la población de hembras hijas.

- La ubicación de posturas por la hembra de *D. pusillus* en áreas con disponibilidad de presas sanas, incrementa la probabilidad de sobrevivencia de las larvas recién emergidas.

Literatura citada

- BELLOWS JR TS, VAN DRISCHE RG, ELKINTON JS 1992. Life-Table construction and analysis in the evaluation of natural enemies. Annual Review of Entomology. 37: 587-614.
- COCUZZA GE; DE CLERQ P; LIZZIO S; VAN DE VIÈRE M; TIRRY L; DE-GHEELE D; VACANTE V. 1997. Life tables and predation activity of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* at three constant temperatures. Entomologia Experimentalis et Applicata. 85: 189-197.
- COHEN C.A.; NORDLUND D; SMITH R. 1999. Mass rearing of entomophagous insects and predaceous mites: are the bottlenecks biological, engineering, economic, or cultural? Biocontrol, news and information. 20 (3): 85-90.
- DE CLERQ P; VANDEWALLE M-; L. TIRRY. 1998. Impact of inbreeding on performance of the predator *Podisus maculiventris*. Biocontrol. Netherlands. 43, 299-310.
- GERLING D. 2000. Whiteflies revisited. XXI international congress of entomology. Abstract book. Brazil. August 20 -26. pp. 64-67.
- HASSELL M.P. 1980. The Dynamics of Competition and Predation. Department of Zoology and Applied Entomology. Imperial College of Science and Technology. Study in Biology No. 72, 68.
- HEINZ K.; BRAZZLE J.; PICKETT CH.; NATWICK E.; NELSON J.; PARRELLA M. 1994. Predatory Beetle may suppress silverleaf whitefly. California Agriculture. (United States) 48 (2): 35-41.
- JERVIS M. A.; COPLAND M. J. 1996. The life cycle. Insect Natural enemies. Practical approaches to their study. ED. Chapman and Hall, 63-160.
- LÓPEZ-ÁVILA A.; CARDONA MEJÍA C.; GARCÍA GONZÁLEZ 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.
- LÓPEZ S.N.; BOTTO N.E. 1997. Biology of South American population of *Eretmocerus* sp. (Hymenoptera: Aphelinidae) attacking the greenhouse whitefly. Biological control. 9 (1): 1-5.
- MAIA A.; LUIZ A.; CLAYTON C. 2000. Statistical inference on associated fertility table parameters using Jackknife technique: computational aspects. Journal of Economic Entomology. 93 (2): 511-518.
- NEUBERT M.; CASWELL H. 2000. Demography and dispersal: Calculation and sensitivity analysis of invasion speed for structured populations. Ecology 8 (16): 1613-1628.
- QUINTERO C.; RENDÓN F.; GARCÍA J.; CARDONA C.; LÓPEZ-ÁVILA A.; HERNÁNDEZ P. 1999. Especies y biotipos de moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en cultivos semestrales de Colombia y Ecuador. Revista Colombiana de Entomología. 27 (1-2): 27-32.
- RABINOVICH J. E. 1980. Introducción a la ecología de poblaciones animales. Capítulo 5. Editorial CECSA. Caracas (Venezuela), 313.
- RENDÓN F.; GARCÍA J.; VALERAZO O.; CARDONA C.; LÓPEZ-ÁVILA A.; BUENO J.; RAMÍREZ J. 1999. La problemática de las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en cultivos anuales en el trópico alto, valles interandinos y costas de Colombia y Ecuador: 1. Caracterización y diagnóstico general. Resúmenes XXVI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Santa fe de Bogotá (Colombia), 78.
- RODRÍGUEZ DEL BOSQUE, L. 1994. Teorías y bases ecológicas del control biológico. Memorias V curso de control biológico. Instituto tecnológico agropecuario Oaxaca. México, 6-15.
- SAS INSTITUTE 1999. Sas Language. Reference. Versión 8. Sas institute. Cary NC
- SOUTHWOOD T.R. 1978. Ecological Methods with particular reference to the study of insect population. Ed. Chapman and Hall. London.

Fenología, distribución espacial y desarrollo de métodos de muestreo para *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) en habichuela y fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Phenology, spatial distribution and development of sampling methods for *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) on snap beans and beans (*Phaseolus vulgaris* L.)

JUAN MIGUEL BUENO¹, CÉSAR CARDONA¹, PATRICIA CHACÓN²

Resumen. *Trialeurodes vaporariorum* es una plaga de importancia económica y de muy difícil manejo en habichuela y fríjol en Colombia. Para conocer la distribución del insecto en la planta y el sitio de preferencia de alimentación de los inmaduros y adultos, así como para cuantificar un umbral de acción preestablecido por el CIAT y desarrollar métodos de muestreo, se hicieron seis ensayos de campo en la zona de Pradera (Valle). Tanto en habichuela como en fríjol, los adultos colonizan y ovipositan las hojas jóvenes, luego migran dentro de la planta a niveles superiores (estratos) a medida que aumenta la edad del cultivo, mientras que las ninfas y pupas se encontraron en estratos inferiores. Las poblaciones del insecto se ven afectadas por las precipitaciones. Se encontró un patrón de distribución agregado en las hojas para todos los estados de *T. vaporariorum* en los cultivos de habichuela y fríjol. Para ninfas, se calculó un tamaño de muestra de 50 folíolos tomados al azar en hojas de estratos inferiores. Los patrones de muestreo recomendados son en forma de M o en forma de Z, con los cuales se recorren bien los bordes. Se desarrolló un plan de muestreo secuencial para ninfas de primer instar en habichuela basado en un umbral de acción de 12 ninfas/2.25cm² por folíolo.

Palabras clave: Mosca blanca. Dinámica de población. Muestreo secuencial. Tamaño de muestra.

Summary. *Trialeurodes vaporariorum* is one of the most important and difficult to control pests of snap beans and dry beans in Colombia. To understand the distribution of the insect on the plant and the preferred feeding sites of immatures and adults, to quantify an action threshold previously established by CIAT, and to develop sampling methods, six trials were conducted in the field in the area of Pradera (Valle). In both snap beans and dry beans, adults colonize and oviposit on the young leaves, then migrate within the plant to the upper levels (strata) as the crop ages, while the nymphs and pupae are found on lower plant strata. Populations of the insect are affected by rainfall. A pattern of clumped distribution on the leaves was found for all stages of *T. vaporariorum* on snap beans and dry beans. For nymphs, a sample size of 50 leaflets taken at random on lower strata leaves was calculated. The recommended sampling patterns are in the form of an "M" or "Z" that encompass the borders. A sequential sampling plan was developed for first instar nymphs on snap beans based on an action threshold of 12 nymphs/2.25cm² per leaflet.

Key words: Whitefly. Population dynamics. Sequential sampling. Sample size.

Introducción

En el mundo se han identificado cerca de 1200 especies de moscas blancas, principalmente por medio de características morfológicas basadas en diferencias en el cuarto ínstar o pupa (Bink-Moenen y Mound 1990), dentro de estas se encuentra la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae). Esta especie tiene una distribución cosmopolita y es polífaga con más de cien plantas hospedantes registradas (Byrne *et al.* 1990). Otra de las moscas blancas más impor-

tantes es la mosca blanca de la batata *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), reconocida como una de las más relevantes en algodón y otros cultivos en Arizona y el sur de California (Naranjo y Flint 1994). Actualmente, esta mosca blanca ha sido más estudiada que *T. vaporariorum* con relación a su distribución espacial, dinámica de población y métodos de muestreo. Cardona (1995), menciona que en 1984 la mosca blanca de los invernaderos *T. vaporariorum* hizo su aparición en la Zona Andina como plaga importante de fríjol y otros cultivos; la respuesta inmediata de los agriculto-

res fue la utilización masiva de insecticidas como única alternativa de control. El excesivo uso de agroquímicos, posiblemente en combinación con otros factores ambientales favorables entre 1987 y 1991, originó una explosión masiva de las poblaciones del insecto (Cardona 1995).

En el Valle del Cauca, *T. vaporariorum* ha sido reportada como plaga principal en cultivos de solanáceas (tomate, tabaco, berenjena y pimentón), cucurbitáceas (zapallo y pepino), crucíferas (repollo y col), cilantro, geranio y leguminosas

1 Autores para correspondencia: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. A.A. 6713. Cali. Autor para correspondencia: j.bueno@cgiar.org. Teléfono: 4450000 ext. 3382. Fax: 4450073

2 Universidad del Valle, Cali. pchacon@uniweb.net.co

como fríjol arveja y habichuela, en un rango de altitud de 828 hasta 2040 metros sobre el nivel del mar, lo cual evidencia su marcada polifagia y capacidad de adaptación biológica (Rodríguez y Cardona 2001). Las poblaciones de este insecto han venido incrementándose a medida que aumenta el área sembrada en hortalizas en el Valle del Cauca. La mosca blanca, asociada con *Thrips palmi* Karny, puede ocasionar pérdidas cercanas al 44.5% en habichuela (Rendón *et al.* 2001), además de incrementar los costos de producción por el uso excesivo de plaguicidas utilizados para su control (Cardona *et al.* 1991).

La mosca blanca es un insecto con metamorfosis incompleta (hemimetábolo); su ciclo de vida incluye huevo, cuatro instares ninfales y adulto (Gerling 1992). Los huevos son depositados individualmente o en grupos en el envés de las hojas superiores. Los huevos pueden ser puestos por hembras fecundadas produciéndose machos y hembras; igualmente pueden ser puestos por hembras vírgenes (con partenogénesis del tipo arrenotoquia) donde sólo se obtienen machos (Louise 1975). La ninfa efectúa tres mudas del exoesqueleto. Cuando el adulto emerge, deja un orificio en forma de "T" en la exuvia. Generalmente la relación de los sexos es 1:1 (Vet *et al.* 1980).

De la Cruz y colaboradores (1990) estudiaron el ciclo de vida de *T. vaporariorum* en condiciones de laboratorio en fríjol. Encontraron que la duración en días de cada fase del ciclo de vida fue la siguiente: huevo (5.74 ± 2.16), primer instar (2.60 ± 2.16), segundo instar (3.10 ± 1.10), tercer instar (3.00 ± 1.27), cuarto instar (4.25 ± 1.47) y pupa (3.74 ± 1.99). Las hembras de *T. vaporariorum* tienen una longevidad de 5 a 28 días, según las condiciones ambientales en que se encuentre la cría (Vet *et al.* 1980). La fecundidad promedio por hembra a 19°C sobre ICA Pijao fue de 127 huevos en 36 días (Manzano *et al.* 2000). La temperatura del medio y la planta hospedera ejercen una gran influencia en el tiempo de desarrollo de la mosca blanca. A temperaturas constantes entre 15 – 25°C, el desarrollo de los estados de *T. vaporariorum* no se ve afectado (Gerling 1990).

El tamaño de los cambios en las poblaciones de los insectos es el resultado de nacimientos, muertes y migraciones. Si estos procesos y los factores que influyen en la dinámica de población de un insecto plaga pudieran ser predichos, sería posible diseñar estrategias de manejo de

plagas en los cultivos y proporcionaría un avance en la advertencia de epidemias (Lewis 1997).

La distribución espacial de los organismos es una característica biológica importante para muchos ecólogos; las tres formas de distribución son al azar, uniforme o agregada (Ricklefs 1998). Entender los patrones de agregación de los organismos ha sido una tarea recurrente de la ecología de poblaciones y por lo tanto, se han propuesto diferentes modelos matemáticos para describir las distribuciones espaciales (Tonhasca *et al.* 1994).

Uno de los métodos para determinar la distribución espacial es el de la Ley de Poder de Taylor, en donde el valor de b de la regresión entre el logaritmo de la media de adultos por folíolo y el logaritmo de la varianza de adultos por folíolo pueden considerarse como una medida de agregación (Pedigo y Zeiss 1996). En consecuencia, si se obtiene una pendiente menor a 1, se entiende que el insecto está disperso uniformemente; si es igual a 1, indica dispersión al azar y si la pendiente es mayor que 1, indica agregación.

En cultivos ornamentales como poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) y crisantemo (*Chrysanthemum indicum*), se encontró que los valores de b fueron significativamente mayores que uno (rango entre 1.5 – 2.5) para todos los estados de las dos especies de mosca blanca estudiadas (*B. tabaci* y *T. vaporariorum*), indicando que estos insectos se encuentran de forma agregada (Liu *et al.* 1993). En tomate bajo invernadero, el conteo de adultos de *T. vaporariorum* en trampas amarillas con pegante, indicó una distribución agregada cuando estos conteos fueron analizados usando la Ley de Poder de Taylor (Jong-Kwan *et al.* 2001).

La determinación de los patrones de distribución en un hospedero en particular es un requisito fundamental para desarrollar una técnica eficiente de muestreo de las poblaciones (Lynch y Simmons 1993).

Liu *et al.* (1993) observaron que en Crisantemo y Poinsettia, la mayoría de adultos, huevos y primeros instares ninfales de *T. vaporariorum* son encontrados en las hojas jóvenes de los estratos superiores y en menor cantidad en las hojas totalmente abiertas. Las ninfas de segundo y tercer instar están en las hojas más desarrolladas, totalmente abiertas, menos tiernas, al igual que la mayoría de pupas. El porcentaje de cada estado varía de-

pendiendo del número de hojas de la planta.

En Poinsettia se encontró que, para *B. tabaci* y *T. vaporariorum*, la unidad de muestreo puede reducirse a una revisión en el envés de las hojas de los estratos superiores y medio, obteniendo así un estimado para poblaciones dentro de la planta (Liu *et al.* 1993).

Para estimar poblaciones de insectos, se deben seleccionar unidades de muestreo. El número de unidades de muestra tomadas en un programa es usualmente el resultado de un arreglo entre la precisión, la destreza y el costo (Pedigo 1999). Cuando el patrón de distribución de una plaga es agregado, se necesitan más muestras que cuando el insecto plaga está distribuido uniformemente en el cultivo (Xu Rumei 1982).

Una herramienta de uso potencial en programas de manejo integrado de plagas es el muestreo secuencial o programa de decisión secuencial. Cada programa está basado en un patrón de dispersión del insecto y en niveles económicos de decisión, permitiendo dar acomodo a las poblaciones en una, dos o más categorías (Pedigo 1999). Con el muestreo secuencial, el número total de muestras a ser tomadas en el campo es variable. Usando una gráfica, se puede empezar a muestrear y continuar hasta que la población pueda ser clasificada (Pedigo 1999) como de riesgo o no para tomar decisiones de control.

Dada la importancia económica del insecto y la necesidad de desarrollar planes de manejo para reducir su impacto económico, se hicieron siembras de habichuela y fríjol en las cuales se trató de conocer cómo se desarrollaban las poblaciones de huevos, ninfas y adultos de *T. vaporariorum* en condiciones naturales de infestación para de esta manera poder definir un método de muestreo. Se describió el daño ocasionado por el insecto a través del período vegetativo y reproductivo del cultivo, sus patrones de dispersión espacial, y se calculó el tamaño óptimo de muestra. También se desarrolló un plan de muestreo secuencial en habichuela para ninfas y se identificaron las mejores formas de muestreo en campo.

Materiales y métodos

Los ensayos se hicieron bajo condiciones de infestación natural de *T. vaporariorum* en la vereda la Floresta, Municipio de Pradera, Departamento del Valle del Cauca, a una altitud de 980 msnm, con una temperatura promedio de

23°C y 72% de HR. Se sembraron seis ensayos (tres en cada cultivo). Los dos primeros de cada cultivo se hicieron para identificar la forma de dispersión del insecto, establecer un tamaño de muestra y conocer la fluctuación de población de los diferentes estados del insecto en los cultivos de habichuela y fríjol. Cada cultivo se dividió en ocho cuadrantes imaginarios, tal como lo sugieren Pedigo y Zeiss (1996), siendo cada uno de ellos, una repetición para efectos de muestreo. Con la segunda siembra, se logró determinar el mejor método de muestreo en cada cultivo y las dos siembras restantes fueron hechas para cuantificar el umbral de acción de mosca blanca y así, con el tamaño de muestra, lograr establecer un modelo de muestreo secuencial.

Se usó la variedad de habichuela "Lago Azul" por ser la preferida por los agricultores de la zona y la variedad de fríjol "ICA Pijao" por adaptarse bien al medio y ser tolerante a enfermedades. Las distancias de siembra (0.7 m entre surcos dobles y 0.45 m entre surcos sencillos para habichuela y 0.5 m entre surcos y 0.2m entre plantas, para fríjol) y las prácticas agronómicas, fueron iguales a las utilizadas por los agricultores de la zona. No se usaron insecticidas, pero se controlaron las enfermedades mediante la aplicación frecuente de fungicidas.

Los recuentos de población se hicieron semanalmente hasta cuando el cultivo llegó al estado de soca. En habichuela, las poblaciones de adultos y huevos empezaron a contarse a los 7 días después de siembra (DDS), etapa V₁ (cotiledones abiertos). Las ninfas se contaron a partir de los 14 DDS, etapa V₂ (primer trifolio abierto), mientras que las pupas se contaron a partir de los 35 DDS. Los conteos se hicieron en los cotiledones y en el envés de cada folíolo central de cada estrato (unidad de muestreo). Los adultos se registraron por medio de observaciones directas en campo y los estados inmaduros fueron contados en el laboratorio bajo el estereoscopio para diferenciar entre huevos, ninfas y pupas en un área estándar preestablecida de 2.25 cm². La planta se dividió en cuatro estratos, por lo que el número de muestras tomadas fue de diez folíolos centrales por estrato y por cuadrante.

En fríjol, las evaluaciones también fueron semanales, comenzando el conteo de adultos a los 8 DDS (Etapa V₁), de ninfas a los 17DDS (Etapa V₂) y de pupas, a los 32 DDS. El número de muestras tomadas fue de diez folíolos centrales por estrato

y por cuadrante. Adicionalmente, para cada cultivo, se hizo un muestreo total que consistió en coleccionar cuatro plantas completas para registrar los diferentes estados de desarrollo del insecto en cada folíolo de la planta.

Para el análisis estadístico, los datos de recuentos de insectos obtenidos en campo se transformaron a $\log_{10}(x + 1)$. Para hacer el análisis de varianza se tomó la planta como parcela principal y los estratos como subparcelas. Para conocer el sitio de mayor ocurrencia de cada estado del insecto, se hizo separación de medias por DMS al 5%. Se calculó el índice de dispersión del insecto por medio de dos métodos estadísticos; el primero, utilizando la ley de poder de Taylor que relaciona mediante una regresión el logaritmo de la varianza y el logaritmo de la media. Se interpreta el valor de b como índice de agregación así; si $b > 1$ el índice de dispersión es agregado, si $b = 1$, la dispersión es al azar, y si $b < 1$ los datos se ajustan a un patrón de dispersión uniforme. El segundo método utiliza el programa ENSTAT (Pedigo y Zeiss 1996) para estimar el ajuste de la distribución observada a diferentes tipos de distribución teórica tales como binomial negativa.

El tamaño de muestra se calculó para diferentes márgenes de error utilizando la fórmula citada por Bartels et al. (1997) en la cual se incluyen valores a y b obtenidos en la regresión lineal: $n = (100/c)^2 t^2 a x^{b-2}$. En esta fórmula, n es el número de muestras a tomar; c es el margen de error admitido y t es el valor aproximado de la distribución de t . El plan de muestreo secuencial se calculó utilizando el programa ENSTAT, al igual que los valores obtenidos en la regresión lineal y en el programa de índice de dispersión de ENSTAT.

En la segunda siembra de cada cultivo, se utilizó un tamaño de muestra obtenido con el 15% de margen de error calculado con la fórmula de Bartels et al. (1997). Semanalmente se registraron las poblaciones de ninfas en cuatro formas de muestreo; Z, X, zigzag y M; se calculó la variación relativa (VR), la precisión relativa neta (PRN), el coeficiente de variación (CV) y el tiempo que demora en hacerse cada método de muestreo y así definir la mejor forma de muestreo.

Se hizo una tercera siembra de habichuela y fríjol para cuantificar el número promedio de individuos existentes por folíolo cuando se utiliza el umbral de acción determinado por CIAT para el con-

trol de la mosca blanca (Cardona et al. 1993). Para esto se dispusieron cuatro tratamientos en un diseño de cuadrado latino 4 x 4. En todos los ensayos, cuando cada tratamiento llegó a un nivel de infestación predeterminado, se hizo control químico con imidacloprid a la dosis de 0.21 kg i.a. por ha. Los niveles de infestación, a los cuales se hicieron aplicaciones foliares, fueron:

- Aplicación de control cuando la mitad de los folíolos presentaran entre el 15% al 30% del área foliar ocupada por ninfas de primer ínstar
- Aplicación de control cuando la mitad de los folíolos presentaran entre el 30% al 50% del área foliar ocupada por ninfas de primer ínstar
- Aplicación de control cuando la mitad de los folíolos presentaran más del 60% del área foliar por ninfas de primer ínstar
- Testigo absoluto (no control)

Para ejercer un control oportuno en cada uno de los niveles de infestación predeterminados, se hicieron recuentos de población desde la aparición de las hojas primarias hasta cosecha, con intervalos de tres días. Las ninfas de *T. vaporariorum* se contaron en el estereoscopio en un área de 2.25 cm² en cada folíolo de estratos inferiores y medios de doce plantas escogidas al azar por parcela, con el fin poder cuantificar el número de ninfas que correspondía a cada porcentaje de infestación. Este porcentaje se determinó así: si la mitad de los folíolos presentaba un porcentaje igual o superior al tratamiento asignado, se hacía una aplicación. Se tomaron los rendimientos (estimados en kilogramos por hectárea) en los surcos centrales de cada parcela y éstos se sometieron a análisis de varianza con el programa SAS (1989). Se registraron los gastos incurridos, para obtener los costos de producción de la habichuela y el fríjol, así como su precio por kilogramo. Se hizo la regresión lineal del tipo $y = a + bx$ entre niveles de infestación y rendimientos con el programa Statistix (1998), lo que permitió calcular la función de daño y las pérdidas a cada nivel en términos de producción y porcentaje por los métodos de Schwartz y Klassen (1981).

Con estos valores se procedió a calcular el umbral de acción (U.A.) empleando la fórmula sugerida por Mumford y Norton (1987).

$$U.A. = \frac{C}{P \times b \times EF}$$

donde:

C = Costo total del control del insecto (\$/ha)

P = Precio de la habichuela (\$/kg)

b = Función de daño [pérdida en rendimientos (kg/ha/ninfa/2.25cm²/folíolo), asociada con la densidad de población del insecto]

EF = Eficiencia del control (%)

Resultados y discusión

Fluctuación de poblaciones. En habichuela el recuento de poblaciones de adultos y huevos se inició a los 7 DDS (etapa V₂). A los 29 DDS ocurrió la mayor incidencia de adultos (Fig. 1). Esto se reflejó en un alto volumen de oviposición, posiblemente porque la precipitación disminuyó. Siete días después (a los 14 DDS) de la colonización de los adultos, se registraron las ninfas de primer instar provenientes de la primera oviposición. A los 21 DDS (etapa V₃), cuando la primera y segunda hoja trifoliada estaban totalmente abiertas y apareció la tercera hoja, la población de ninfas comenzó a incrementarse, sobre todo en las hojas cotiledonales. Las altas precipitaciones en los primeros 23 DDS pudieron ocasionar una disminución en la tasa de colonización de adultos y en consecuencia, reducción en la oviposición y en la emergencia de ninfas (Fig. 1).

En fríjol, el primer recuento de poblaciones se hizo a los 8 DDS (etapa V₂). En la Figura 1 se observa que a los 15 DDS se registró la mayor incidencia de adultos de *T. vaporariorum*, los cuales ovipositaron el mayor número de huevos. La fuerte lluvia disminuyó el número de adultos encontrados en campo y pudo posiblemente desprender gran cantidad de huevos, lo que ocasionó un descenso en la futura población, confirmando que el clima, en especial las precipitaciones, juegan un papel importante en las tasas de natalidad y mortalidad de las poblaciones de mosca blanca. El recuento de ninfas empezó a los 21 DDS, cuando los trifolios primarios estaban totalmente abiertos (Fig. 1). En los dos cultivos ocurrió un descenso en las poblaciones al finalizar el ciclo del cultivo a causa de la migración de los adultos a nuevos hospederos.

Distribución en la planta. Para conocer la distribución de los diferentes estados de desarrollo de la mosca blanca en los cuatro estratos de la planta, se hizo un análisis de separación de medias, encontrándose que en habichuela, las poblaciones de adultos

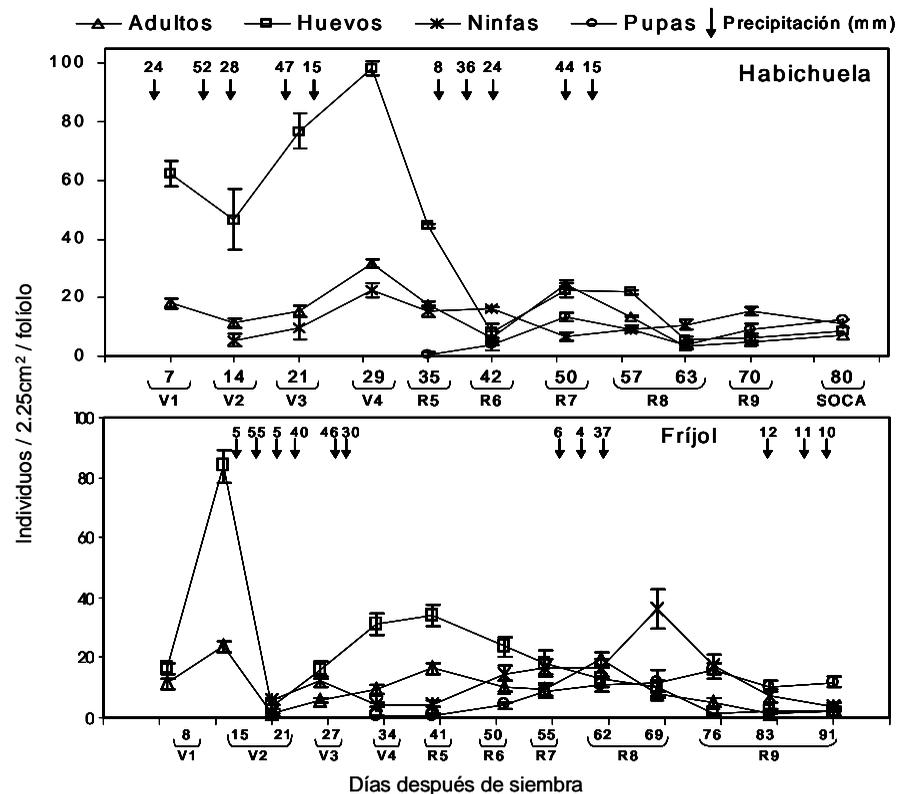


Figura 1. Fluctuación de poblaciones (media \pm error estándar) de adultos, huevos, ninfas y pupas de *Trialeurodes vaporariorum* registradas durante el ciclo de cultivo en habichuela (arriba) y fríjol (abajo). V₁, V₂, R₆, etc. se refieren a los diferentes estados de desarrollo de la planta en sus fases vegetativa (V) y reproductiva (R).

fueron significativamente mayores en las hojas de los estratos superiores a través del ciclo del cultivo (Tabla 1). Se observó que los huevos se hallaron en el mismo sitio que los adultos, como consecuencia del patrón de colonización y de oviposición de éstos sobre tejidos jóvenes para asegurar el alimento a su descendencia. La población de ninfas en cambio, fue significativamente mayor en los estratos inferiores (1 y 2) (Tabla 1) hasta los 50 DDS, etapa R₇. En las etapas siguientes, las ninfas aparecieron con mayor frecuencia en el estrato tres a los 57 DDS y en el estrato cuatro a los 63 DDS. Esto se explica por el incremento previo en la oviposición en esta parte de la planta. El número de pupas registradas fue significativamente mayor en el estrato 1 a través del ciclo de desarrollo de la planta hasta los 70 DDS época para la cual la población fue uniforme a través de los cuatro estratos (Tabla 1).

En fríjol, los datos obtenidos en campo se analizaron por el método estadístico de prueba de *t* para detectar diferencias entre los dos estratos en que fue posible dividir la planta. Las poblaciones de adultos y huevos fueron significativamente mayores en los estratos superiores (Tabla 2) a través del ciclo del cultivo. Estas pobla-

ciones disminuyeron a partir de los 69 DDS a causa del daño presentado en las hojas por la fumagina y la madurez fisiológica de la planta. La población de ninfas en el estrato inferior fue significativamente mayor, pues estas hojas fueron preferidas por el insecto para ovipositar en las primeras edades del cultivo. Después de los 55 DDS (inicio de llenado de vainas), las ninfas se encontraron en mayor número en el estrato 2, sitio en el cual ocurrieron las últimas oviposiciones. A los 34 DDS (apertura de la tercera hoja trifoliada), aparecieron las primeras poblaciones de pupas, que fueron significativamente mayores en el estrato inferior hasta los 69 DDS, fecha en la cual la población de pupas fue significativamente mayor en el estrato superior hasta los 91 DDS (cosecha).

Distribución espacial. Para conocer cómo se encontraban distribuidos espacialmente los diferentes estados de desarrollo del insecto, se utilizaron dos métodos estadísticos: la Ley de Poder de Taylor y la prueba de bondad de ajuste a una distribución Binomial Negativa. En las regresiones obtenidas por el primer método, se observó que la pendiente *b* en la mayoría de las evaluaciones fue mayor que 1, lo que permite decir que todos los estados de

Tabla 1. Análisis de separación de medias de poblaciones de adultos, huevos, ninfas y pupas de *Trialeurodes vaporariorum* encontradas en diferentes estratos de la planta de habichuela a través del ciclo de cultivo. El estrato 1 corresponde al nivel inferior; estrato 2, nivel inferior-medio; estrato 3, nivel superior-medio; estrato 4, nivel superior.

Estado	Estrato	Días después de siembra									
		7	14	21	29	35	42	50	57	63	70
Adultos	1	18.5	11.4	15.3	15.7 b ¹	4.9 c	2.8 c	8.6 c	4.1 c	1.1 d	0.7 d
	2				47.7 a	13.8 b	3.9 b	6.5 c	3.5 c	1.7 c	2.5 c
	3					35.1 a	11.7 a	14.9 b	7.2 b	4.0 b	10.3 a
	4						6.5 b	67.8 a	39.8 a	6.2 a	5.4 b
Huevos	1	62.3	46.7	76.9	42.3 b	33.1 b	0.9 c	0.00 d	0.04 d	0.0 c	0.09 c
	2				154.3 a	63.9 a	17.7 a	4.1 c	1.9 c	0.3 c	4.3 b
	3					36.2 b	8.8 b	31.7 b	29.5 b	3.6 b	2.3 b
	4						5.0 c	54.1 a	56.4 a	19.6 a	17.9 a
Ninfas	1		5.5	9.4	45.0 a	39.8 a	51.8 a	11.8 a	3.4 c	0.7 c	1.8 d
	2				0.01 b	6.3 b	12.9 b	14.9 a	10.4 b	5.8 b	10.6 c
	3					0.0 b	0.0 c	0.3 b	18.9 a	19.7 a	11.9 b
	4						0.0 c	0.04 b	4.3 c	16.6 a	37.6 a
Pupas	1					1.9 a	16.1 a	36.2 a	21.5 a	5.9 a	5.0 a
	2					0.0 b	0.0 b	0.3 b	1.6 b	3.9 b	10.7 a
	3					0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.9 c	10.9 a
	4						0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 c	7.0 a

¹ Para cada estado, los promedios seguidos por la misma letra dentro de cada columna no difieren significativamente al nivel del 5% (pruebas de DMS).

Tabla 2. Análisis de separación de medias de poblaciones de adultos, huevos, ninfas y pupas de *Trialeurodes vaporariorum* encontradas en diferentes estratos de la planta de fríjol a través del ciclo de cultivo. El estrato 1 corresponde al nivel inferior; el estrato 2 al nivel superior

Estado	Estrato	Días después de siembra												
		8	15	21	27	34	41	50	55	62	69	76	83	91
Adultos	1	11.5	23.9	1.15	0.4 b ¹	1.3 b	0.7 b	0.4 b	1.1 b	2.5 b	1.5 b	0.4 b	0.05 b	0.3 b
	2				10.9 a	17.6 a	32 a	2.6 a	17.5 a	37.3 a	14.1 a	9.8 a	3.5 a	4.5 a
Huevos	1	16.4	83.9	3.8	1.2 b	1.8 b	1.2 b	0.8 b	0.6 b	0.03 b	0.0 b	0.0 b	0.01 b	0.0 b
	2				30.4 a	60.3 a	67.2 a	46.4 a	35.9 a	26.4 a	19.8 a	2.4 a	4.6 a	4.4 a
Ninfas	1			5.5	18.8 a	8.3 a	6.4 a	22.5 a	18.2 a	2.2 b	0.4 b	0.2 b	0.03 b	0.0 b
	2				5.2 b	0 b	2.8 b	6.8 b	15.3 a	30.5 a	71.6 a	34.8 a	14.6 a	6.8 a
Pupas	1					0.75 a	1.4 a	6.7 a	11.5 a	8.7 a	11.6 a	1.5 b	0.2 b	0.0 b
	2					0.0 b	0.01 b	0.0 b	0.03 b	0.13 b	1.8 b	15.4 a	10.5 a	2.1 a

¹ Para cada estado, los promedios seguidos por la misma letra dentro de cada columna no difieren significativamente al nivel del 5% (pruebas de t).

desarrollo del insecto estuvieron distribuidos de forma agregada durante casi todo el período de desarrollo del cultivo. Para esta sección solo detallamos los resultados de adultos y ninfas en habichuela y fríjol. En la Tabla 3 se observa que en el cultivo de habichuela los adultos en campo se distribuyen de forma agrupada ($b > 1$). Al interpretar el cálculo de las frecuencias, se confirma lo encontrado, ya que éstas se ajustan a una distribución binomial negativa, es decir, a un patrón de agregación. Para evaluar la población de ninfas, se cálculo la regresión entre el logaritmo de la media y el logaritmo de la varianza y se encontró que los datos tomados en campo mostraron una distribución agregada debido a que los valores de la pendiente (b) fueron mayores que 1. Al confirmar la información con la ayuda del programa ENSTAT, se encontró que en el cultivo de habichuela, las poblaciones de ninfas de *T. vaporariorum* se ajustaron a una frecuencia de distribución binomial negativa o agregada (Tabla 4).

Tabla 3. Índices de dispersión obtenidos a través de regresión lineal y pruebas de bondad de ajuste a una distribución binomial negativa para poblaciones de adultos de *Trialeurodes vaporariorum* en épocas críticas de crecimiento del cultivo de habichuela. b = pendiente; X^2 = chi cuadrado calculado; Gl = grados de libertad

Estrato	Regresión lineal			Distribución binomial negativa		
	DDS ¹	b	Interpretación	X^2	Gl	Interpretación
1	14	2.42**	Agregado	23.2 ^{NS}	28	Agregado
1	21	2.63**	Agregado	71.6**	35	
1	35	2.10**	Agregado	25.9 ^{NS}	15	Agregado
3	35	1.40**	Agregado	65.7 ^{NS}	46	Agregado
2	50	1.98**	Agregado	22.5 ^{NS}	18	Agregado
3	50	1.14**	Agregado	53.0 ^{NS}	33	Agregado
1	57	1.85**	Agregado	10.8 ^{NS}	13	Agregado
2	57	1.39**	Agregado	5.6 ^{NS}	11	Agregado
3	57	1.63**	Agregado	48.9**	19	
4	57	1.41**	Agregado	124.1**	56	
1	70	1.52**	Agregado	6.0 ^{NS}	4	Agregado
2	70	1.47**	Agregado	10.5 ^{NS}	10	Agregado
3	70	2.11**	Agregado	27.1 ^{NS}	15	Agregado
4	70	2.05**	Agregado	44.5**	15	

¹ Épocas críticas del cultivo: 14-21 días, desarrollo vegetativo; 35 días, floración; 50-57 días, formación y llenado de vainas; 70 días, final de cosecha. ^{NS}, no significativo; *, significativo al 5%; **, significativo al 1%.

Tabla 4. Índices de dispersión obtenidos a través de regresión lineal y pruebas de bondad de ajuste a una distribución binomial negativa para poblaciones de ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* en épocas críticas de crecimiento del cultivo de habichuela. *b* = pendiente; X^2 = chi cuadrado calculado; GI = grados de libertad

Estrato	Regresión lineal			Distribución binomial negativa		
	DDS ¹	<i>b</i>	Interpretación	X^2	GI	Interpretación
1	14	1.70**	Agregado	13.6 ^{NS}	18	Agregado
1	21	1.52**	Agregado	13.9 ^{NS}	21	Agregado
1	35	1.65**	Agregado	44.5 ^{NS}	28	Agregado
2	42	0.99**	Al azar	27.7 ^{NS}	18	Agregado
1	50	0.93 ^{NS}	Al azar	36.3 ^{NS}	25	Agregado
2	50	1.59**	Agregado	27.1 ^{NS}	25	Agregado
1	57	1.57**	Agregado	13.5 ^{NS}	12	Agregado
2	57	2.08**	Agregado	18.1 ^{NS}	20	Agregado
3	57	1.62**	Agregado	17.4 ^{NS}	16	Agregado
4	57	1.79**	Agregado	4.4 ^{NS}	6	Agregado
1	70	1.66**	Agregado	9.8 ^{NS}	7	Agregado
2	70	1.82**	Agregado	25.4 ^{NS}	18	Agregado
3	70	1.77**	Agregado	32.4 ^{NS}	21	Agregado
4	70	1.01*	Agregado	39.0 ^{NS}	36	Agregado

¹ Épocas críticas del cultivo: 14-21 días, desarrollo vegetativo; 35 días, floración; 50-57 días, formación y llenado de vainas; 70 días, final de cosecha NS, no significativo; *, significativo al 5%; **, significativo al 1%.

En fríjol, como en habichuela, los adultos se distribuyeron en forma agregada (Tabla 5). En esta regresión, se encontró que todos los valores de la pendiente fueron mayores que 1. Cuando se interpretaron los patrones de dispersión por medio del cálculo de frecuencias con la ayuda del programa ENSTAT; se observó que los datos se ajustaron a una distribución binomial negativa, lo cual indica la agregación de los adultos dentro de cada estrato de la planta de fríjol. Las ninfas mostraron similar dispersión que los estadios anteriores. Cuando se confirmó la información con la interpretación de los patrones de dispersión por medio de las frecuencias, se observó que la población de ninfas se ajustó a una frecuencia de distribución binomial negativa (Tabla 6). A los 62 DDS, algunas de las frecuencias no se ajustaron a esta distribución. Esto posiblemente se debió a una oviposición no agregada que condujo al desarrollo de una población dispersa de ninfas.

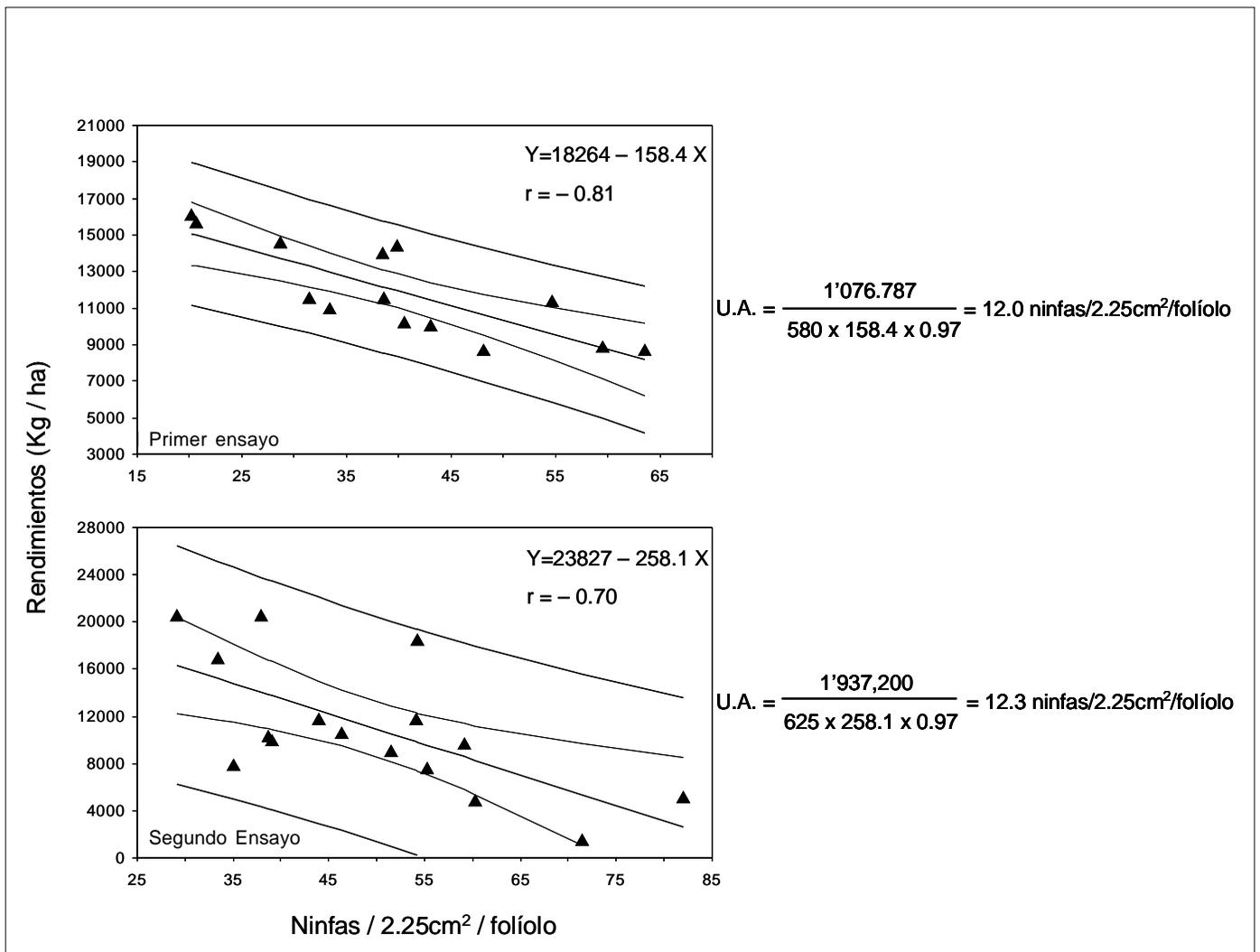


Figura 2. Relación entre los niveles de infestación de ninfas de primer instar de *Trialeurodes vaporariorum* y los rendimientos de habichuela. Intervalos de confianza al 95%. Cálculo del umbral de acción en dos ensayos.

Tabla 5. Índices de dispersión obtenidos a través de regresión lineal y pruebas de bondad de ajuste a una distribución binomial negativa para poblaciones de adultos de *Trialeurodes vaporariorum* en épocas críticas de crecimiento del cultivo de fríjol. *b* = pendiente; χ^2 = chi cuadrado calculado; Gl = grados de libertad

Estrato	Regresión lineal			Distribución binomial negativa		
	DDS ¹	<i>b</i>	Interpretación	χ^2	Gl	Interpretación
1	15	2.94*	Agregado	31.3 ^{NS}	44	Agregado
1	21	1.25**	Agregado	1.2 ^{NS}	4	Agregado
1	34	1.66**	Agregado	3.5 ^{NS}	7	Agregado
2	41	1.66 ^{NS}	Agregado	60.5 ^{NS}	43	Agregado
1	55	1.61**	Agregado	6.0 ^{NS}	5	Agregado
1	62	1.72**	Agregado	6.7 ^{NS}	10	Agregado
1	76	1.68**	Agregado	3.0 ^{NS}	2	Agregado
2	76	2.28**	Agregado	15.3 ^{NS}	17	Agregado
1	91	1.75**	Agregado	0.1 ^{NS}	3	Agregado
2	91	2.64**	Agregado	33.5 ^{NS}	16	Agregado

¹ Épocas críticas del cultivo: 15-21 días, desarrollo vegetativo; 34 días, floración; 41-55 días, formación de vainas; 62-76 días, llenado de vainas; 91 días, cosecha. NS, no significativo; *, significativo al 5%; **, significativo al 1%.

Tabla 6. Índices de dispersión obtenidos a través de regresión lineal y pruebas de bondad de ajuste a una distribución binomial negativa para poblaciones de ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* en épocas críticas de crecimiento del cultivo de fríjol. *b* = pendiente; χ^2 = chi cuadrado calculado; Gl = grados de libertad.

Estrato	Regresión lineal			Distribución binomial negativa		
	DDS ¹	<i>b</i>	Interpretación	χ^2	Gl	Interpretación
1	21	2.28**	Agregado	15.6 ^{NS}	18	Agregado
2	27	1.85**	Agregado	9.9 ^{NS}	5	Agregado
1	34	2.35**	Agregado	27.5 ^{NS}	23	Agregado
1	41	2.58**	Agregado	18.7 ^{NS}	17	Agregado
2	41	1.95**	Agregado	21.7 ^{NS}	9	Agregado
1	55	1.63**	Agregado	22.5 ^{NS}	24	Agregado
2	55	1.89**	Agregado	20.4 ^{NS}	17	Agregado
1	62	1.92**	Agregado	17.2 ^{NS}	7	Agregado
1	76	1.57 ^{NS}	Agregado	0.6 ^{NS}	1	Agregado
2	91	1.88**	Agregado	7.24*	7	Agregado

¹ Épocas críticas del cultivo: 21-27 días, desarrollo vegetativo; 34 días, floración; 41-55 días, formación de vainas; 62-76 días, llenado de vainas; 91 días, cosecha. NS, no significativo; *, significativo al 5%; **, significativo al 1%.

Refinamiento del umbral de acción.

Para poder desarrollar sistemas de muestreo secuencial en los dos cultivos, primero se cuantificó el umbral de acción desarrollado por Cardona *et al.* (1993). A través de dos ensayos en habichuela, se encontraron las equivalencias promedio entre la estimación visual del porcentaje de área cubierta por ninfas de primer instar y el número promedio de ninfas de primer instar presentes a través del ciclo del cultivo (Tabla 7).

En los dos ensayos, la relación entre infestación y rendimiento fue inversa (Fig. 2). Se calcularon las regresiones ($Y = 18264 - 158.4X$; $r = -0.81$) y ($Y = 23827 - 258.1X$; $r = -0.70$). Al comparar estadísticamente las pendientes (*b*) de las regresiones, se encontró que no hubo diferencia significativa entre ellas ($P = 0.29$). El umbral de acción

(población a la cual hay que ejercer control de la mosca blanca) calculado mediante la fórmula que involucra el valor *b* de las regresiones, se mantuvo alrededor de 12 ninfas/2.25cm²/folíolo, a pesar de que la función de daño (*b*) aumentó como consecuencia en el incremento de la población, el costo de la habichuela varió y el costo para ejercer control sobre el insecto se incrementó. Este número de 12 ninfas/2.25cm²/folíolo equivale a tener la mitad de las muestras tomadas con el 15% al 30% del área foliar ocupada con ninfas de primer instar (Tabla 7).

En cuanto a fríjol, se intentó cuantificar el promedio de individuos por folíolos e incorporar el umbral a un sistema de muestreo secuencial para tomar medidas de control de una manera más fácil. A diferencia de lo observado en habichuela, los rendimien-

Tabla 7. Equivalencia entre la estimación visual del porcentaje de área ocupada y el número de ninfas de primer instar (N1) presentes en un área de 2.25 cm² de folíolo (promedios de dos ensayos)

Estimación visual del área ocupada por N1	Número de ninfas N1 por 2.25 cm ²
15 % - 30 %	33.0
30 % - 50 %	46.3
> 60 %	48.5
Testigo	56.7

tos obtenidos en cada ensayo no guardaron proporción con los diferentes niveles de infestación resultantes del control ejercido a los niveles preestablecidos para cada tratamiento. Ninguna de las dos regresiones fue significativa ($P > 0.2$ y $P > 0.3$). En consecuencia, se puede decir que a diferentes niveles de infestación, el insecto no causó pérdidas económicas significativas. Por esta razón, no se pudo calcular una clara función de daño y por consiguiente, no se debe calcular un umbral de acción. Con este resultado, no se puede desarrollar un plan de muestreo secuencial, debido a que para este cálculo, una condición es tener un valor límite, que para nuestro caso sería el umbral de acción.

Tamaño de muestra y muestreo secuencial.

Se determinó un tamaño de muestra para ninfas, tanto para habichuela como para fríjol, de 50 folíolos en promedio por ha, calculado a partir de los parámetros *a* y *b* obtenidos en la regresión cuando se utilizó la Ley de Poder de Taylor para determinar los índices de dispersión de ninfas. La Figura 3 se interpreta de la siguiente forma: si en habichuela se desea encontrar 12 ninfas por folíolo, es necesario tomar 100 muestras con un margen de error del 10%, 50 con un margen de error del 15% y 20 con un margen de error del 20%. En fríjol, si se desea encontrar 45 ninfas, es necesario tomar 90 muestras con un margen de error del 10%, 40 con un margen de error del 15% ó 20 con un error permitido del 20% (Fig. 3).

Se desarrolló un plan de muestreo secuencial en habichuela. Se ilustra para dos etapas críticas del cultivo (Fig. 4). El sistema permite clasificar las poblaciones de ninfas de *T. vaporariorum* con respecto al umbral de acción y determinar así si causan daño y por lo tanto, se hace necesario o no realizar un tratamiento de control. En la Figura 4 las "líneas de decisión" que dividen las dos categorías no son muy anchas y si las poblaciones caen en esta zona, es necesario continuar muestreando hasta que se puedan ubicar las poblaciones de ninfas en una de las dos categorías.

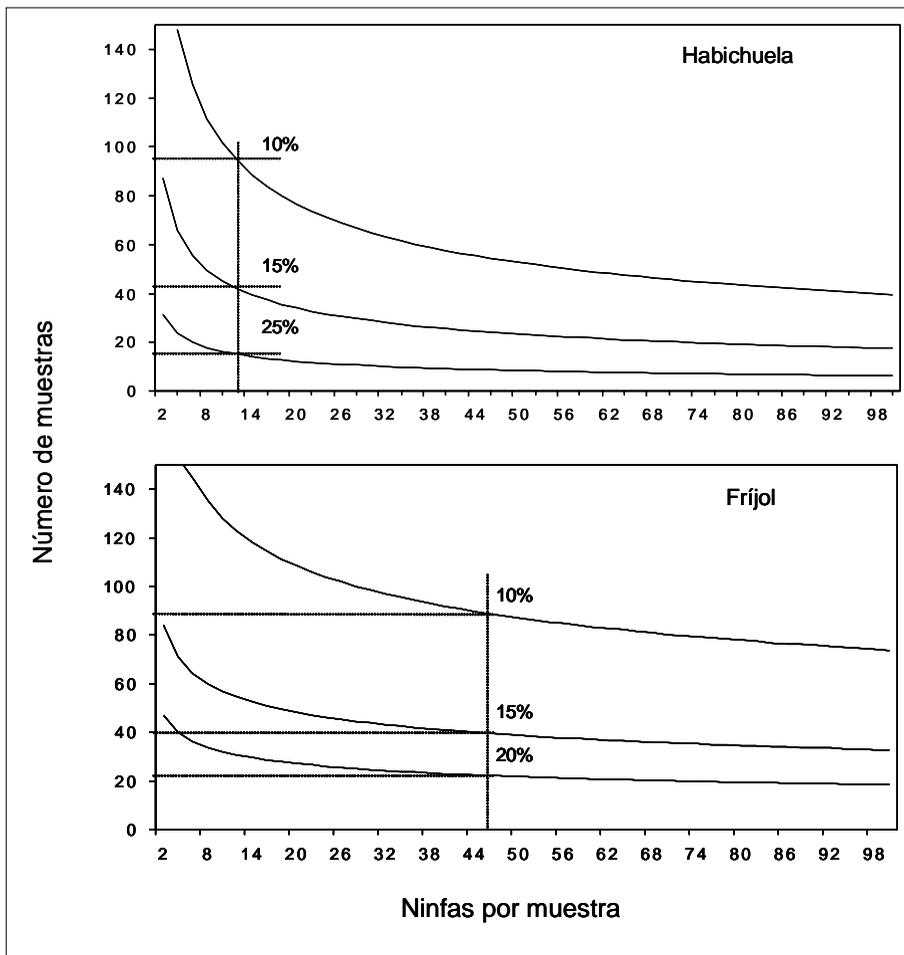


Figura 3. Tamaños de muestra para ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* a diferentes márgenes de error (10, 15 y 20%) en habichuela y fríjol.

Por ejemplo (Fig. 4), si en 34 muestras colectadas el número acumulado de ninfas es de 40, el cultivo no necesita ser aplicado. Por el contrario, si con el mismo número de muestras, el acumulado es de 120 ninfas, se debe ejercer una medida de control de inmediato.

No se encontraron diferencias entre formas de muestreo en ninguno de los parámetros estadísticos en los dos cultivos (Tabla 8). Como la mayoría de insectos plaga, *T. vaporariorum* coloniza por los bordes y luego se dispersa a todo el lote; se recomienda recorrer el lote en forma de M al inicio del cultivo y en forma de X después de 19 DDS, para tener un registro confiable de las poblaciones.

El daño ocasionado en habichuela y fríjol es de tipo mecánico. Además, ocasiona daños indirectos como la fumagina, este daño se proyecta a las vainas, disminuyendo su calidad para el comercio. En ambos cultivos, los adultos y los huevos fueron encontrados en los estratos superiores mientras que las ninfas y pupas se concentran en los estratos inferiores de la planta. Nuestros resultados muestran que, tanto en habichuela como en fríjol, todos los estados de desarrollo del insecto se distribuyen de forma agregada a través del periodo del cultivo. Esto influye en la determinación de los tamaños de muestra y en la escogencia de métodos recomendados para el recuento de poblaciones.

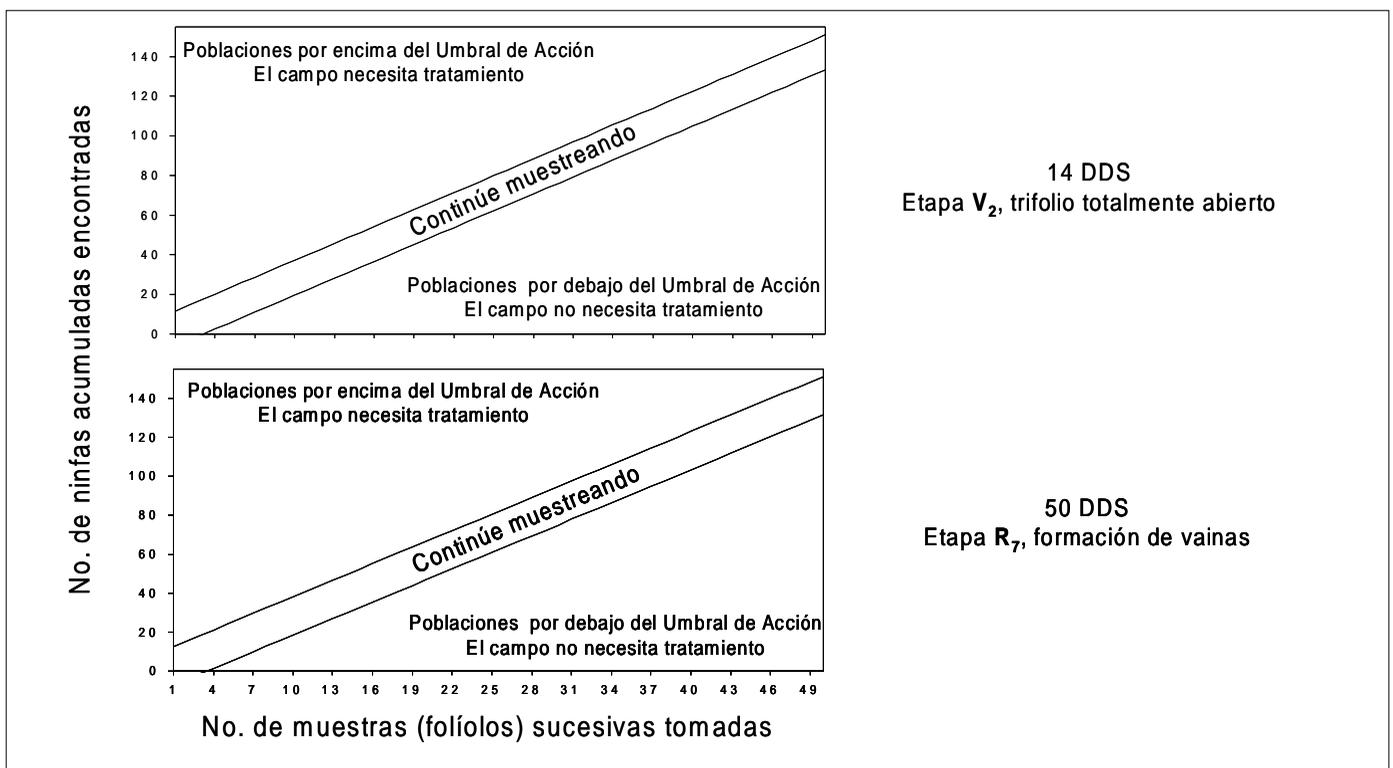


Figura 4. Muestreo secuencial para ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* para dos etapas del cultivo de habichuela.

Tabla 8. Parámetros estadísticos para seleccionar un método de muestreo para monitorear ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* en habichuela y fríjol

Método	Coeficiente de Variación		Variación Relativa		Precisión Relativa Neta		Tiempo (min.)	
	Habichuela	Fríjol	Habichuela	Fríjol	Habichuela	Fríjol	Habichuela	Fríjol
Zigzag	10.8	12.03	17.59	22.40	6.11	5.07	16.4	23.4
M	11.3	12.14	19.10	22.14	5.55	4.62	15.2	24.3
X	11.4	11.45	19.72	19.92	5.54	5.41	14.5	22.6
Z	11.0	12.03	18.46	22.95	5.80	4.87	14.4	22.0

Literatura citada

- BARTELS, D.; HUTCHISON, W.; UDAYAGIRI, S. 1997. Pheromone trap monitoring of Z - strain European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): optimum pheromone blend, comparison with blacklight traps and trap number requirements. *Journal of Economic Entomology* 90 (2): 449-457.
- BINK-MOENEN, R. M.; MOUND, L. A. 1990. Whiteflies: Diversity biosystematics and evolutionary patterns. pp. 1-12. In: *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management*. D. Gerling (ed). Intercept, Ltd., Andover, Hants, UK.
- BYRNE, D. N.; BELLOWES, T.S.; PARRELLA, M.P. 1990. Whiteflies in agricultural systems. pp. 227-251. In: *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management* (D. Gerling, ed.). Intercept, Ltd., Andover, Hants, UK.
- CARDONA, C. 1995. Manejo de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en fríjol en la zona Andina: Aspectos técnicos, actitudes del agricultor y transferencia de tecnología. *Revista CEIBA* 36 (1): 53-65.
- CARDONA, C.; PRADA, P.; RODRÍGUEZ, A.; ASHBY, J., QUIRÓS, C. 1991. Bases para establecer un programa de manejo integrado de plagas de habichuela en la provincia de Sumapaz (Colombia). ICA-CRECED Sumapaz-Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIA. Cali. 76 p. (Documento de Trabajo No. 86).
- CARDONA, C.; RODRÍGUEZ, A.; PRADA, P. 1993. Umbral de acción para el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), en habichuela. *Revista Colombiana de Entomología* 19 (1): 27-33.
- DE LA CRUZ, A.; CARDONA, C.; RAMÍREZ, D. 1990. Descripción de estados inmaduros y cría de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). Documento Interno. Programa de Entomología de Fríjol CIAT. 25p.
- GERLING, D. (Ed) 1990. *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management*. Intercept Ltd., Andover, UK. 348 pp.
- GERLING, D. 1992. Approaches to the biological control of whiteflies. *Florida Entomologist* 75 (4): 446-456.
- JONG-KWAN, K.; JUNG-JOON, P.; HEUNG-SUN, P.; KIHONG, CH. 2001. Unbiased estimation of greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, mean density using yellow sticky trap in cherry tomato greenhouses. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 100: 235-243.
- LEWIS, T. 1997. *Thrips as Crop Pests*. CAB International. Wallingford, UK 740 p.
- LIU, T.; OETTING, R.D.; BUNTIN, D. 1993. Distribution of *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on some greenhouse - grown ornamental plants. *Journal of Economic Entomology* 28 (1): 102-112.
- LOUISE, R. 1975. Whiteflies on beans in the western hemisphere. Workshop on Bean Production CIAT. 22 p. December 1 -3. Cali, Colombia.
- LYNCH, R.E.; SIMMONS, A.V. 1993. Distribution of immature and monitoring of adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), in peanut, *Arachis hypogaea*. *Environmental Entomology* 22 (2): 375-380.
- MANZANO, M.R.; CARDONA, C.; LANTEREN, J.C. 2000. Intrinsic rate of population increase of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) at different temperatures and relative humidities on two bean cultivars. pp 51-68. In: *Evaluation of *Amitus fuscipennis* as biological control agent of *Trialeurodes vaporariorum* on bean in Colombia*. Doctoral thesis. Wageningen University.
- MUMFORD, D.J.; NORTON, G.H. 1987. Economics of integrated pest control. pp. 191-200. In: Teng, P.S. (Ed.). *Crop Loss Assessment Methods and Pest Management*. A.P.S. Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S.A. 191-200.
- NARANJO, S. AND FLINT, H.M. 1994. Spatial distribution of preimaginal *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in cotton and development of fixed precision sequential sampling plans. *Environmental Entomology* 23 (2): 254-266.
- PEDIGO, L. 1999. *Entomology and Pest Management*. Third edition. Iowa State University. pp. 209-251.
- PEDIGO, L.P.; ZEISS, M.R. 1996. *Analyses in Insect Ecology and Management*. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 168 p.
- RENDÓN, F.; CARDONA, C.; BUENO, J. 2001. Pérdidas causadas por *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) y *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) en habichuela en el Valle del Cauca. *Revista Colombiana de Entomología* 27 (1-2): 34-43.
- RICKLEFS, R. E. 1998. Invitación a la ecología; economía de la naturaleza. Invitación a la Ecología. 4ª edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 692 p.
- 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.
- SAS Institute. 1989. *SAS/STAT User's guide version 6*. 4th Ed. Vol. 2 SAS Institute, Cary, N.C. 846 p.
- SCHWARTZ, P.H.; KLASSEN, W. 1981. Estimate of losses caused by insect and mites to agricultural crops. pp. 15-77. En: Pimentel, D. (Ed). *CRC Handbook of pest management in Agriculture*. Vol. 1 CRC Press, Inc. Boca Ratón FA., U.S.A.
- STATISTIXS. 1998. *Analytical Software. Statistix for Windows. User's manual*. 333 p.
- TONHASCA, A.; PALUMBO, J.; BYRNE, D. 1994. Aggregation patterns of *Bemisia tabaci* in response to insecticide applications. *Entomología Experimentalis et Applicata* 72: 265-272.
- VET, L.; VAN LENTEREN, J.C.; WOETS, J. 1980. The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* (Hym: Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Hom: Aleyrodidae). *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie* 90: 26-51.
- XU RUMEI, 1982. Population dynamics of *Trialeurodes vaporariorum* (greenhouse whitefly): some comments on sampling techniques and prediction of population developments. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*. Vol. 94 (4) Nov/82. 452-465.

Mortalidad de larvas de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en frutos de feijoa (*Acca sellowiana* [O. Berg] Burret) sometidos a un tratamiento cuarentenario de frío

Larval mortality of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) in fruits of pineapple guava (*Acca sellowiana* [O. Berg] Burret) during a cold quarantine treatment

J. KATERINE VALDERRAMA¹, MIGUEL S. SERRANO², GERHARD FISCHER³

Resumen La mosca suramericana de la fruta *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) es una plaga cuarentenaria de la feijoa. Frutas infestadas artificialmente se sometieron al tratamiento “t107-a” (1,1° C durante 15 días) exigido por USDA- APHIS para su exportación y se compararon con frutos almacenados a temperatura ambiente. Cada fruto se infestó con cuatro larvas de tercer instar, en dos tratamientos con 50 repeticiones. Se evaluó diariamente la longitud, el volumen corporal, el comportamiento, la mortalidad y cambios de coloración de las larvas, en una muestra de tres frutos. El primer comportamiento observable de las larvas bajo tratamiento cuarentenario fue el intento de abandonar el fruto. No se observó ninguna variación en la longitud o el volumen corporal de las larvas bajo frío. En el control a temperatura ambiente, las larvas aumentaron de volumen hasta la muda a pupa. El tratamiento en frío modificó el desarrollo larval y la muda larva-pupa. El 100% de las larvas murieron ocho días después de estar sometidas al tratamiento de frío. La mayoría de las larvas murieron en un estado intermedio de la muda y presentaron una coloración oscura o “muda parcial”. Bajo el tratamiento cuarentenario el daño a la pulpa no superó el 24%, mientras en el testigo alcanzó el 74%. Este es el primer tratamiento cuarentenario probado para esta plaga en feijoas en Colombia y mostró control total. El cumplimiento de los requisitos cuarentenarios de USDA-APHIS abren el mercado internacional para exportadores colombianos de feijoa.

Palabras Clave: Mosca de la Fruta. Cuarentena. Exportación.

Summary. The South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) is a quarantine pest of pineapple guava. Artificially infested fruits were subjected to cold treatment “t107a” (1.1° C for 15 d), required by USDA-APHIS for exportation and were compared to control fruits maintained at room temperature. Four third-instar larvae were infested per individual fruit in two treatments with 50 replicates. Body length, volume, behavior, mortality and color changes of the larvae were recorded daily in a sample of three fruits. The first behavioral change observed in larvae under cold quarantine treatment was an attempt to abandon the fruits. No variation in body length or volume was observed under the cold quarantine treatment. In the untreated control, larvae increased body volume up to the final molt to pupa. The cold quarantine treatment affected larval development and the larva-pupa molt. All larvae died on the eighth day of cold treatment. Most larvae died while molting to pupa and exhibited a dark coloration or “partial molt”. Under the cold quarantine treatment, damage to fruits did not exceed 24% where as in the untreated control it reached 74%. This is the first cold quarantine treatment tested for this pest of pineapple guavas in Colombia and it provided total control. Compliance with the quarantine requirements of USDA-APHIS opens the international market for Colombian exporters of pineapple guava.

Key words: Fruit fly. Quarantine. Exportation.

Introducción

La feijoa, *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret, es una especie frutícola que por sus características organolépticas y nutricionales tiene buena aceptación en los mercados nacionales e internacionales. En Colombia, se ha aumentado el área de cultivo de la feijoa en los últimos 10 años, como una alternativa viable para la diversificación de la producción agrícola-

la (Corporación Colombia Internacional 2000). Entre las plagas limitantes de este cultivo se encuentran las moscas de la fruta, que incluyen especies de gran importancia económica, no solo por ocasionar daño directo a la fruta sino también por las restricciones cuarentenarias que implican para el comercio internacional (Benavides y Mora 2003). La exportación de feijoa desde Colombia se ve afectada por la presencia de *Anastrepha*

fraterculus (Wiedemann), *Anastrepha* spp. y *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae (Flórez 2003). Las moscas de la fruta son la mayor plaga hortifrutícola y probablemente el principal grupo de plagas cuarentenarias en el mundo (Hallman 1997). Los riesgos de extender estas plagas hacia otros países, y el creciente volumen de productos que se exportan en fresco, hacen necesario el estudio de los riesgos y medidas de miti-

1 Autor para correspondencia: Ingeniera Agrónoma, Investigador programa MIP, Bayer CropScience S.A. Bogotá D. C. katerine.valderrama@bayercropscience.com, kvalderrama1@yahoo.com

2 Entomólogo, Cía. Agrícola Colombiana, Bogotá D. C. miguel.serrano@monsanto.com

3 Profesor Asociado, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. gfischer@unal.edu.co

gación que se podrían emplear para facilitar el comercio. Para prevenir la introducción inadvertida de especies de mosca de la fruta, las frutas a exportar son sometidas a tratamientos cuarentenarios, transportadas desde áreas certificadas como libres de la plaga o empacadas bajo sistemas que reducen el riesgo de infestación a niveles despreciables (Sharp y Hallman 1994). Los tratamientos cuarentenarios no químicos, propuestos por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA, APHIS), proporcionan una oportunidad a países que buscan participar en el mercado de este país. Sin embargo, es importante que el tratamiento cuarentenario elimine las plagas y que a la vez no afecte la calidad del producto (Hallman 1991). El tratamiento cuarentenario en frío "t 107 a" que exige USDA, APHIS para el control de *A. fraterculus*, consiste en almacenar la fruta a baja temperatura por un largo periodo de tiempo. Las opciones de tiempo y temperatura son: igual o por debajo de 33° F (0,56° C) durante 13 días; 34° F (1,11° C) durante 15 días y 35° F (1,67° C) durante 17 días (USDA 2002).

En este trabajo se analizó el efecto del tratamiento cuarentenario en frío "t 107 a" de USDA, APHIS, simulando condiciones de transporte y comercialización, sobre la mortalidad y parámetros de crecimiento de las larvas de *A. fraterculus* en frutos de feijoa infestados artificialmente.

Materiales y métodos

Áreas infestadas y niveles naturales de infestación

Se efectuó un muestreo general (Ministerio de Agricultura 2000) para determinar las localidades más cultivadas con feijoa y con mayor incidencia de moscas de la fruta en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Con base en esto, se seleccionaron tres localidades para realizar un muestreo dirigido en cada una y determinar los niveles de infestación natural e identificar la especie predominante de mosca de la fruta. En cada localidad se tomaron 350 frutos al azar (total 1050 frutos) en cultivos que presentaran alguna sintomatología externa de daño por mosca de la fruta. Algunos frutos se recogieron del suelo (70%) y otros se tomaron directamente de los árboles (30%). De acuerdo con la metodología establecida por Benavides y Mora (2003) los frutos se disectaron y se contó el total de larvas por fruta. Para la determinación taxonómica se llevaron al laboratorio de entomología de la Univer-

sidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía 100 frutos infestados de cada localidad para establecer una colonia de la cual se obtuvieron adultos. Se utilizó la clave de Korytkowsky (1997) y la confirmación posterior la realizó Francisco González del Centro de Excelencia Fitosanitaria del ICA, IICA y USDA, APHIS (CEF, Bogotá, Colombia).

Tratamiento cuarentenario

El tratamiento cuarentenario en frío se realizó en el laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, en Bogotá, D. C. Se utilizaron cámaras de frío Estefano® Ltda. (Bogotá, Colombia). La temperatura y humedad relativa se ajustaron a $1,0 \pm 0,54^\circ\text{C}$ y $92 \pm 3,2\%$ respectivamente. El registro de la temperatura se llevó a cabo usando registradores automáticos 'testo term 175-T1®' (Frankfurt, Alemania) de un canal de temperatura con sensor interno modelo 0563 1754. Para registrar la temperatura interna de los frutos se usó una sonda para alimentos 'testo IP-65®' de 12 cm (-60 a 400°C), modelo 0602 2292 la cual se insertó en los frutos. Los sensores de temperatura y humedad relativa se ubicaron en los tercios superior, medio y bajo de la cámara de frío. El sensor con la sonda para registro de datos se mantuvo en el tercio central. Los sensores se programaron para almacenar un registro cada 15 minutos durante los 15 días de duración del tratamiento cuarentenario. Los sensores de temperatura fueron calibrados previamente en recipientes limpios con hielo y agua (70 y 30 % respectivamente) de acuerdo al procedimiento establecido por USDA, APHIS (USDA 2002).

Para la infestación artificial de los frutos se utilizaron larvas de tercer instar provenientes de una cría del Laboratorio de Cuarentena Vegetal del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en Ibagué (Tolima) alimentadas en dieta artificial compuesta por torula, benzoato de sodio, agar nutritivo, ácido clorhídrico y agua. Se utilizaron frutos de feijoa del cultivar 'CENAF 41', que se caracteriza por alto rendimiento y excelente aceptación por el consumidor debido a sus características organolépticas (Valderrama 2004). Las frutas fueron seleccionadas y clasificadas con calidad tipo exportación.

De acuerdo con la metodología de Vidal y Abello (1998) se efectuó un corte transversal en la parte superior de cada fruto en forma de "copa" sin separar las dos partes y se retiró aproximadamente un 5%

de pulpa para introducir las larvas. Cada larva de tercer instar se lavó con agua destilada para retirar los residuos de dieta de su cuerpo, con un pincel se colocaron cuatro larvas en la cavidad formada en el fruto y se selló con cinta de enmascarar. Para garantizar que la temperatura se mantuviese dentro de los niveles exigidos al interior de los frutos, se empacaron tres unidades en recipientes de icopor de 16 onzas y se sellaron. Los recipientes con los frutos ubicados en bandejas, se introdujeron en las cámaras de frío para un pre-enfriamiento durante 12 h a 4° C la cual se disminuyó gradualmente hasta que se estabilizó en 1,0° C. Al final de este periodo de pre-enfriamiento se inició el tratamiento cuarentenario propiamente dicho. Luego de los 15 días exigidos por el protocolo del tratamiento cuarentenario, se descargaron los registros de los sensores y se almacenaron en el computador para procesamiento.

Se establecieron dos tratamientos, frutos de feijoa 'CENAF 41' sometidos a frío (1,1° C o por debajo) y frutos del mismo cultivar almacenados a temperatura ambiente ($19,0 \pm 0,8^\circ\text{C}$) con 50 repeticiones por tratamiento en un diseño completamente al azar. Las evaluaciones del desarrollo de las larvas y su mortalidad se realizaron cada 24 h retirando tres frutos por tratamiento de las cámaras de frío; se midió longitud, volumen corporal, cambios de coloración y se cuantificó su mortalidad.

Desarrollo de larvas de *A. fraterculus* durante el tratamiento cuarentenario

Diariamente se retiraron tres frutos de las cámaras de frío, se abrieron y se observó el desarrollo general de las larvas y el daño a la pulpa de la fruta. Se utilizó una escala visual de 0 a 5 con incrementos de 20% de daño por unidad, donde 5 es el 100% de pulpa dañada. Los datos de las 12 observaciones diarias se sometieron a análisis de regresión utilizando el paquete estadístico de Microsoft Excel® versión 2003.

Longitud corporal de larvas

Cada 24 h se tomaron 12 larvas de la cámara de frío y se midieron desde el extremo de los ganchos mandibulares hasta el final del último segmento abdominal (Vélez 1985; Ministerio de agricultura 2000) se utilizó un calibrador digital Stainlees Hardened® ($0,150 \text{ mm} \pm 0,02 \text{ mm}$). Para establecer si el tratamiento cuarentenario afectaba la longitud, se estableció un patrón de longitud de larvas de tercer instar midiendo una mues-

tra de 400 larvas vivas de *A. fraterculus* provenientes de la colonia. Los datos de longitud de larvas en el tratamiento en frío y el control se compararon utilizando la prueba de Chi cuadrado con el paquete estadístico de Microsoft Excel® versión 2003.

Volumen corporal de larvas

Diariamente se retiraron 12 larvas de las frutas de cada tratamiento, se midió el radio del último segmento abdominal y la longitud de cada larva, como se describió antes. Debido a que la morfología de las larvas se asemeja a un cono (Vélez 1985; Núñez 1988; Ministerio de agricultura 2000) para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación (1)

$$V = \pi r^2 \cdot \frac{h}{3} \quad (1)$$

Donde: V = Volumen corporal, r = radio del último segmento abdominal y, h = longitud de la larva. Los datos de las 12 observaciones diarias se sometieron a análisis de regresión utilizando el paquete estadístico de Microsoft Excel® versión 2003.

Mortalidad de larvas sometidas al tratamiento cuarentenario

Se tomó una muestra diaria de tres frutos de cada tratamiento y se contó el número de larvas vivas y muertas, para el control se contaron las larvas que mudaron a pupa y para efectos del análisis se consideraron “muertas” debido a que no realizaron más daño a la pulpa y abandonaron el fruto. Los datos de porcentaje de mortalidad se sometieron a análisis de regresión utilizando el paquete estadístico de Microsoft Excel® versión 2003.

Coloración de larvas

Para establecer si el tratamiento cuarentenario afecta la coloración de las larvas como ha sido registrado en la literatura por Hallman y Zhang (1997), diariamente se registró el color de cada una de las larvas que se retiraron para las mediciones y se comparó contra la tabla de color de la Royal Horticultural Society (RHS) de Londres (2001) que mide los colores en una escala numérica de claridad-oscuridad y una escala de letras para intensidad de color.

Resultados y Discusión

Áreas infestadas y niveles naturales de infestación

La mayor incidencia de especies de mosca de la fruta se encontró en los municipios de Tibasosa (Boyacá) (Ubicado a 7° 03' de latitud Norte y 71° 57' de longitud

occidente y 2538 m.s.n.m), La Vega (ubicado a 3° 42' de latitud Norte y 74° 54' de longitud occidente y 1230 m.s.n.m) y San Francisco (Cundinamarca) (ubicado a 3° 39' de latitud Norte y 74° 49' de longitud occidente y 1190 m.s.n.m). Se encontró un nivel de infestación natural entre 3 y 5 larvas por fruto en los tres estadios, que corresponde a un promedio de $4.0 \pm 1,6$ larvas por fruto. Los frutos tomados del suelo presentaron mayor infestación que los frutos obtenidos directamente de los árboles. De acuerdo con el Ministerio de Agricultura (2000) cuando las hembras buscan el sustrato para ovipositar prefieren frutos que estén entre el 60 y 70% de madurez. Los frutos al caer del árbol aumentan su metabolismo y la producción de volátiles (Galvis 2003) lo que probablemente los hace más atractivos para la oviposición de las hembras. Actualmente, en la literatura no se encuentran registros de niveles de infestación de moscas de la fruta en feijoa en Colombia, por lo cual los datos mencionados constituyen una aproximación a los niveles naturales de infestación y obviamente, son necesarios muestreos más detallados en otras áreas de producción de feijoa en el país.

La especie predominante en los tres municipios fue *A. fraterculus*; sin embargo, se encontraron en menor porcentaje *A. striata* y *A. ornata* (Fig. 1). El género *Anastrepha* está ampliamente distribuido en cultivos de feijoa (Flórez 2003) particularmente en las áreas de clima frío-moderado donde se cultivan varias especies de frutales. Las especies encontradas corresponden a las que registraron Benavides y Mora (2003) para este cultivo.

Tratamiento cuarentenario

La temperatura registrada durante el tratamiento cuarentenario en ningún caso excedió la temperatura permitida ($1,1^{\circ}\text{C}$) el valor máximo fue $1,0^{\circ}\text{C}$, el mínimo de $0,48^{\circ}\text{C}$ y se obtuvo un promedio de $0,8^{\circ}\text{C}$; dentro de los rangos exigidos por APHIS para el tratamiento cuarentenario “t 107a”. De acuerdo con las exigencias de USDA, APHIS un solo registro superior a la temperatura máxima permitida es suficiente para invalidar el tratamiento cuarentenario y no permitir la entrada de un contenedor de fruta a suelo norteamericano.

Desarrollo de larvas de *A. fraterculus* durante el tratamiento cuarentenario

La primera reacción aparente de las larvas sometidas al tratamiento cuarentenario fue abandonar el fruto. Un 50% de las larvas refrigeradas dentro de las frutas a $1,1^{\circ}\text{C}$ durante los primeros tres días se desplazaron y perforaron la corteza del fruto intentando salir. Confrontando lo mencionado por Núñez (1988) las larvas habitualmente migran hacia el interior del fruto; en este caso, el desplazamiento hacia la corteza podría indicar una respuesta al estrés causado por la baja temperatura. Existen diferencias en el porcentaje de pulpa dañada en los frutos entre los dos tratamientos (Fig. 2). El porcentaje de daño ocasionado por larvas de *A. fraterculus* sometidas al tratamiento cuarentenario aumentó levemente a través del tiempo (15 días), llegando a un máximo del 24%. El porcentaje de daño está muy relacionado con el tiempo y el efecto de la temperatura del tratamiento cuarentenario, produciendo una

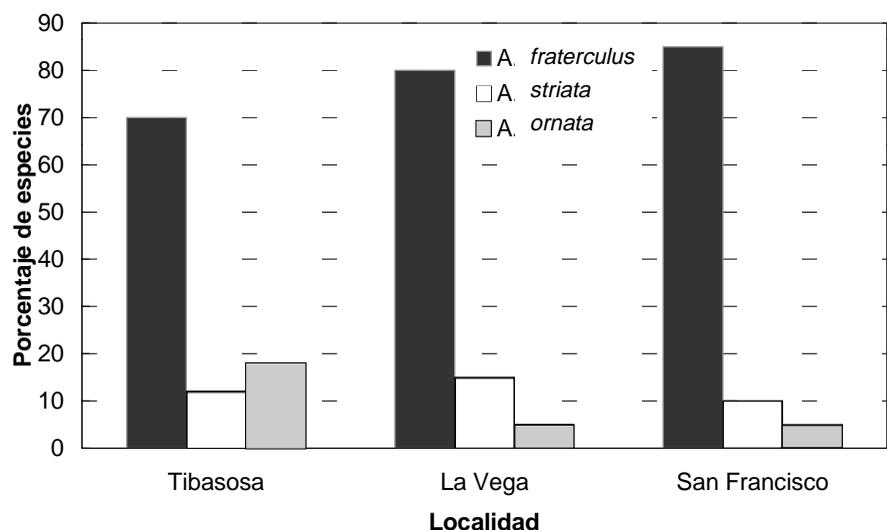


Figura 1. Porcentaje de infestación por especies de mosca de la fruta en las localidades de Tibasosa (Boyacá), La Vega y San Francisco (Cundinamarca).

disminución en el consumo de pulpa. Se presume que las larvas de tercer instar sufren cambios en su comportamiento al ser removidas de la dieta (Hallman 1996) según lo observado, las larvas en frutas sometidas al tratamiento cuarentenario presentaron una menor capacidad de dañar a la pulpa posiblemente por efecto de la baja temperatura.

A 19,0°C las larvas continuaron alimentándose y causando daño a una tasa mayor durante el almacenamiento. En las frutas del control las larvas produjeron daño visible a partir del segundo día de almacenamiento, y lo incrementaron a una tasa mayor que las del tratamiento cuarentenario (Fig. 2) llegando a un máximo del 94% a los 12 días de almacenamiento. Sin embargo, es frecuente la contaminación con agentes patógenos que pueden afectar las condiciones para el desarrollo normal de las larvas por lo cual se observa cierta mortalidad en el testigo, que en buena proporción puede deberse a las condiciones experimentales.

La disminución de la actividad de las larvas que no abandonaron el fruto durante el tratamiento cuarentenario es una ventaja para la comercialización de la fruta, debido a que estas no presentan daños superiores al 24% durante la comercialización. Cabe resaltar que el porcentaje de daño presentado como pulpa descompuesta, está influenciado por las heridas hechas a los frutos durante la infestación artificial, lo que significaría que al someter frutos infestados naturalmente al tratamiento cuarentenario, en condiciones comerciales el daño ocasionado por la larva sería insignificante.

Longitud corporal de las larvas

La longitud de las larvas sometidas al tratamiento cuarentenario fue igual a la obtenida para el patrón de referencia (Tabla 1). De acuerdo con las evaluaciones éstas no modificaron su tamaño, tampoco se encontró ninguna evidencia de encogimiento, ni elongación durante el tratamiento descartando el efecto de la baja temperatura sobre la longitud en las larvas con respecto al patrón. Las larvas del control tampoco mostraron cambios en su longitud, sin embargo ocurrieron algunos en su volumen corporal.

Volumen corporal de las larvas

El volumen promedio de las larvas que se sometieron al tratamiento cuarentenario fue de $5,7 \pm 0,1 \text{ mm}^3$ y éste se mantuvo relativamente constante durante los 15 días de tratamiento (Fig. 3). Las

larvas del control (19,0°C) incrementaron su volumen corporal especialmente a partir de los días 10 y 11 hasta llegar a $9,5 \text{ mm}^3$ en el día 12. Esto probablemente se deba al crecimiento normal de la larva y a los procesos de muda al estado de pupa. La duración de los estados larvales de las moscas de la fruta y sus tasas de desarrollo dependen principalmente de la fruta hospedante (Benavides y Mora 2003) y la temperatura (Núñez 1981; Benavides y Mora 2003).

Mortalidad de las larvas sometidas al tratamiento cuarentenario

Las larvas sometidas al tratamiento cuarentenario comenzaron a morir a partir del tercer día (Fig. 4). El 100% de la mor-

talidad se presentó ocho días después de iniciar el tratamiento cuarentenario. Aparentemente las larvas trataron de mudar al estado de pupa pero no lo lograron, posiblemente por efecto de la temperatura. Cabe resaltar que a medida que aumenta la madurez del fruto el porcentaje de ácido cítrico disminuye y el pH aumenta (Valderrama 2004) lo que también puede tener un efecto sobre el metabolismo larval. En los tratamientos cuarentenarios propuestos por USDA, APHIS se exigen almacenamientos por largos periodos de tiempo a bajas temperaturas. El tratamiento "t 107-a" para el control de *A. fraterculus* debe durar 15 días, en este caso se presentó la mortalidad como ya se mencionó el día ocho.

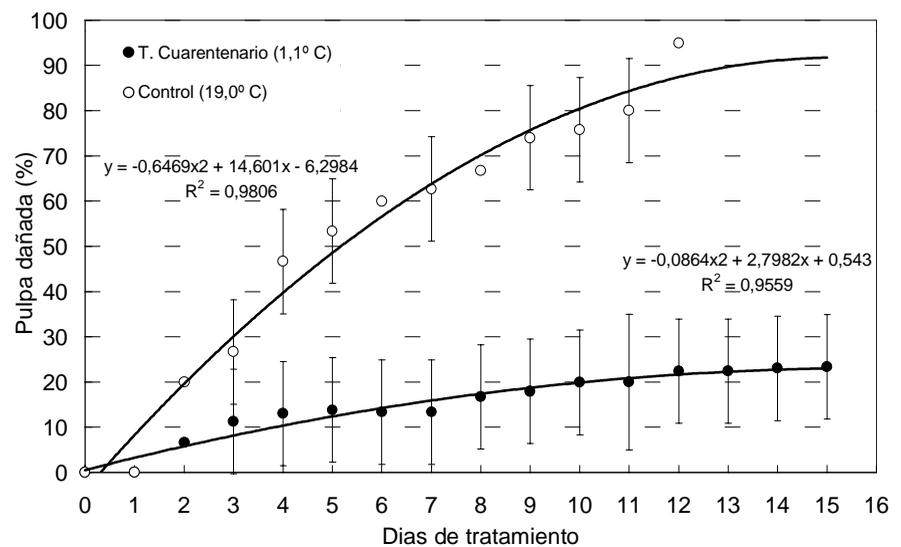


Figura 2. Porcentaje de daño ocasionado por larvas de tercer instar de *A. fraterculus*, infestadas artificialmente en frutos de feijoa cv. 'CENAF 41' y sometidas al tratamiento cuarentenario "t 107 a" (1,1°C) y en el control (frutos almacenados a 19°C). Los datos presentados corresponden al promedio ($\pm 0,3$ a 1,1°C y $\pm 0,7$ a 19°C) de 12 observaciones por día.

Tabla 1. Longitud corporal de larvas de tercer instar de *A. fraterculus* durante los 15 días de tratamiento cuarentenario (1,1°C) y el control (19°C) comparado con un patrón (400 larvas de tercer instar obtenidas de la colonia). Los datos son promedios de 12 observaciones diarias de cada tratamiento.

Día	Longitud de Larvas (mm) a Temperatura		Patrón (larvas de colonia)
	1,1°C	19°C	
1	8,27 \pm 0,46	7,64 \pm 0,46	8,32 \pm 1,00
2	8,97 \pm 0,50	9,17 \pm 0,40	
3	7,60 \pm 0,61	8,78 \pm 1,10	
4	8,85 \pm 0,29	8,77 \pm 0,90	
5	8,39 \pm 1,00	8,72 \pm 1,20	
6	8,82 \pm 1,20	7,37 \pm 0,80	
7	8,04 \pm 0,66	8,50 \pm 0,40	
8	7,68 \pm 1,3	8,06 \pm 0,60	
9	8,31 \pm 0,34	7,81 \pm 0,70	
10	8,53 \pm 0,59	8,64 \pm 1,10	
11	7,48 \pm 1,15	7,34 \pm 1,40	
12	8,57 \pm 0,83	8,36 \pm 1,80	
13	8,68 \pm 1,00	-	
14	8,51 \pm 0,61	-	
15	8,07 \pm 1,20	-	

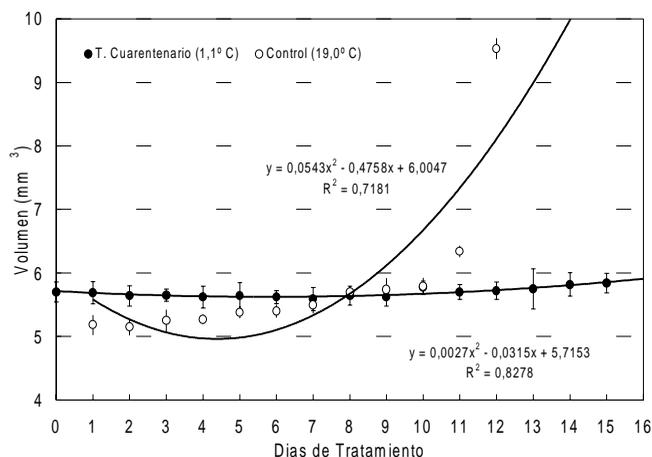


Figura 3. Volumen corporal de larvas de *A. fraterculus* infestadas artificialmente en frutos de feijoa cv. 'CENAF 41' sometidas al tratamiento cuarentenario "t 107 a" (1,1°C) y en el control (Frutos almacenados a 19°C.). Los datos presentados corresponden al promedio (\pm 0,4 a 1,1°C y \pm 1,0 a 19°C) de 12 observaciones por día.

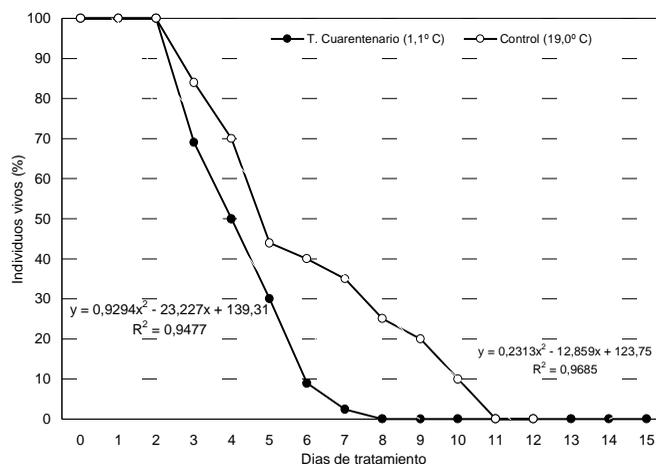


Figura 4. Porcentaje de Mortalidad de larvas infestadas artificialmente, en frutos de feijoa cultivar 'CENAF 41' sometidas al tratamiento cuarentenario "t 107 a" (1,1°C) y en el control (frutos almacenados a 19°C). Los datos corresponden al promedio de 12 observaciones por día durante todo el periodo exigido de tratamiento en frío.

Cabría la posibilidad de disminuir el tiempo del tratamiento cuarentenario, lo cual sería una opción interesante para los exportadores debido a que al disminuir el tiempo del tratamiento, se reducirían los riesgos por pérdidas de calidad en las frutas y el costo de la comercialización. Para esto es necesario realizar más investigación para ajustar el tiempo de este tratamiento cuarentenario.

Las larvas del control (19,0°C) sobrevivieron hasta el día 11 (Fig. 4) el 50 % de éstas continuaron su desarrollo hacia el estado pupal y prosiguieron su ciclo de vida. El otro 50 % de las larvas no sobrevivió debido posiblemente a la contaminación microbiana de la fruta lo cual probablemente no proporcionó un sustrato alimenticio adecuado para el desarrollo larval.

Coloración de larvas

Se observó un cambio gradual de coloración en las larvas durante el tratamiento cuarentenario. Se lograron separar 16 colores diferentes (Fig. 5) de acuerdo con la tabla de la Royal Horticultural Society (RHS) que correspondieron a colores claros 158 y colores más oscuros 199, los colores intensos A y los colores tenues D. El cambio de coloración en las larvas sometidas al tratamiento cuarentenario comenzó a notarse a partir del tercer día, comenzando en la zona anterior del cuerpo. En el séptimo día se presentaron puntos oscuros en el segundo y tercer segmentos abdominales. En el día octavo las larvas mostraron un oscurecimiento que comenzó desde la parte posterior hasta la mitad del cuerpo. Lee (1991) se refirió a

este tipo de mortalidad como "daño indirecto por frío" probablemente debido a la falta de recursos alimenticios para las células. Mecanismos postulados para el choque de frío incluyen la ruptura de las porciones de lípidos en la pared celular a temperaturas entre 1 y 2°C lo que hace que el contenido celular escape (Gould y Hennessey 1997). Larvas de tercer instar de *A. ludens* sometidas un tratamiento cuarentenario de pulsos eléctricos presentaron una mortalidad similar a la obtenida en este experimento. Hallman y Zhang (1997) las llamaron "puparios larviformes". Su hipótesis se basa en que las larvas presentan una pupación parcial que solo alcanza el segmento anterior del cuerpo. Los cambios de color en las larvas en este trabajo se presentaron probablen-

te como una respuesta al estrés generado por la baja temperatura que pudo ocasionar cambios en su metabolismo. Se observó que las larvas no modificaron su volumen corporal para empupar lo cual puede conducir a pensar que el frío tenga un efecto paralizante sobre su musculatura impidiendo el desarrollo y movilidad. En las larvas del control (19,0°C), el cambio de color se presentó cuando comenzaron la muda para cambiar al estado de pupa. Cuando se presentó ocurrió rápida y uniformemente obteniendo colores más intensos.

Conclusiones

El tratamiento cuarentenario "t 107 a" es eficiente para controlar larvas de tercer instar de *A. fraterculus* debido a que pro-

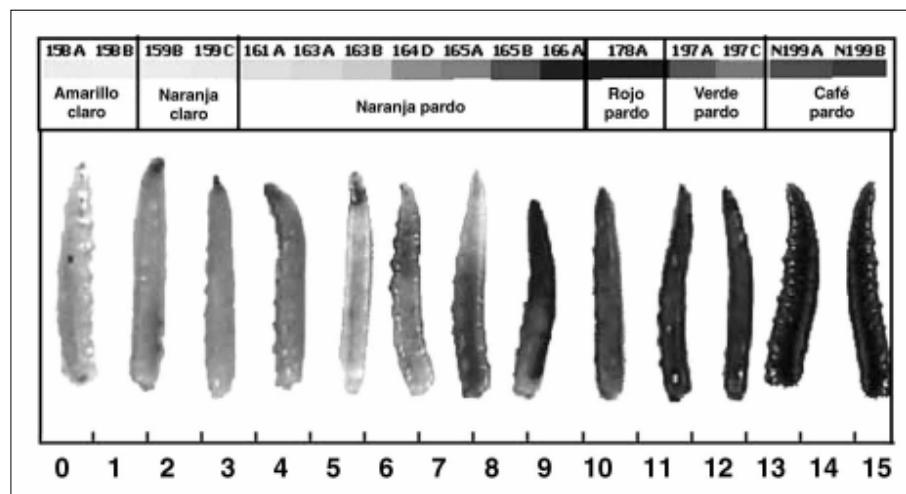


Figura 5. Cambios de color observados en larvas de tercer instar de *A. fraterculus* durante los 15 días del tratamiento cuarentenario de frío "t107 a" de USDA, APHIS. Las larvas después del día ocho se consideran en estado intermedio o pupación parcial.

duce un 100% de mortalidad a los ocho días de tratamiento antes de los 15 exigidos por lo que permite la seguridad cuarentenaria requerida por USDA, APHIS en exportaciones de feijoa. El cumplimiento de los requisitos cuarentenarios exigidos por USDA-APHIS y la garantía de la conservación de la calidad en los frutos resulta en una ventaja comparativa para los exportadores y para los intereses del país en general debido a que puede significar la apertura del mercado Estadounidense para la feijoa.

Agradecimientos

Los autores expresan agradecimientos a las siguientes personas, instituciones y empresas por sus contribuciones. Al centro de excelencia fitosanitaria CEF, por su colaboración y orientación, a Francisco González (CEF) por la confirmación taxonómica y a Luís Ernesto Forero por la información suministrada. A William King y Fany Prias del Laboratorio de Cuarentena Vegetal del ICA (Ibagué, Tolima) por el suministro de las larvas. A las empresas Disfruta las Feijoas y Exoticland Fruits Ltda. por su contribución y aportes para el desarrollo del trabajo.

Literatura citada

- BENAVIDES, M. y H. MORA. 2003. Problemática del complejo moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) y otras plagas de importancia económica en el cultivo de la feijoa. *En: Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa (Acca sellowiana Berg.)*, G. Fischer, D. Miranda, G. Cayón y M. Mazorra (eds.). Produmedios, Bogotá. pp 73-85.
- CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL. 2000. La Feijoa. *Revista Exótica* 4(4): 17-21.
- FLÓREZ, E. 2003. Requerimientos legales para la exportación de Feijoa hacia los Estados Unidos de Norteamérica. *En: Cultivo, poscosecha y exportación de la Feijoa (Acca sellowiana Berg.)*. G. Fischer, D. Miranda, G. Cayón y M. Mazorra; (eds.). Produmedios, Bogotá. pp 147-152.
- GALVIS, A. 2003. Manejo de la cosecha y poscosecha de la Feijoa. *En: Cultivo, poscosecha y exportación de la Feijoa (Acca sellowiana Berg.)*. G. Fischer, D. Miranda, G. Cayón y M. Mazorra; (eds.). Produmedios, Bogotá. pp 111-123
- GOULD, W.; M. HENNESSEY. 1997. Mortality of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) in carambolas treated with cold water precooling and cold storage. *Florida Entomologist* 80 (1): 79-84.
- HALLMAN, G. J. 1991. Tratamientos cuarentenarios para plagas de plantas y frutas de exportación. *Miscelánea, Sociedad Colombiana de Entomología, Socolen*. 21: 5-7
- HALLMAN, G. J. 1996. Mortality of third instar Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) reared in diet or grapefruits and immersed in heated water or grapefruit juice. *Florida Entomologist*. 79. (2):168-172.
- HALLMAN, G. J. 1997. Mortality of Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) immatures in coated grapefruits. *Florida Entomologist*. 80 (3): 324-328
- HALLMAN, G. J.; Q. H. ZHANG. 1997. Inhibition of Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) development by pulsed electric field. *Florida Entomologist*. 80 (2): 239-248.
- KORYTKOWSKY, C. A. 1997. Manual de identificación de moscas de la fruta parte II. Genero *Anastrepha* (Shiner 1968). Universidad de Panamá. Panamá 137p.
- LEE, R. E., JR. 1991. Principles of insect low temperature tolerance. *En R. E. Lee and D. L. Denlinger (eds.) Insects at low temperature*. Chapman and Hall, New York. 513 p.
- MICROSOFT EXCEL, 2003. Copyright Microsoft corporation. Versión de Windows Server 2003.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2000. Servicio nacional de sanidad agraria. Manual del sistema nacional de detección de moscas de la fruta. Perú. P 16, 49, 53
- NÚÑEZ L. 1988. Las moscas de las frutas (Diptera: Tephritidae). *Miscelánea sociedad colombiana de entomología*. p 3-15.
- ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. 2001. Colors chart, Londres. 1308p
- SHARP, J. y G. HALLMAN. 1994. Quarantine Treatments for Pests of Food Plants. Westview Press, Boulder, CO. 290p
- USDA, 2002. Treatment manual. United States Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service. 778p
- VALDERRAMA, J., K. 2004. Evaluación de un tratamiento cuarentenario en frío para control de mosca de la fruta *Anastrepha fraterculus* y en la calidad exportable de dos cultivares de feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret). Trabajo de grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de agronomía. Universidad Nacional de Colombia. 84p
- VIDAL, G.; J. ABELLO. 1998. Project vapor heat treatment for pitahaya fruti *Selenicereus megalanthus* Haw, infested with eggs and larvae of mediterranea fruti fly *Ceratitidis capitata* Wiedeman (Diptera: Tephritidae). Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Bogotá. 72p
- VÉLEZ, R. 1985. Notas sinópticas de entomología económica colombiana. Secretaria de agricultura de Antioquia. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 232p.

Recibido: 05-ene-05 • Aceptado: 23-jul-05

Sección Médica**Virulencia de *Beauveria bassiana* y Triflumuron sobre *Rhodnius prolixus* y *R. pallescens* (Hemiptera: Reduviidae)**Virulence of *Beauveria bassiana* and Triflumuron on *Rhodnius prolixus* and *R. pallescens* (Hemiptera: Reduviidae)YAMILLÉ SALDARRIAGA O.¹, CARMEN A. VÁSQUEZ P.², JAIME DE JESÚS CALLE O.³

Resumen. Se evaluó la virulencia de la mezcla de *Beauveria bassiana* y Triflumuron sobre *R. prolixus* y *R. pallescens*. Los bioensayos consistieron en la aspersión de suspensiones de conidios de *B. bassiana* a concentraciones de 3×10^5 , 1×10^7 , y 3×10^8 conidios/ml, aspersiones con el insecticida Triflumuron a 0,05; 0,025 y 0,0125 mg/ml y una mezcla de Triflumuron y *B. bassiana* sobre los insectos. Se comparó la respuesta de mortalidad y conidiación del hongo sobre los triatomínos en función del tiempo y la concentración. Los resultados fueron variables: tanto *R. prolixus* como *R. pallescens* presentaron diferencias significativas entre todos los tratamientos con *B. bassiana* a las concentraciones de 3×10^8 ($X^2=148.4$), 1×10^7 ($X^2=111.6$) y 3×10^5 conidios/ml ($X^2=195.5$); 3×10^8 ($X^2=174.0$), 1×10^7 ($X^2=14.35$) y 3×10^5 conidios/ml ($X^2=18.85$), respectivamente. *R. prolixus* mostró tiempos más cortos de supervivencia en las concentraciones de 3×10^8 y 1×10^7 conidios/ml de *B. bassiana*. La conidiación de *B. bassiana* sobre los insectos presentó diferencias significativas en cada tratamiento y especie de insecto, con *R. prolixus* mostró un menor tiempo a conidiación. A 3×10^8 conidios/ml de *B. bassiana* utilizando tanto el hongo sólo como con el insecticida produjo un menor tiempo de conidiación en las dos especies. Se resalta la importancia de estos resultados al enmarcarlos dentro de uno de los lineamientos que lidera el programa de manejo integrado de plagas establecido inicialmente por Hurpin en 1966 quien afirma que al tratar los insectos con concentraciones altas de conidias y bajas concentraciones del insecticida los hacen más susceptibles a la conidiación.

Palabras clave: Insecticida. Triatomino. Control Integrado. Entomopatógeno. Combinación.

Summary. The virulence of a combination of *Beauveria bassiana* and Triflumuron on *R. prolixus* and *R. pallescens* was evaluated. The bioassays consisted of spraying the insects with conidial suspensions of *B. bassiana* in concentrations of 3×10^5 , 1×10^7 , and 3×10^8 conidia/ml, with Triflumuron insecticide at 0,05; 0,025; and 0,0125 µg/µl and with a mixture of Triflumuron and *B. bassiana*. The mortality response and conidiation of the fungi on the triatomine were compared as a function of time and the concentration applied. The results were variable: both *R. prolixus* and *R. pallescens* differed significantly between all *B. bassiana* treatments at concentrations of 3×10^8 ($X^2=148.4$), 1×10^7 ($X^2=111.6$) and 3×10^5 conidia/ml ($X^2=195.5$); 3×10^8 ($X^2=174.0$), 1×10^7 ($X^2=14.35$) and 3×10^5 conidia/ml ($X^2=18.85$), respectively. *R. prolixus* exhibited shorter survival times than *R. pallescens* at concentrations of 3×10^8 and 1×10^7 conidia/ml of *B. bassiana*. The conidiation of *B. bassiana* on the insect differed significantly among treatments and species of insect, with *R. prolixus* showing shorter times to conidiation. At 3×10^8 conidia/ml concentration of *B. bassiana*, either alone or with the insecticide, there was a lower time to conidiation in both species. The importance of these results is highlighted within one of the tenants put forward in integrated pest management programs initially established by Hurpin in 1966, which affirms that treating insects with high concentrations of conidia and low insecticide concentrations makes them more susceptible to conidiation.

Key words: Insecticide. Triatomine. Integrated control. Entomopathogen. Combination.**Introducción**

Los insectos hemípteros hematófagos de la familia Reduviidae, *R. pallescens* Barber y *R. prolixus* (Stahl) son dos de los vectores de mayor importancia para Colombia como transmisores de la

enfermedad de Chagas a nivel silvestre y domiciliario (Lent y Wygodzinsky 1979; Angulo y Sandoval 2001). Se encuentran distribuidos principalmente en el norte, centro y oriente del país (Guhl y Nicholls 2001).

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es un problema de salud pública en la zona oriental del territorio colombiano situado por debajo de los 2.000 msnm. Afecta el 7% de la población y ocasiona, en el país, costos

1 Autora para correspondencia: Licenciada en Biología y Química. M.Sc. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. A:A. 1226. Medellín, Colombia. FAX: 2330120. E-mail: ysaldar@matematicas.udea.edu.co

2 Bióloga, aspirante a título de Master en ciencias. Investigador Asociado al Grupo de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. E-mail: avasquez@matematicas.udea.edu.co

3 Biólogo, M.Sc, PhD. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. AA 1226. Medellín, Colombia. Fax 2330120. E-mail: jcalles@matematicas.udea.edu.co

económicos altos en el tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica, una de las anomalías de esta enfermedad (Guhl y Nicholls 2001). En América latina se estima que 100 millones de personas se encuentran en zonas de alto riesgo, 18 millones de personas están infectadas con el parásito *Tripanosoma cruzi*, y anualmente aparecen 500.000 casos (Schofield 1997). En Colombia aproximadamente 1,3 millones de personas están infectadas, 3,6 millones viven en zonas de alto riesgo y anualmente aparecen 40.000 casos (Moncayo 1997). A nivel social y económico, esta enfermedad parasitaria se considera como la más importante del continente americano (World Bank 1993).

En ausencia de vacuna o de tratamiento eficaz contra la enfermedad el control antivectorial se ha basado en interrumpir la transmisión del parásito en el domicilio y el peridomicilio, utilizando insecticidas químicos como piretroides, organoclorados, organofosforados y carbamatos (Díaz y Schofield 1999). Este control ha sido empleado en Colombia en el área domiciliar avalado por el Ministerio de Salud (Schmunis *et al.* 1996; Guhl y Nicholls 2001), a pesar de la resistencia adquirida por parte del vector y de la contaminación ambiental ocasionada (OMS 1991). Entre las alternativas de lucha antivectorial se encuentra el uso de los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Anderson *et al.* 1989; Romaña y Fargues 1992; Fargues y Luz 2000; Lecuona *et al.* 2001; Pineda *et al.* 2002).

Una de las orientaciones de la lucha integrada contra insectos de importancia para el hombre consiste en aplicar simultáneamente gérmenes entomopatógenos con un agente plaguicida. Este método de lucha biológica fue explorado en Rusia (Ferron 1970) sobre la hipótesis de que dosis variables de insecticidas alteran el estado fisiológico del insecto y establecen consecutivamente una intoxicación que sensibiliza al establecimiento de la enfermedad por el agente biológico (Telenga *et al.* 1968).

Uno de los agentes microbianos más utilizados en el control de plagas ha sido el hongo entomopatógeno *B. bassiana*. En Colombia su efecto ha sido evaluado especialmente sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), y así mismo su compatibilidad con insecticidas, herbicidas y funguicidas, encontrándose un efecto

fungistático con la mayoría de los insecticidas evaluados y sólo en unos pocos un efecto deletéreo (Rivera *et al.* 1994; Ibarra y Varela 2002; Vásquez *et al.* 2004).

En estudios realizados por Pristavko (1966) se demostró la alta eficiencia del hongo *B. bassiana* en concentraciones de 5×10^4 conidios/ml en asociación con pequeñas dosis de DDT (0,00016 mg i.a.) en el control de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). El resultado de esta acción conjunta del insecticida (DDT), el hongo, la microbiota intestinal en el insecto y la variación del pH de la hemolinfa contribuyen en el proceso patológico del desarrollo de la enfermedad (Rivera *et al.* 1994). *B. bassiana* también ha sido evaluado sobre vectores de importancia en salud humana como vectores del parásito que produce la enfermedad de Chagas (Romaña 1992; Vásquez *et al.* 2004).

El Triflumuron 2 cloro-N-[[4-(Trifluorometoxy) fenil]amino]Carbonil]benzamida es un insecticida del grupo de las benzoilfenilurea (BFU) que se comporta como un inhibidor de la síntesis de quitina de los insectos. Ha sido evaluado en combinación con hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, demostrando compatibilidad siendo ésta dependiente del tipo de químico y concentración utilizada (Fargues 1973; Anderson *et al.* 1989; Rivera *et al.* 1994; Soltani *et al.* 1996; Vásquez *et al.* 2004).

El insecticida Triflumuron ha sido evaluado sobre diferentes especies de insectos (ninfas o larvas) de importancia económica, encontrándose que la supervivencia de los insectos varía dependiendo de la concentración del insecticida. Triflumuron dificulta la formación de quitina en los insectos holometábolos y hemimetábolos. Utilizado a concentraciones altas tiene propiedades ovicidas y es más efectivo a medida que aumenta la edad de los huevos (Chang 1979; Hammann y Sirrenberg 1980; Mohsen y Medhi 1989; Smith y Grigarick 1989).

Partiendo de la compatibilidad existente entre el Triflumuron y el hongo entomopatógeno *B. bassiana* se planteó como objetivo evaluar el efecto de esta mezcla sobre la supervivencia de ninfas de *R. prolixus* y *R. palllescens* de V estado de desarrollo, en comparación con el hongo sólo y el Triflumuron sólo, sobre los mismos vectores. Como hipótesis se planteó que la supervivencia y conidiación de *R. prolixus* y *R. palllescens* se realiza en un tiempo menor a lo esperado que cuando se aplica el entomopatógeno sólo.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el laboratorio de Micología y Control Biológico del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia durante el 2003.

Insectos

Las colonias de triatominos (*R. prolixus* y *R. palllescens*) procedieron del laboratorio de Control Biológico del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia, criados y mantenidos en condiciones de humedad relativa y temperatura óptimas para su crecimiento y desarrollo (80% HR y 27°C) en cámara climatizada (WTBbinder 78532 Tuttlingen/Germany). Para el estudio se seleccionaron 4 lotes de insectos, cada uno con 15 ninfas de V estado de desarrollo. Los insectos se alimentaron dos veces por semana sobre gallina (*Gallus gallus*) durante una hora y veinticuatro horas antes de cada ensayo para estimular la producción de la hormona de muda.

Hongo entomopatógeno

El aislamiento del hongo entomopatógeno *B. bassiana* UdeA₁₃ se obtuvo a partir del cadáver de un triatomo *R. palllescens* colectado en la región de San Onofre (Departamento de Sucre, Colombia). El aislamiento se mantuvo en Agar Saboraud Dextrosa (Oxoid Ltda., Basinstoke, Hampshire) a 25°C durante 10 días para obtener los conidios. Los conidios se cosecharon utilizando una barra de vidrio y una solución acuosa estéril de 0,5% de Tween 80 (Sigma, St. Louis, MO, USA) como diluyente para dispersar y mantener su uniformidad. Las suspensiones fueron diluidas en agua destilada estéril y homogenizadas en un vortex Heidolph Reax Control a 2500 rpm (Germany 09441/707-124) y se contaron en la cámara de Neubauer (Boeco-Germany). Con base en los resultados obtenidos por Romaña y Fargues (1992) y Pineda *et al.* (2002) se prepararon tres concentraciones del hongo 3×10^8 , 1×10^7 y 3×10^5 conidios/ml.

Insecticida

El Triflumuron (Starycide[®] S.C. 480, Bayer), conocido también como SIR 8514, sintetizado en Alemania por el laboratorio de investigaciones químicas de Bayer en 1975, fue obtenido en la casa comercial (IVANAGRO) en la ciudad de Medellín (Colombia). El producto se presenta como una suspensión concentrada (480g/l), a partir de la cual se prepararon las concentraciones de 0,05; 0,025 y 0,0125 µg/µl, que se definieron con base

en los resultados de trabajos anteriores (Vásquez *et al.* 2002). La empresa Bayer recomienda para el control de insectos, especialmente larvas, utilizar Starycide^R 100 ml en 100 l de agua, con la que se pueden fumigar alrededor de 20 casas (Hammann y Sirrenberg 1980).

Aplicación de la combinación de *B. bassiana* y Triflumuron sobre insectos

Bioensayos

Para el ensayo se tomaron lotes de 15 ninfas con cuatro repeticiones de cada concentración evaluada. El hongo *B. bassiana* y el insecticida se utilizaron como testigos positivos y el agua destilada estéril como testigo negativo. Los insectos tratados fueron mantenidos dentro de cristalizadores plásticos de 288 cm³ cubiertos con muselina, a cada uno de los cuales se les introdujo una lámina de cartón paja para facilitar el desplazamiento y la alimentación de los insectos (Pineda *et al.* 2002).

La aplicación de los tratamientos se realizó mediante el método de aspersión utilizando un sistema emulador de la Torre de Pulverización de Burgerjon (1956), con un ajuste de presión de 6 psi, un volumen de 30 ml y un tiempo de 1 a 2 minutos por aspersión para todos los ensayos. Los lotes de Insectos Tratamiento se colocaron sobre un pequeño platón incorporado herméticamente a la base de la torre de pulverización, girando mientras se hizo la aspersión para garantizar homogeneidad en la aplicación de la solución. Después de ser asperjada la solución se continuó el platón siguió girando por uno o dos minutos más para permitir la caída de la nube sobre los insectos tratados. Diariamente, durante un mes, se controló la supervivencia de los insectos y/o la aparición de la muda y posible pre-

sencia de malformaciones de los insectos supervivientes al tratamiento.

Análisis estadístico

Para tener una buena comprensión de las respuestas obtenidas en la investigación tanto de supervivencia como de conidiación se codificó como grupo cada tratamiento a saber: como grupo 1 la solución fúngica sola (3×10^8 , 1×10^7 y 3×10^5 conidios/ml), como grupos 2, 3, 4 la combinación de cada concentración del hongo y el Triflumuron y como grupos 5, 6 y 7 el Triflumuron sólo (0,0125; 0,0250 y 0,050 µg/µl).

El análisis de supervivencia para *R. prolixus* y *R. pallelescens* se realizó utilizando la curva del análisis de supervivencia de Kaplan y Meier y la prueba de Gehan generalizada para todos los tratamientos, con el paquete estadístico Statistica 98 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). Para la comparación estadística de las diferentes curvas de supervivencia se aplicó la corrección de Bonferroni suponiendo un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. Para cada especie primero se analizaron todos los tratamientos entre sí, luego cada grupo y finalmente se compararon los grupos más relevantes según los resultados encontrados. La base de comparación se hizo partiendo de la concentración de la solución conidial de *B. bassiana* (3×10^8 , 1×10^7 y 3×10^5 conidios/ml).

Resultados y Discusión

La respuesta de supervivencia de ninfas de V estado de desarrollo de *R. prolixus* y *R. pallelescens* al ser sometidas a los tratamientos presentaron diferencias significativas en cada especie así:

Para *R. prolixus*, en la concentración 3×10^8 se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 1, 2-4 y 5-

7 ($X^2=148.4$ y $P<0.05$). El menor tiempo de supervivencia lo presentó el tratamiento 1 (*B. bassiana*), mientras que los tratamientos del 2-4 y 5-7 presentaron TL_{50} mayores: entre 6,0-7,5 y 29 días, respectivamente (Tabla 1).

Para la concentración de 1×10^7 conidios/ml igualmente se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos 1-7 ($X^2=111.6$ y $P<0.05$). En la concentración 1×10^7 conidios/ml hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos 1-4 y 5-7, con un TL_{50} que varió entre 6,5-8,0 y 29 días respectivamente (Tabla 1).

Para la concentración de 3×10^5 conidios/ml la comparación entre todos los tratamientos mostró diferencias significativas ($X^2=195.5$ y $P<0.05$). Los tratamientos 1 y 3 mostraron diferencias con respecto a los tratamientos 5 y 6 ($X^2=26.3$ y $P<0.05$) (Tabla 1). Los tratamientos 2, 4 y 7 tuvieron diferencias estadísticas con el tratamiento 1 ($X^2=195.5$ y $P<0.05$). Así mismo estos tratamientos presentaron diferencias significativas con el 5 y 6 ($X^2=56.3$ y $P<0.05$) (Tabla 1). El TL_{50} mayor lo presentó el tratamiento 5 y 6 (29 días) mientras el menor lo presentaron los tratamientos 4 y 7.

En *R. pallelescens* para la concentración de 3×10^8 conidios/ml se encontraron igualmente diferencias significativas entre todos los tratamientos ($X^2=14.35$ y $P<0.05$). No se encontraron diferencias significativas al comparar los tratamientos 5-7, con una TL_{50} entre 10-11 días, ni entre los tratamientos 2-4 con TL_{50} entre 6-7 días (Tabla 1).

Para la concentración de 1×10^7 conidios/ml se encontraron diferencias estadísticas entre los siete tratamientos ($X^2=14.35$ y $P<0.05$). Entre los tratamientos 2-7 no

Tabla 1. Respuesta de supervivencia de ninfas de *R. prolixus* y *R. pallelescens* (de V estado de desarrollo) inducida por los diferentes tratamientos. N = 60

Concentraciones <i>B. bassiana</i>	<i>Rhodnius prolixus</i> Medianas en días			<i>Rhodnius pallelescens</i> Medianas en días		
	3x10 ⁸ conidios/ml	1x10 ⁷ conidios/ml	3x10 ⁵ conidios/ml	3x10 ⁸ conidios/ml	1x10 ⁷ conidios/ml	3x10 ⁵ conidios/ml
Grupos tratamiento						
1	5,0 (a*)	6,5 (a)	13,0 (a)	8,0 (a)	9,0 (a)	9,0 (a)
2	7,0 (b)	7,0 (a)	10,0 (b)	6,5 (b)	8,0 (b)	8,0 (b)
3	6,0 (b)	8,0 (a)	11,0 (ba)	7,0 (b)	7,0 (b)	8,0 (b)
4	7,5 (b)	7,0 (a)	9,0 (b)	6,0 (b)	8,0 (b)	9,0 (b)
5	29,0 (c)	29,0 (b)	29,0 (c)	10,0 (c)	7,0 (b)	9,0 (a)
6	29,0 (c)	29,0 (b)	29,0 (c)	11,0 (c)	7,0 (b)	7,0 (a)
7	29,0 (c)	29,0 (b)	9,0 (b)	10,0 (c)	6,5 (b)	8,0 (a)

Grupos tratamientos: 1. *B. bassiana*; 2. *B. bassiana* con la concentración 0,0125 µg/µl de Triflumuron 3. *B. bassiana* con la concentración 0,0250 µg/µl e Triflumuron 4. *B. bassiana* con la concentración 0,050 µg/µl de Triflumuron; 5. Concentración 0,0125 µg/µl de Triflumuron; 6. Concentración 0,0250 µg/µl de Triflumuron y 7. Concentración 0,050 µg/µl de Triflumuron. *Letras diferentes indican que las medianas son estadísticamente diferentes.

se encontraron diferencias significativas, en donde los TL_{50} oscilaron entre 6,5 y 8 días. *B. bassiana* presentó un TL_{50} de 9 días (Tabla 1).

La concentración de 3×10^5 conidios/ml presentó diferencias significativas entre los siete tratamientos ($X^2=18.85$ y $P<0.05$). *B. bassiana* sólo tuvo un TL_{50} de 9 días. Al comparar este resultado con los demás tratamientos se encontró que no hubo diferencia estadística entre los tratamientos 1, 5, 6 y 7 con TL_{50} que oscilaron entre 7 y 9 días. No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos 2, 3 y 4 mostrando TL_{50} entre 8-9 días (Tabla 1).

Respecto a la conidiación en *R. prolixus* se encontraron diferencias significativas en las concentraciones 3×10^8 y 3×10^5 conidios/ml ($X^2=15.94$ y $P<0.05$ y $X^2=22.67$ y $P<0.05$) respectivamente. En la concentración de 1×10^7 conidios/ml no se hallaron diferencias entre el tratamiento 1 y los tratamientos 2-4, arrojando un TC_{50} (tiempo de conidiación) entre 7,5 y 9 días (Tabla 2).

Para *R. pallescens* se encontraron diferencias significativas en las tres concentraciones ($X^2=174.0$ y $P<0.05$). Para la concentración de 3×10^8 y 1×10^7 conidios/ml se encontraron diferencias entre el tratamiento 1 y los tratamientos 2-4 con TC_{50} entre 7,5 y 10 días. En la concentración 3×10^5 conidios/ml se observó diferencia estadística entre los cuatro tratamientos, así: hubo diferencia entre el tratamiento 1 y 2, entre el tratamiento 2 y 4, y se encontró similitud entre los tratamientos 2-4 y 3-4. Los tratamientos 2 y 3 presentaron el mismo TC_{50} de 9 días, y los tratamientos 1 y 4 TC_{50} de 10 días (Tabla 2).

Al comparar la respuesta entre ambas especies frente a la aplicación de la mezcla se encontró que para *R. prolixus*, la conidiación del hongo sobre el insecto se demoró más para expresarse a una menor concentración de *B. bassiana*.

Los investigadores Pineda *et al.* (2002) evaluaron a *R. ecuadoriensis* con *B. bassiana* encontrando un TL_{50} de 6 días para la concentración de 3×10^8 conidios/ml frente a *R. prolixus*, el cual presentó en este estudio un TL_{50} de 5 días bajo la misma concentración y para el mismo aislamiento. Esta similitud en los resultados podría explicarse por la pertenencia de las dos especies a un mismo género y con características de hábitat parecidas ya que *R. prolixus* está adaptado a ambientes domiciliarios y *R. ecuadoriensis* tanto al silvestre como al domiciliario (Pineda *et al.* 2002).

La respuesta de los insectos (supervivencia) a la aplicación de la mezcla comparándola con la aplicación del hongo sólo fue muy variable teniendo en cuenta que se presentan diferencias entre uno y cuatro días para todas las concentraciones evaluadas y en las dos especies de triatominos. Esta respuesta de similitud en el comportamiento de la mezcla frente al hongo sólo, podría deberse al daño que ocasiona Triflumuron sobre la cutícula del insecto facilitando de esta forma la entrada del tubo germinal de la espora en el cuerpo del triatominio (Castellanos 1997).

Este resultado es relevante cuando se piensa en los principios del manejo integrado de plagas (MIP) que parten de la utilización de dos componentes como es un insecticida a dosis subletales y un microorganismo, en este caso un hongo entomopatógeno a dosis altas que igualmente no son dañinas al medio ambiente. Se espera que con la utilización de los dos componentes que se complementen en el MIP, asociado al trabajo con la comunidad implicada en el problema, se reduzcan los daños ocasionados por los insectos de importancia y no se afecte en gran medida a los ecosistemas.

El hecho de que la germinación del hongo sobre el cadáver del triatominio fue en algunas concentraciones inhibida lige-

ramente (datos no mostrados) cuando se realizó el tratamiento con el insecticida, podría deberse a una acción fungistática de Triflumuron sobre *B. bassiana*. Esto teniendo en cuenta que los hongos entomopatógenos tienen en su pared quitina, de forma que pasado algún tiempo de adaptación y resistencia del hongo a la acción del químico, continúa con su proceso de germinación y crecimiento micelial (Castellanos 1997). De esta manera finalmente lograría sobrepasar el porcentaje de germinación y conidiación del tratamiento con el hongo sólo sobre los triatominos, como se observó en el presente estudio.

Anderson *et al.* (1989) en el estudio realizado sobre el escarabajo de la papa encontraron que *B. bassiana* asociado a Triflumuron, Abamectin, y Turgingensis no fue inhibido y su acción conjunta sobre el insecto blanco no mostró gran diferencia en la mortalidad entre *B. bassiana* sólo y la combinación con los agentes químicos. Adicionalmente la incidencia de la conidiación tampoco difirió entre los dos tratamientos; sin embargo, la acción conjunta del hongo y el agente químico introducen múltiples factores de mortalidad, lo que puede representar una ventaja en el manejo de plagas y retrasar alguna expresión de resistencia a nuevos insecticidas. Estos resultados fueron similares con los hallados en este estudio cuando se encontró que la expresión de la conidiación en *R. prolixus* y *R. pallescens* no difirió entre los dos tratamientos; sin embargo nuestros resultados de mortalidad en los insectos tratados presentaron diferencias con respecto a los encontrados por Anderson *et al.* (1989) sobre el coleóptero.

La supervivencia de los insectos tratados con Triflumuron sólo, varió para cada especie evaluada. A mayor concentración del insecticida aplicado la supervivencia se redujo. Fue cuestionable la respuesta que presentó Triflumuron sólo sobre *R. prolixus* frente a la supervivencia. Este

Tabla 2. Tiempos de conidiación de *B. bassiana* con respecto a cada tratamiento y a cada especie de Triatominio

Concentraciones <i>B. bassiana</i>	<i>Rhodnius prolixus</i> Medianas en días			<i>Rhodnius pallescens</i> Medianas en días		
	3×10^8 conidios/ml	1×10^7 conidios/ml	3×10^5 conidios/ml	3×10^8 conidios/ml	1×10^7 conidios/ml	3×10^5 conidios/ml
Grupos tratamiento						
1	6,0 (a*)	7,5 (a)	14,0 (a)	9,0 (a)	10,0 (a)	10,0 (a)
2	8,0 (b)	8,0 (a)	11,0 (bc)	7,5 (b)	9,0 (b)	9,0 (b)
3	7,0 (b)	9,0 (a)	13,0 (a)	8,0 (b)	8,0 (b)	9,0 (ab)
4	8,5 (b)	8,0 (a)	10,0 (c)	7,0 (b)	9,0 (b)	10,0 (a)

Grupos Tratamiento: 1. *B. bassiana*; 2. *B. bassiana* con la concentración 0,0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Triflumuron 3. *B. bassiana* con la concentración 0,0250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Triflumuron 4. *B. bassiana* con la concentración 0,050 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Triflumuron. *Letras diferentes indican que las medianas son estadísticamente diferentes.

resultado no se podría explicar de forma certera y se puede suponer una falla humana en la preparación de las diferentes diluciones del insecticida antes de su aplicación. Sin embargo, la respuesta de *R. pallescens* fue más homogénea y podría dar bases para comprender el efecto de este insecticida sobre los triatomínos.

Las concentraciones de Triflumuron evaluadas en el presente estudio son muy bajas; diez veces por debajo de la dosificación recomendada por la casa fabricante (Bayer) para el control de insectos (0,48 µg/µl en 100 l para rociar 20 casas), lo que podría explicar la reducción del efecto letal de Triflumuron sobre los triatomínos (Hamman y Sirrenberg 1980), tanto en su aplicación sólo como en combinación con el hongo. Este efecto deletéreo y letal se evidenció en la morfología de los insectos que pasaron al estado adulto o murieron en su intento o aquellos que sobrevivieron no más de 30 días postratamiento. Chang (1979), Hamman y Sirrenberg (1980), Picollo de Villar *et al.* (1987), Soltani *et al.* (1996) y Vásquez *et al.* (2002) evaluaron Triflumuron sobre diferentes especies de insectos reportando un alto porcentaje de adultos o ninfas con daños morfológicos antes y después de mudar totalmente. Los daños morfológicos encontrados en los insectos en el presente trabajo se vieron especialmente en escutelo, proboscide, genitalia, tejido conectivo, y en mayor proporción en las alas, concordando estos resultados con los obtenidos por los investigadores anteriores, teniendo en cuenta que Triflumuron es larvicida por excelencia.

Para *R. prolixus* la solución fúngica sola ejerció un efecto mayor de mortalidad en las dos primeras concentraciones 3×10^8 y 1×10^7 conidios/ml, seguido por el efecto letal de la mezcla en estas dos mismas concentraciones y por último el insecticida que produjo una mayor supervivencia de las ninfas tratadas. La gran diferencia en los TL_{50} entre los tratamientos 1-4 con respecto a los tratamientos 5-7 (Triflumuron) se podría explicar primero porque como se dijo antes, las concentraciones de Triflumuron utilizadas en este estudio son bajas con respecto a las concentraciones recomendadas para que actúe como un insecticida. Adicionalmente el efecto de un regulador de crecimiento depende del momento (en su metamorfosis) y la concentración aplicada, puesto que son insecticidas más específicos que los hasta ahora utilizados para control de insectos de importancia para el hombre (Hamman y Sirrenberg 1980).

Los investigadores Romaña y Fargues (1992), Arroyave (1995) y Pineda *et al.* (2002) realizaron estudios en ninfas de I y V estado de desarrollo de *Rhodnius* utilizando las tres concentraciones de *B. bassiana* evaluadas en este trabajo, encontrando TL_{50} desde 4,63 a 7 días y una conidiación del 100%. Los resultados de tiempos de conidiación de este estudio no coinciden totalmente con los anteriores trabajos, ya que la aplicación de la mezcla y el hongo sólo presentaron tiempos medios de conidiación después de los siete días. Las especies de triatomínos evaluadas en todos los anteriores estudios fueron diferentes, pero del mismo género. Adicionalmente la forma de aplicación del inóculo fúngico varió en este estudio, en donde se realizó por aspersión y en los anteriores trabajos fueron realizadas de forma indirecta a través de lonas de algodón inoculadas con el hongo para depositar allí los insectos tratamiento.

Lecuona *et al.* (2001) evaluó *B. bassiana* a concentración de 1×10^8 conidios/ml sobre *T. infestans* principal vector de la enfermedad de Chagas para Argentina encontrando tiempos de mortalidad entre 6,5 y 7,3 días con un 100% de mortalidad. Estos resultados fueron similares a los del presente estudio en los tiempos de mortalidad, pero difiriendo con *R. pallescens* donde los tiempos de mortalidad fueron superiores a 8 días.

En cuanto a las respuestas de conidiación sobre los cadáveres de los insectos de ambas especies la muscardina de *B. bassiana* apareció al segundo día de estar los insectos en cámara húmeda. Sin embargo, en esta conidiación podría decirse que aumentó gradualmente el desarrollo del micelio sobre el insecto. Se observaron además diferencias desde el punto de vista cualitativo (datos no presentados); así la muscardina blanca apareció más rápido sobre el cadáver del insecto con la aplicación de la mezcla que con el hongo sólo; su textura fue más tupida con un área de invasión más extensa, empezando por las áreas intersegmentales principalmente patas, proboscide, escutelo y finalmente abdomen y tejido conectivo, según lo descrito por Tanada y Kaya (1993); en contraste con el comportamiento del tratamiento con el hongo sólo, donde su invasión apareció en igual orden pero en las áreas intersegmentales, la muscardina apareció con menos densidad y más polvoso. Estos resultados fueron similares con los de Vásquez *et al.* (2005), cuando se evaluó el comportamiento de *B. bassiana* UdeA₁₃ sobre *R. prolixus* de V estado de desarro-

llo a las mismas concentraciones evaluadas en este trabajo.

La mortalidad de *R. prolixus* y *R. pallescens* asociada a la aplicación de *B. bassiana* en combinación con Triflumuron dependió en gran medida de la alta concentración del hongo y baja del insecticida aplicado. *R. pallescens* tuvo mayor susceptibilidad al efecto de la mezcla del insecticida y el hongo, especialmente en las concentraciones 3×10^8 y 1×10^7 conidios/ml. La concentración 3×10^8 conidios/ml de *B. bassiana* utilizado sólo o en combinación produjo en menor tiempo la conidiación en ambas especies de triatomínos.

Aunque dentro de la hipótesis planteada al inicio de este trabajo se esperaba que el efecto de la mezcla del insecticida a concentraciones subletales y el hongo entomopatógeno a concentraciones altas fuera mayor al efecto causado por la aplicación del hongo o el insecticida solos, se encontró que el efecto de la aplicación de la mezcla sobre la supervivencia de los insectos fue levemente mayor sobre los otros dos parámetros evaluados; lo que sugiere realizar otras pruebas en laboratorio y en campo para evaluar que otros factores pueden aumentar o disminuir la respuesta de los agentes involucrados en este estudio.

En la literatura revisada se encontraron estudios relacionados con el efecto de insecticidas sobre insectos plaga de importancia económica y la patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre estos. Hay pocos estudios relacionados con el efecto causado por la utilización conjunta de insecticidas y hongos entomopatógenos sobre insectos. Dentro del manejo integrado de plagas, la utilización de ambos (el insecticida y el microorganismo), como el modelo evaluado en este estudio, podrían servir como una base para futuras investigaciones constituyéndose en una alternativa menos costosa.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los profesores Fabio Pineda G., Ana Isabel Gutiérrez y Nadya Cardona por el aporte en la redacción del artículo y Abel Díaz Cadavid por el análisis estadístico de la investigación. A la Corporación Académica para el Estudio de Patologías Tropicales, al CODI y a los investigadores del Grupo de Micología y de Control Biológico del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia por el apoyo logístico y la financiación de esta investigación.

Literatura citada

- ANDERSON, T. E.; HAJEK, A. E.; ROBERTS, D. W.; PREISLER, H. K.; ROBERTSON, J. L. 1989. Colorado Potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Effects of Combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. Journal of Economical Entomology 82 (1): 83-89.
- ANGULO, V.; SANDOVAL C. 2001. Enfermedad de Chagas en Colombia. Memorias ECLAT IV. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales. CINTROP Universidad Industrial de Santander. 6 p.
- ARROYAVE, E. 1995. Susceptibilidad de algunas especies de Triatomos al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Trabajo de grado. Instituto de Biología. Universidad de Antioquia. 40 p.
- BURGERJON, A. 1956. Pulvérisation et poudrage en laboratoire par des préparations pathogènes insecticides Annales INRA Epiphyties 7: 675-684.
- CASTELLANOS, D. O. 1997. Importancia en la patogenidad de la acción enzimática del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Revista Colombiana de Entomología. 23: (1-2): 65 -71.
- CHANG, S. C. 1979. Laboratory evaluation of Diflubenzuron, Penfluron and Bay SIR 8514 as female sterilants against the house fly. Journal Economical Entomology 72: 479-488.
- DIAZ, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. 1999. The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years of Carlos Chagas Discovery. Memories Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94, supp 1.
- FARGUES, J. 1972. Traitement mixte des larves de doryphore *Leptinotarsa decemlineata* Say par des spores du champignon entomopathogene *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Et des doses reduites d'insecticide. Phytatrie Phytopharmacie 21: 170-183.
- FARGUES, J. 1973. Sensibilité des larves de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Col., Chrysomelidae) a *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. (Fungi Imperfecti, Moniliales) en presence de doses reduites d'insecticide. Annales de Zoologie. Ecologia Animal 5: 231-246.
- FARGUES, J.; LUZ, C. 2000. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. Journal of Invertebrate Pathology 75 (3): 202-211.
- FERRON, P. 1970. Augmentation de la sensibilité des larves de *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabacidae) a *Beauveria tenella* (Delaer). Siemaszko au moyen de quatités reduites de HCH. Proc. IV th Coll. Insect Pathology, College Park. p. 66-79.
- GUHL, F.; NICHOLLS, S. 2001. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes, Instituto Nacional de Salud, OMS. Santa Fe de Bogotá, Colombia. 98 p.
- HAMMANN, Y.; SIRRENBERG, W. 1980. Laboratory evaluation of SIR 8514, a new chitin synthesis inhibitor of the benzoylated urea class. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 32: 35-46.
- IBARRA, A. M.; VARELA, A. 2002. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos como agentes potenciales de control biológico en algunas regiones Colombianas. Revista Colombiana de Entomología 28 (2): 129-137.
- LECUONA, R. E.; EDELSTEIN, J. D.; BERRETTA, M. F.; LA ROSSA, F. R.; ARCAS J. A. 2001. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) Strains as Potential Agents for Control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Journal of Medical Entomology. 38 (2): 172-179.
- LENT, H.; WYGODZINSKY, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as Vectors of Chagas Disease. Bulletin of the American Museum of Natural History 163 (3): 410-411.
- MOHSEN, Z. H.; MEHDI, N. S. 1989. Effects of insect growth inhibitor Alstylin on *Culex quinquefasciatus* Say (Culicidae: Diptera). Insects Science Applications. 10(1):29-33.
- MONCAYO, A. 1997. Progress towards elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. WHO. Statistics Quarterly 50: 195-198.
- OMS 1991. Control de la Enfermedad de Chagas. Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. 320 p.
- PICOLLO de VILLAR M. I., H. J.; SECCACINI, E.; FONTAN, A.; ZERBA, E. N. 1987. Activity of the insect growth regulator fenoxycarb (RO-13-5223) on *Triatoma infestans* (Hemiptera). Biochemical Physiology 87 (2): 367-373.
- PINEDA, F.; SALDARRIAGA, Y.; GOMEZ, C. 2002. Susceptibilidad de *Rhodnius ecuadoriensis* de quinto estado de desarrollo a la acción de *Beauveria bassiana*. Revista Colombiana de Entomología 28 (1):9-12.
- PRISTAVKO, V.P. 1966. Processus pathologiques consecutifs a l'action de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, associe a de faibles doses de DDT chez *Leptinotarsa decemlineata* Say. Entomophaga 11: 311-324.
- RIVERA, M. A.; BUSTILLO, P. A.; MARIN, M. P. 1994. Compatibilidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Revista Colombiana de Entomología 20 (4): 209-214.
- ROMAÑA, C. A.; FARGUES, J. F. 1992. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. Memorias. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 87 (3): 363-368.
- SCHOFIELD, C. J. 1997. Bases técnicas y económicas para el control a gran escala de la enfermedad de Chagas. Memorias curso de posgrado: genética poblacional de triatomos aplicada al control vectorial de la enfermedad de Chagas. Editores Corcas, Santa Fé de Bogotá. Colombia. 180 p.
- SCHMUNIS, G. A.; ZICKER F; MONCAYO A. 1996. Interruption of Chagas' disease transmission through vector elimination. The Lancet. 348 p.
- SMITH, K. A.; GRIGARICK, A. A. 1989. Triflumuron residual activity and ovidical longevity in the Rice Water Weevil (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Economical Entomology 82 (2): 645-648.
- SOLTANI, N.; SOLTANI-MAZOUNI, N.; DELACHAMBRE, J. 1996. Evaluation of Triflumuron, a Benzoilphenylurea Derivate, on *Tenebrio molitor* pupae (Coleoptera: Tenebrionidae), Effect on cuticle. Journal of Applied Entomology 120 (10): 627-629.
- TANADA, Y.; KAYA, H. K. 1993. Insect pathology Academic Press, Inc. Harcourt Brace Avonovich. p. 359-361.
- TELENGA, N. A.; SIKOURA, A. I.; SMETNIK, A. I. 1968. Emploi du produit biologique Beauverine combiné a des insecticides dans la lutte contre le doryphore (en russe). Zashch. Rast 4: 3-23.
- VÁSQUEZ, C.; SALDARRIAGA, Y.; GÓMEZ, W. A.; PINEDA, F. 2002. Susceptibilidad de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) a la acción de Triflumuron. Revista Colombiana de Entomología 28 (1): 13-16.
- VÁSQUEZ, C.; SALDARRIAGA, Y.; PINEDA, F. 2004. Compatibilidad del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con Triflumuron. Revista Colombiana de Entomología 30(1): 23-27.
- VÁSQUEZ, C.; SALDARRIAGA, Y.; CHAVERRA, D.; 2005. Susceptibilidad de *Rhodnius prolixus* de V estado de desarrollo a la acción del hongo *Beauveria bassiana*. Revista Colombiana de Entomología. 31(1):15-20.
- WORLD BANK, 1993. World Development Report 1993. Investing in Health. Oxford University Press, New York 329 p.

Hormigas (Hymenoptera: Formicidae) en centros hospitalarios del Valle del Cauca como vectores de patógenos nosocomiales

Ants (Hymenoptera: Formicidae) in hospital centers of Valle del Cauca as vectors of nosocomial pathogens

LUZ ADRIANA OLAYA-MÁSMELA¹, PATRICIA CHACÓN DE ULLOA², ANDREY PAYÁN³

Resumen. Se estudió la fauna de hormigas asociada a Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud (IPS) y los patógenos que ellas pueden transportar, en cuatro municipios del departamento del Valle del Cauca: Cartago, Tuluá, Cali y Buenaventura. Se determinaron siete especies de hormigas, de las cuales, *Paratrechina longicornis* y *Tapinoma melanocephalum* fueron las más frecuentemente colectadas. Se aislaron 14 tipos bacterianos; ocho de los cuales fueron transportados exclusivamente por cuatro especies de hormigas (*T. melanocephalum*, *P. longicornis*, *Tetramorium bicarinatum* y *Monomorium pharaonis*). El coco Gram positivo más virulento fue *Staphylococcus aureus* y los bacilos Gram negativos fueron *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *S. liquefasciens*, *Enterobacter agglomerans* y *E. calcoaceticus*. *Staphylococcus* sp. coagulasa (-) fue el patógeno más comúnmente aislado de las hormigas.

Palabras clave: Hormigas vagabundas. Bacterias. Infección intrahospitalaria. Colombia.

Summary. Ants and nosocomial pathogens carried by them were studied in health care centers at four localities in the department of Valle del Cauca: Cartago, Tuluá, Cali and Buenaventura. Seven species were found, of which *Paratrechina longicornis* and *Tapinoma melanocephalum* were the most frequently collected. Fourteen bacterial types were isolated; eight were found to be exclusively transported by four species of ants (*T. melanocephalum*, *P. longicornis*, *Tetramorium bicarinatum* y *Monomorium pharaonis*). The most virulent Gram-positive coccus was *Staphylococcus aureus* and the Gram-negative bacilli were *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *S. liquefasciens*, *Enterobacter agglomerans*, and *E. calcoaceticus*. *Staphylococcus* sp. coagulasa (-) was the pathogen most commonly isolated from ants.

Key words: Wandering ants. Bacteria. Within-hospital Infection. Colombia.

Introducción

El estudio de infestaciones hospitalarias por hormigas ha ganado gran auge a partir de las investigaciones realizadas por Beatson (1972), sobre la capacidad potencial de estos insectos para transmitir infecciones intrahospitalarias o nosocomiales (Bueno y Fowler 1994). La presencia de hormigas y otros insectos en ambientes hospitalarios representa un riesgo potencial para la higiene y la salud de los pacientes, debido a la gran cantidad de hábitats que pueden utilizar, a su alto grado de dispersión y hábitos alimenticios (Fernández y Zaror 1971; Edwards 1981). Además se conoce la afinidad de ciertas especies, como la Hormiga Faraona (*Monomorium pharaonis*), por instrumentos quirúrgicos y capacidad para transportar agentes patógenos causantes de enfermedades (Eichler 1990).

Las principales fuentes de contagio de infecciones nosocomiales son los mismos

pacientes, el personal médico, vehículos y otros componentes inanimados como suelo, aire, alimentos y desperdicios (Taylor *et al.* 1979; Vélez *et al.* 1992), que hacen parte de un ecosistema artificial conveniente para la multiplicación y desarrollo de aquellos insectos que se comportan como vectores (Reyes y Schenone 1961).

Estudios microbiológicos han indicado la potencialidad de las hormigas como vectores mecánicos de bacterias de los géneros: *Staphylococcus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Candida*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Enterococcus*, entre otras (Fowler *et al.* 1993). Sin embargo, dependiendo de la especie de hormiga, sus hábitos y hábitats dentro de un centro hospitalario pueden variar, lo cual eventualmente puede representar un riesgo en establecimientos con deficiente grado de asepsia, ya que tales agentes bacterianos podrían ser transmitidos a los pacientes (Bailey y Barón 1989).

En Colombia, particularmente en Cali (Valle), investigaciones preliminares realizadas en ambiente urbano (Lozano *et al.* 1999; Lozano y Chacón de Ulloa 2001) incluyendo algunos hospitales (Olaya y Chacón 2001), indicaron que dos especies de hormigas: *Tapinoma melanocephalum* (Hormiga Fantasma) y *Paratrechina longicornis* (Hormiga Loca), fueron dominantes. Lo anterior condujo a desarrollar el presente estudio, en cuatro municipios del Departamento del Valle del Cauca, con los objetivos de identificar y estimar la frecuencia de especies de hormigas en centros hospitalarios y determinar su posible asociación con patógenos nosocomiales.

Materiales y Métodos

Obtención de muestras de hormigas

Entre noviembre 8 y diciembre 12 del año 2001, se llevó a cabo el estudio en

1 Bióloga, M. Sc. Universidad del Valle. A.A 25360 Cali aolaya6@hotmail.com

2 Autor para correspondencia: Bióloga, Ph.D. Departamento de Biología. Universidad del Valle. Cali. A.A. 25360. Tel.: 3212100 ext. 2570. E-mail: pachacon@uniweb.net.co

3 Bacteriólogo. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali.

cuatro ciudades del departamento del Valle del Cauca – Colombia, de norte a sur: Cartago, Tuluá, Cali y Buenaventura. Con el aval de las Secretarías de Salud de los municipios y la colaboración de los centros hospitalarios, en cada ciudad se seleccionaron dos Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud (IPS): un hospital y una clínica. El criterio para la selección de las IPS fue la capacidad de los servicios que prestaban a la comunidad, así, fueron de interés las de mayor complejidad. Dentro de cada IPS se visitaron cuatro áreas; dos de las cuales fueron hospitalización y pediatría, y las otras dos se escogieron aleatoriamente entre urgencias, cocina, sala de partos, sala de neonatos y neurología. En cada área, se seleccionaron dos sitios, como habitación, baño, cocineta, pasillo, etc, los cuales fueron adoptados como repeticiones.

En el punto medio del camino de obreras y con la ayuda de un aspirador bucal entomológico, diseñado especialmente para individualizar cada muestra, se tomaron entre 30 y 40 individuos, los cuales se guardaron en un tubo de vidrio estéril de tapa rosca (16x150 mm). Las muestras se llevaron al laboratorio clínico del Hospital Universitario del Valle (HUV), donde se procesaron inmediatamente o se guardaron hasta el otro día en refrigerador a -20°C .

Adicionalmente, en tubos de vidrio (16 x 50 mm [Kimax]) con alcohol metílico al 70%, se recolectaron algunas hormigas para su posterior identificación en el laboratorio del Grupo de Investigación en Biología, Ecología y Manejo de Hormigas de la Universidad del Valle.

Muestras control

En cada sitio se tomaron dos muestras control: una muestra del aire y otra del suelo. Para la primera, a un metro del lugar donde se recolectaron las hormigas, se colocó una caja de Petri, abierta, de agar sangre con base de BHI (Brain Hearth Infection - (Merck®)), de modo que se adhirieran a ella los microorganismos presentes en el aire, si es que los hubiere.

Para la segunda, aproximadamente entre 30 y 50 cm de distancia del mismo sitio de recolección de las hormigas, se realizaron dos frotis del suelo con la ayuda de hisopos de algodón, embebidos en caldo de tioglicolato, en un área de 100 cm^2 . Una de las muestras se sembró sobre una caja de agar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Merck®), medio bacteriológico de cultivo que permite el reconocimiento selectivo de bacterias Gram (-); y la

otra muestra se sembró sobre agar sangre con base de BHI (Merck®) que permite el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-). Un par de guantes de látex diferente fue utilizado para la toma de cada muestra. Cada una de las cajas de Petri se selló con cinta de enmascarar y fue debidamente rotulada. Finalmente todas las muestras se guardaron en una nevera portátil hasta su traslado al laboratorio clínico del Hospital Universitario del Valle en Cali.

Procesamiento de las muestras y Técnicas de siembra

Las muestras de hormigas se maceraron y pesaron empleando una balanza tipo analítico (Denver Instrument Company). Con este dato se calculó el número total de bacterias que transportaban por Gramo de tejido o Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Luego, se procedió a realizar la siembra haciendo diluciones peso/volumen 1:10 y 1:100 empleando Caldo de Tioglicolato (Merck®). Se dispersó una alícuota de las diluciones anteriores sobre placas de agar sangre con base de BHI (Brain Hearth Infection) (Merck®) para establecer el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC). Paralelamente se sembró una placa de agar EMB, por el método convencional de siembra por agotamiento, para facilitar la diferenciación entre distintos tipos de colonias de bacterias Gram negativas. Los medios de cultivo sólidos, incluidas las muestras control, se revisaron después de 24 h de incubación a 37°C , se establecieron los recuentos y se procedió a identificar las bacterias Gram positivas que crecieron en el agar sangre y Gram negativas que crecieron sobre el agar EMB. Los caldos de tioglicolato se dejaron incu-

bar por un periodo máximo de cinco días o hasta que se evidenciaron signos de crecimiento franco, después de lo cual se hicieron subcultivos en agar sangre, agar EMB y agar salino manitol. Este último se hizo con el fin de incrementar la posibilidad de aislamiento de *Staphylococcus* spp.

La identificación de las bacterias provenientes de los diferentes agares de cultivo, se realizó evidenciando características fenotípicas como propiedades de tinción en la coloración de Gram, morfología de las colonias y comportamiento bioquímico determinado por pruebas de identificación manual estándar, entre otras (Koneman *et al.* 2001).

Resultados

Muestras de hormigas

En los 48 sitios visitados, se colectaron aproximadamente 1600 individuos distribuidos entre los cuatro municipios del Valle del Cauca. Se determinaron siete especies de hormigas, cinco de las cuales se encontraron en Tuluá, cuatro en Cartago y tres en Cali y Buenaventura. Las especies de mayor incidencia fueron la Hormiga Fantasma, *T. melanocephalum*, con una frecuencia del 43,7% y la Hormiga Loca, *P. longicornis*, con el 35,4% (Tabla 1).

En la figura 1, se ilustra la abundancia de muestras de hormigas respecto al área de atención hospitalaria, con excepción de la sala de partos donde no se observaron hormigas. La mayoría de las muestras (27%) se obtuvo en el área de pediatría, donde se registraron cinco de las siete especies. Seguidamente se destacan las áreas de hospitalización (25%), urgencias

Tabla 1. Muestras de hormigas obtenidas en cuatro municipios del departamento del Valle del Cauca.

Especie de hormiga	Número de muestras				Total
	Tuluá	Cartago	Cali	B/tura	
<i>Paratrechina longicornis</i>	2	4	6	5	21
<i>Tapinoma melanocephalum</i>	7	7	5	2	17
<i>Tetramorium bicarinatum</i>	---	1	---	---	5
<i>Monomorium floricola</i>	2	---	---	---	2
<i>Pheidole</i> sp 1.	1	1	3		1
<i>Solenopsis geminata</i>	---	---	---	1	1
<i>Monomorium pharaonis</i>	1	---	---	---	1
Total de muestras	13	13	14	8	48

--- La especie no fue capturada en esa ciudad.

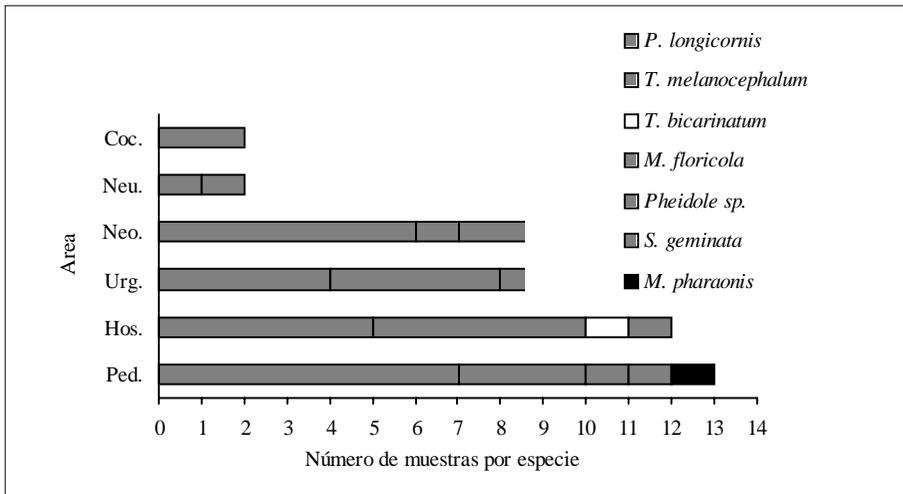


Figura 1. Frecuencia de aparición de muestras de hormigas por especie y área de atención hospitalaria. Ped: Pediatría, Hos: Hospitalización, Urg: Urgencias, Neo: Sala de neonatos, Neu: Neurología, Coc: Cocina.

Tabla 2. Frecuencia de crecimiento microbiológico obtenido a partir de todas las muestras recolectadas.

Ciudad	Crecimiento microbiológico			Total
	Muestras positivas		Muestras negativas	
	Bacterias o Hongos	Bacterias + Hongos		
Tuluá	32	2	18	52
Cartago	37	3	12	52
Cali	33	6	17	56
Buenaventura	22	2	8	32

Tabla 3. Número de aislamientos bacterianos en cada una de las ciudades

Tipo de muestra	CIUDAD												TOTAL (%)
	TULUÁ			CARTAGO			CALI		BUENAVENTURA				
	H	S	A	H	S	A	H	S	A	H	S	A	
<i>Bacillus sp.</i>	2	9	11	1	15	7	6	8	10	6	5	3	83 (50.3)
<i>Staphylococcus sp coag. (-) *</i>	0	1	0	6	4	2	3	7	3	1	4	4	35 (21.2)
<i>Micrococcus sp.</i>	3	5	2	0	1	5	2	0	1	1	0	1	21 (12.7)
<i>Acinetobacter bawmanii *</i>	1	1	0	0	1	0	-	2	-	-	-	-	5 (3)
<i>Enterobacter cloacae *</i>	1	0	1	-	-	-	0	2	0	-	-	-	4 (0.6)
<i>Staphylococcus aureus *</i>	0	1	0	1	0	0	-	1	-	0	0	1	4 (0.6)
<i>Serratia liquefaciens *</i>	0	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (1.8)
<i>Enterobacter agglomerans *</i>	0	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (1.2)
<i>Streptococcus grupo D (no enterococo) *</i>	-	-	-	-	-	-	1	1	0	-	-	-	2(1.2)
<i>Enterococcus sp. *</i>	-	-	-	-	-	-	0	1	1	-	-	-	2 (1.2)
<i>Acinetobacter lwoffii *</i>	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.6)
<i>Acinetobacter calcoaceticus *</i>	0	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.6)
<i>Serratia marcescens *</i>	-	-	-	-	-	-	0	1	0	-	-	-	1 (0.6)
<i>Escherichia coli *</i>	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1 (0.6)
Total por tipo de muestra	7	22	14	11	21	14	12	23	15	8	9	9	
Total por ciudad		43			46			50			26		165

0 = No creció en esa muestra, - = No creció en ninguna de las tres muestras, H = hormiga, S= suelo, A= ambiente, * = Considerados patógenos nosocomiales.

(21%) y sala de neonatos (19%), donde solo se encontraron tres especies.

Aislamiento de microorganismos

Se obtuvo un total de 192 muestras entre las cuatro ciudades (Tabla 2), de las cuales el 71.4% fueron positivas para el crecimiento de microorganismos: 124 muestras correspondieron a bacterias o bacterias más hongos y 13 muestras exclusivamente a hongos.

Se procesaron exclusivamente las muestras conteniendo bacterias o bacterias más hongos. Se aislaron 165 colonias agrupadas en 14 tipos bacterianos (Tabla 3). A partir de las muestras de hormigas se aislaron 38 colonias y las restantes se aislaron de los controles (suelo y aire). El número promedio de aislamientos por ciudad fue de 41 con un mínimo de 26 para Buenaventura y un máximo de 50 para Cali. *Bacillus sp.* fue la bacteria que más frecuentemente creció (50,3%), principalmente en los controles de cada ciudad, excepto en Buenaventura. Entre los cocos Gram positivos, *Staphylococcus sp. coagulasa (-)*, presentó la segunda frecuencia de aparición de todas las cepas aisladas (21.2%) y *Micrococcus sp.* alcanzó un 12.7%. Las bacterias restantes representaron menos del 4%.

Con un análisis detallado de cada de las 165 colonias obtenidas y específicamente de las halladas sobre hormigas, se com-

probó que los aislamientos bacterianos estuvieron representados en cinco especies de hormigas y solo en cuatro de ellas se hicieron aislamientos patogénicos exclusivos, es decir no crecieron en los controles de esa misma muestra (Tabla 4). Los patógenos aislados exclusivamente fueron ocho: *Acinetobacter bawmanii*, *A. calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp coagulasa (-), *Escherichia coli*, y *Streptococcus* del grupo D de Lancefield (no enterococo). *T. melanocephalum* fue la especie de hormiga a partir de la cual se aisló mayor número de especies patogénicas (62.5%). Del resto de hormigas se hicieron cinco aislamientos o menos.

El potencial vectorial de las hormigas medido en número de unidades formadoras de colonias (UFC) que pueden ser transportadas, osciló entre 1000 UFC y 2.040.000 UFC/gr (Tabla 5). Los resulta-

dos demostraron que de las cuatro especies de formícidos hallados, *T. bicarinatum* presentó el mayor recuento de UFC (2.040.000).

Discusión

Relativamente son pocas las investigaciones sobre la asociación de hormigas a centros hospitalarios, la mayoría de ellas adelantadas en regiones de Norteamérica y Europa. Para la región Neotropical, se tienen registros de aproximadamente 20 especies colectadas en hospitales de Brasil, Colombia, Chile y Trinidad (Chacón de Ulloa 2003). En el presente estudio, se registran siete especies afectando principalmente las áreas de pediatría y hospitalización. Tres de ellas, *T. melanocephalum*, *P. longicornis* y *M. pharaonis*, también fueron observadas en áreas de cuidado neonatal y pediátrico en Trinidad (Chadee y Le Maitre 1990), y en pediatría en Brasil (Fowler *et al.* 1993).

De las bacterias aisladas, algunas especies de *Bacillus* sp. se han encontrado asociadas con algún tipo de infección importante en huéspedes inmunodeficientes, pero generalmente se consideran contaminantes frecuentes de cultivos en muestras clínicas; y *Micrococcus* sp. sólo tiene una aparente capacidad patógena (Bailey y Barón 1989; Ipinza-Regla *et al.* 1981). Por lo tanto, aunque cabe la posibilidad de que el microorganismo sea transportado por la hormiga, su incidencia desde el punto de vista clínico puede ser mínima.

En orden de importancia, en cuanto a su capacidad patogénica, los bacilos Gram negativos considerados históricamente como los más virulentos (Bailey y Barón 1989) y hallados exclusivamente en las muestras de hormigas, fueron: *E. coli*, *E. agglomerans* y *E. cloacae*. *E. coli* se conoce como el patógeno humano más común y causa más frecuente de infecciones urinarias (Vélez *et al.* 1992; Jawetz *et al.* 1992), así que su transporte por hormigas podría tener importancia epidemiológica. *E. agglomerans* sólo fue hallada en una muestra en sala de neonatos y ha sido reportada en asociación con otros animales (Bailey y Barón 1989), hecho que ratifica los hallazgos obtenidos en esta investigación. *E. cloacae*, considerada dentro del género como la de mayor importancia clínica, fue encontrada en dos importantes áreas: pediatría donde los pacientes no han desarrollado todas sus defensas y cocina, área donde las condiciones de higiene deberían ser óptimas (Vélez *et al.* 1992).

Los bacilos Gram negativos no fermentadores: *A. bawmanii* y *A. calcoaceticus*, son considerados patógenos facultativos y oportunistas (Jawetz *et al.* 1992). Aunque se encuentran en la naturaleza como habitantes normales del suelo y agua y como parásitos inofensivos en mucosas del hombre y otros animales, pueden causar enfermedades por colonización y posterior infección de un huésped inmunodeficiente.

Dentro de los resultados más relevantes, se destaca el aislamiento de *S. aureus* en el área de hospitalización. Este patógeno ha sido reconocido históricamente como uno de los principales agentes etiológicos de las infecciones nosocomiales por su alta virulencia (Bailey y Barón 1989). Por su parte, los estafilococos coagulasa negativos han surgido como patógenos importantes, en los últimos 30 años (Jawetz *et al.* 1992). Durante el estudio se hicieron 35 aislamientos

Tabla 4. Colonias patogénicas aisladas exclusivamente de hormigas

ESPECIE DE HORMIGA	TOTAL COLONIAS PATOGENICAS Vs. EXCLUSIVAS DE HORMIGAS								TOTAL/ESPECIE DE HORMIGA
	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulasa (-)	<i>Streptococcus</i> sp. Grupo D no enterococo	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter bawmanii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	
<i>Tapinoma melanocephalum</i>	5/3	1/1	1/1	1/1	0	0	1/1	0	9/7
<i>Paratrechina longicornis</i>	4/2	0	0	0	1/1	0	0	0	5/3
<i>Pheidole</i> sp 1.	1/0	0	0	0	0	0	0	0	1/0
<i>Monomorium pharaonis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1/1	1/1
<i>Tetramorium bicarinatum</i>	0	0	0	0	0	1/1	0	0	1/1
TOTAL DE COLONIAS	10/5	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	17/12

Tabla 5. Patógenos aislados en las especies de hormigas encontradas

Especie de hormiga	Ciudad y área	especie patógeno	UFC/GR
<i>Tapinoma melanocephalum</i>	Cali, neurología	<i>Streptococcus</i> sp Grupo D	1.024.000
	Cartago, neonatos	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Rec (-) Tio (+)
	Cartago, pediatría	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	364.000
	Cartago, pediatría	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulasa (-)	440.000
	Tuluá, urgencias	<i>Acinetobacter bawmanii</i>	416.000
<i>Paratrechina longicornis</i>	Cartago, urgencias	<i>Escherichia coli</i>	130.000
<i>Tetramorium bicarinatum</i>	Cartago, hospitalización	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.240.000
<i>Monomorium pharaonis</i>	Tuluá, pediatría	<i>Enterobacter cloacae</i>	Rec (-) Tio (+)

de este patógeno, convirtiéndose, a pesar de su escasa virulencia, en el patógeno más frecuente.

Aunque la mayoría de infecciones oportunistas o nosocomiales son debidas a microorganismos de baja virulencia, sean de la flora corporal o ambiental, muchas de ellas tienen un principio multifactorial, donde la inesperada combinación de un buen agente infeccioso, un huésped inmunosuprimido y un medio ambiente propicio para el asentamiento del patógeno, podrían conllevar a un cuadro infeccioso.

Relación hormiga-patógeno

De acuerdo con los hallazgos anteriormente descritos, la capacidad de los formícidos para transportar patógenos nosocomiales es elevada (Hughes *et al.* 1989). De 14 microorganismos aislados en toda la investigación (Tabla 3), fue posible obtener exclusivamente ocho tipos de patógenos de las hormigas, lo cual representa más del 50% (Tabla 4).

La gran mayoría de las investigaciones realizadas a este respecto se han centrado en el estudio de *Monomorium pharaonis* (Hormiga faraona) (Eichler 1990; Chadee *et al.* 1990; Edwards 1981) e *Iridomyrmex humilis* (Hormiga Argentina) (Ipinza-Regla *et al.* 1981). Es de destacada relevancia y aporte al conocimiento científico a nivel nacional y mundial, encontrar otras especies de hormigas con potencial capacidad vectorial mecánica para el transporte de patógenos intrahospitalarios; en este caso *T. melanocephalum*, *P. longicornis*, *T. bicarinatum* y *Pheidole* sp. *T. melanocephalum* fue la especie que presentó la tasa más alta de asociación con patógenos (55.55%) durante la investigación. Los hallazgos son preocupantes, más aún cuando se comparan con datos reportados por Fowler *et al.* (1993) en Brasil, quienes mencionan que aunque *P. longicornis* y *T. melanocephalum* pueden ser vectores mecánicos de patógenos intrahospitalarios en ese país, la "hormiga fantasma" *T. melanocephalum* tiene una baja tasa de asociación con patógenos.

Los recuentos de las unidades formadoras de colonia (UFC) sugieren que entre las cuatro especies de formícidos de las cuales se encontró asociación con algún tipo de patógeno nosocomial, *T. bicarinatum* podría comportarse como mejor vector mecánico. No obstante esta aseveración depende estrechamente, tanto de los patógenos que pueda transportar la hormiga, como del grado de asepsia del lugar donde sea tomada la muestra.

Con esta investigación se demuestra la capacidad de dispersión de patógenos a

través, no solo de una, sino de varias especies de hormigas frecuentemente asociadas con el hombre y particularmente a centros hospitalarios. Se hace imperativo avanzar en el estudio de medidas de control apropiadas para ser utilizadas en un ecosistema artificial tan propicio para las hormigas y otros insectos como es una institución prestadora de servicios de salud, pero tan difícil de manejar desde el punto de vista de la inocuidad de los productos, por la condición obvia de desventaja inmune y alto riesgo de contaminación a la que está expuesta su población.

Agradecimientos

Al Programa Nacional de Ciencias y Tecnología de la Salud - COLCIENCIAS y a la Universidad del Valle por la financiación del estudio (código: 1106-04-014-99).

Al Laboratorio Clínico del Hospital Universitario del Valle "Evaristo García", donde se procesaron todas las muestras microbiológicas y a la Bacterióloga Paula Andrea Ocampo, quien realizó la identificación de todos los microorganismos aislados. A Paulina Muñoz y Philip Silverstone-Sopkin por la revisión del manuscrito.

Literatura citada

- BAILEY, R.; BARON, E. J. 1989. Diagnóstico microbiológico. Ed. Panamericana. Buenos Aires - Argentina. 879p.
- BEATSON, S. H. 1972. Pharaoh's ants as pathogen vectors in hospitals. *The Lancet*, 19: 425 - 426.
- BUENO, O. C.; FOWLER, H.G. 1994. Exotic ants and native ant fauna of Brazilian hospitals. p: 191-198. En: Williams D. F. (eds.). *Exotics Ants: Biology, Impact and Control of Introduced Species*. Westview Press. Boulder, U.S.A. 400 p.
- CHACÓN DE ULLOA, P. 2003. Hormigas urbanas. p. 351-359. En: Fernández F. (ed.). *Introducción a la hormigas de la región Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. 398 p.
- CHADEE, D. D.; LE MAITRE, A. 1990. Ants: Potential mechanical vectors of hospital infections in Trinidad. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 297.
- EDWARDS J. P. 1981. The biology, importance and control of pharaoh's ant (*Monomorium pharaonis* L.) infestations in hospitals. *Nursing Times*. 77(9): 2-4.
- EICHLER, W. 1990. Health aspects of *Monomorium pharaonis*. p. 671-675. En: Vander Meer R. K. Jaffé & A. Cedeño (eds.). *Applied Myrmecology: A world*

perspective. Westview press. Boulder, U.S.A. 741 p.

- FERNÁNDEZ, H.; ZAROR, L. 1971. *Blatella germanica* (cucaracha), como vector intrahospitalario de *Pseudomonas aeruginosa*. *Boletín del Instituto de Bacteriología Chile*. 13:105.
- FOWLER, H. G.; BUENO, O. C.; SADAT-SUNE, T.; MONTELLI, A. C. 1993. Ants as potential vectors of pathogens in hospitals in the state of Sao Paulo, Brazil. *Insect Science and its Application* 14(3): 367-370.
- HUGHES D. E.; KASSIM, O. O.; GREGORY, J.; STUPART, M.; AUSTIN, L.; DUFFIELD, R. 1989. Spectrum of bacterial pathogens transmitted by Pharaoh's ants. *Laboratory Animal Science* 39(2):167-8.
- IPINZA-REGLA, J.; FIGUEROA, G.; OSORIO, J. 1981. *Iridomyrmex humilis* "hormiga argentina", como vector de infecciones intrahospitalarias. I Estudio Bacteriológico. *Folia Entomológica Mexicana*. 50: 81-96.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. 1992. *Microbiología médica*. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México. 700 p.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. 2001. *Diagnóstico microbiológico y atlas a color*. Editorial Médica Panamericana, 5a edición. Argentina, 432 p.
- LOZANO, T. M.; CHACÓN DE ULLOA, P.; ARMBRECHT, I. 1999. Hormigas en habitaciones humanas y centros hospitalarios de la ciudad de Cali - Colombia. Resúmenes XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas p 208. Cali.
- LOZANO, M. M.; CHACÓN DE ULLOA, P. 2001. Hormigas urbanas en el Valle del Cauca: diversidad, incidencia e identificación. Resúmenes XXVIII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología p 8. Pereira.
- OLAYA, L. A.; CHACÓN, P. 2001. Hormigas asociadas a centros hospitalarios del Valle del Cauca. Resúmenes XXXVI Congreso de la Asociación de Ciencias Biológicas, Cartagena.
- REYES, H.; SHENONE, H. 1961. Algunos conceptos sobre vectores mecánicos y criterios de control. *Boletín Chileno de Parasitología*. 16: 66-68.
- TAYLOR, M. R. H.; KERRISON, T.; KEANE, C. T.; STONGE, J. L. 1979. Simple and effective measures for control enteric cross infections in children hospitals. *Lancet*. 1: 865.
- VÉLEZ, H.; ROJAS, W.; BORRERO, J.; RESTREPO, J. 1992. *Fundamentos de Medicina: Enfermedades infecciosas*. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 622 p.

Sucesión de la entomofauna cadavérica y ciclo vital de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) como primera especie colonizadora, utilizando cerdo blanco (*Sus scrofa*) en Bogotá

Succession of necrophagous entomofauna and life cycle of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) as the first colonizer species, using white pig (*Sus scrofa*) in Bogotá

GINNA CAMACHO C.¹

Resumen. Este es el primer estudio de sucesión de fauna cadavérica en la sabana de Bogotá. Se determinó la sucesión de la entomofauna cadavérica y la aproximación al cálculo del Intervalo *postmortem* (IPM) utilizando como biomodelo cerdo blanco (*Sus scrofa*). Durante seis meses se coleccionaron 3.497 individuos de insectos, donde las familias más abundantes correspondieron a Muscidae, Fannidae, Calliphoridae y Silphidae. Los géneros más abundantes correspondieron a *Chloroprocta* (Diptera: Calliphoridae), *Fannia* (Diptera: Fannidae), *Muscina* (Diptera: Muscidae), *Coproica* (Diptera: Sphaeroceridae), y *Onthophagus* (Coleoptera: Scarabaeidae), y las especies *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae), *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) y *Oxelytrum discicolle* (Brullé) (Coleoptera: Silphidae). Se diferenciaron cinco estados de descomposición: fresco (2 días), hinchado (13 días), descomposición activa (5 días), descomposición avanzada (41 días) y restos secos (123 días). Se elaboró una tabla de probabilidad de aparición de familias a lo largo de cada uno de los días de muestreo. *Calliphora vicina* fue la primera colonizadora con un ciclo de desarrollo de 38 días. Se construyeron curvas de crecimiento y desarrollo ajustando un modelo estadístico para el estado larval. Se demostró la eficacia de las curvas de crecimiento y desarrollo de la sucesión de fauna cadavérica y de la tabla de probabilidad en la resolución de un caso forense.

Palabras Clave: Entomología forense. Sucesión de Insectos. Intervalo *postmortem* (IPM).

Summary. This it is the first succession study of cadaverous fauna in the sabana de Bogotá. The succession of cadaverous entomofauna and the approximation of the calculation of the *postmortem* interval (PMI) was determined using white pig (*Sus scrofa*) as a biomodel. During six months 3,497 individuals insect were collected. The most abundant families were Muscidae, Fannidae, Calliphoridae and Silphidae. The most abundant genera were *Chloroprocta* (Diptera: Calliphoridae), *Fannia* (Diptera: Fannidae), *Muscina* (Diptera: Muscidae), *Coproica* (Diptera: Sphaeroceridae), and *Onthophagus* (Coleoptera: Scarabaeidae), and the species *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae), *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) and *Oxelytrum discicolle* (Brullé) (Coleoptera: Silphidae). Five states of decomposition were differentiated: fresh (2 days), inflation (13 days), active decomposition (5 days), advanced decomposition (41 days) and dry remains (123 days). A table of the probability of appearance of the families was elaborated along each one of the days of sampling. *Calliphora vicina* was the first colonizer with a development time of 38 days. Growth and development curves were built adjusted to a statistical model for the larval stage. The effectiveness of the curves of growth and development of the succession of cadaverous fauna and of the probability table were demonstrated in the resolution of a forensic case.

Key words: Forensic Entomology. Insect succession. *postmortem* interval (IPM).

Introducción

La entomología forense es el uso de los insectos y otros artrópodos como herramienta y evidencia en asuntos legales (Catts y Goff 1992; Anderson 1997; Catts y Haskell 1997). Una de sus categorías es la entomología médico legal, la cual reviste un gran interés porque es una herramienta valiosa que aporta evidencia en

casos de homicidio, suicidio, violación, negligencia, toxicología, traslado de cuerpos, y determinación de intervalos *postmortem* (IPM) (Byrd y Castner 2001). Su objetivo principal es identificar los artrópodos asociados con tales casos y analizar los datos entomológicos para interpretar la evidencia de insectos contribuyendo a la determinación del tiempo, causa, manera y lugar de la muerte

(Anderson 1997; Benecke 1998; Campobasso *et al.* 2001).

Para determinar el IPM existen dos métodos que se pueden utilizar conjuntamente o por separado, dependiendo del tipo de restos encontrados. El primero se basa en la estimación de la edad de las larvas y su tasa de desarrollo, el segundo utiliza la sucesión de insectos en la descompo-

¹ Esp. Investigación Criminal. Laboratorio de Entomología Forense. División de Investigación Científica. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Calle 7ª. N° 12-61. Torre C. Piso 2. Bogotá. Colombia. Correo electrónico: ginnacamacho@gmail.com

sición de un cadáver. En general, en las primeras fases de descomposición las estimaciones se basan en el estudio del crecimiento de una o dos especies de insectos, mientras que en las fases más avanzadas se utiliza la composición y grado de crecimiento de la comunidad de artrópodos encontrada en el cadáver y se compara con patrones conocidos de sucesión de fauna para el hábitat y las condiciones más próximas (Magaña 2001). En el presente estudio se utilizaron los dos métodos en la resolución de un caso forense.

La sucesión de especies en un cuerpo sigue un orden determinado dependiendo de las condiciones del cadáver y de las variables ambientales y geográficas (Early y Goff 1986; Anderson y VanLaerhoven 1996; Byrd y Castner 2001). El presente trabajo se realizó en la ciudad de Bogotá utilizando como biomodelo un cerdo blanco (*Sus scrofa*) desnudo de 22 kg., ya que se asemeja al ser humano en cantidad de vello, tamaño del torso, fauna intestinal, hábitos alimenticios y procesos de descomposición (Goff y Flynn 1991; Shean *et al.* 1993; Anderson y VanLaerhoven 1996; Komar y Beattie 1998).

La investigación de la entomología forense en Colombia se está desarrollando principalmente en las ciudades de Cali (Olaya 1999, 2001; Barreto *et al.* 2002), Bogotá (Usaquen y Camacho 2000, 2002; Arias *et al.* 2002; Jiménez *et al.* 2002; Camacho 2003, 2004a, 2004b, 2005; Cañón y Segura 2003; Jiménez y Latorre 2003), Medellín (Wolff y Uribe 2000; Wolff *et al.* 2001, 2004a, 2004b) y Tunja (Daza y Vanegas 2003). Sin embargo, para aplicar esta ciencia a la investigación criminal se hace necesario realizar estudios que incluyan el conocimiento de las especies de insectos que colonizan un cadáver durante sus diferentes estados de descomposición, al igual que la duración de cada uno de ellos en condiciones naturales de temperatura y altitud, como se realizó durante el presente estudio, entre junio y diciembre de 2001.

Materiales y Métodos

El estudio se desarrolló en el Centro de Investigación Tibaitatá (4° 42' Latitud Norte y 74° 12' Longitud Oeste), ubicado en la sabana de Bogotá, municipio de Mosquera, con una altitud de 2.543 msnm, temperatura media 13° C, provincia de humedad subhúmeda, precipitación media 751 mm anuales, relieve plano.

a) Fase de campo

Un cerdo de 22 Kg. aproximadamente fue sacrificado por dos proyectiles de arma de fuego, uno en la cabeza y otro en el tórax, con un revolver calibre 38 corto, en el mismo sitio donde se dejó el cuerpo, anotando la hora de muerte. El cerdo se protegió de posibles predadores con una jaula de malla metálica de 150cm x 100cm x 55cm.

Los datos ambientales de los días no muestreados se obtuvieron directamente de la estación meteorológica del IDEAM ubicada en Tibaitatá. Se realizaron observaciones y muestreos diarios por un período de seis meses, hasta que el cerdo alcanzó el estado de descomposición activa y después cada tres días. Se registraron las variables de temperatura ambiental, temperatura rectal del cerdo, humedad relativa y fenómeno de descomposición correspondiente.

Durante cada muestreo larvas o adultos de los insectos se coleccionaron, rotularon y preservaron en alcohol al 70%. Los insectos adultos que se encontraron sobre el cerdo y ubicados bajo éste, al igual que los que estaban en la región aledaña al cadáver se llevaron al laboratorio para su identificación taxonómica.

b) Fase de laboratorio

Una parte de las posturas colectadas durante la fase de campo se cultivaron hasta el estado adulto para facilitar su identificación taxonómica, las larvas de tercer estadio se aclararon y montaron en bálsamo de Canadá. La otra parte de las posturas, de los primeros colonizadores que llegaron en estado fresco, se cultivaron en hígado humano, empleando el procedimiento propuesto por Catts y Haskell (1997). Se cultivaron seis posturas, cada una con tres réplicas, para un total de 18 cultivos.

Diariamente, hasta alcanzar la fase de pupa, tres individuos de cada cultivo se midieron (largo corporal y ancho corporal), registrando la temperatura y humedad relativa de cada uno de los cultivos y de la masa larval. Posteriormente, los individuos se midieron cada tres días hasta su emergencia en cada cultivo. El material obtenido durante el estudio se utilizó para iniciar la colección de referencia de entomología forense en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses y en el Instituto de Ciencias Naturales.

c) Análisis estadístico

Se construyó una gráfica de abundancia durante la sucesión, con las principales

familias de interés forense de los órdenes Díptera y Coleoptera, para interpretar su comportamiento a lo largo del tiempo. Se elaboró una tabla de probabilidad de aparición de familias de interés forense, en cada uno de los días de muestreo, para los estados larval y adulto como una herramienta muy valiosa en el estudio de la sucesión de fauna cadavérica y la determinación del IPM.

En cuanto a los cultivos de los dípteros colonizadores, antes de efectuar el análisis, se aplicó un test de normalidad (prueba de Chapiro Wilks) para saber si los datos obtenidos tenían o no una distribución normal. Posteriormente, se realizaron curvas de crecimiento y desarrollo hasta el estado adulto de la especie colonizadora dentro de un intervalo de confianza del 95% y se construyó un modelo ajustado para el crecimiento larval, utilizando un análisis multivariado de varianza y procedimientos de cómputos máximos de probabilidad con medidas repetidas, aplicando el algoritmo EM (Laird *et al.* 1987) para la determinación del IPM.

Resultados y Discusión

Fenómenos cadavéricos y artrópodos asociados

Estado Fresco. El estado fresco de descomposición cadavérica tuvo una duración de dos días, cifra similar a la obtenida en otros trabajos (Early y Goff 1986; Anderson y VanLaerhoven 1996; Wolff *et al.* 2001). Esta fase se inició con los fenómenos abióticos (Calabuig 1991; Vásquez 2000; Campobasso *et al.* 2001) en el momento de la muerte y finalizó cuando se empezó a observar la hinchazón del cadáver. La temperatura corporal del cerdo descendió (*algor mortis*) hasta igualar la del ambiente; la humedad relativa osciló entre 82% y 85% (Fig. 1). Se observaron livideces (*livor mortis*) de color rojo violáceo, principalmente en la región abdominal. En el segundo día de muestreo se hizo evidente la rigidez del cuerpo (*rigor mortis*) y ningún olor estuvo asociado con los restos. Dando inicio al período cromático (Calabuig 1991; Magaña 2001), se observó la formación de la mancha verde en la fosa iliaca derecha, la cual fue tomando posteriormente un color negruzco.

Algunos insectos de las familias Sarcophagidae y Sepsidae sobrevolaron alrededor del cadáver el mismo día de la muerte. En comparación con los trabajos de Early y Goff (1986), Olaya (1999), Wolff *et al.* (2001), la familia Sarco-

phagidae también se coleccionó en estado fresco. La familia Sepsidae no estuvo presente durante este período en los trabajos realizados por Early y Goff (1986), Anderson y VanLaerhoven (1996), Wolff *et al.* (2001), pero si apareció en el estudio de Olaya (1999) en el mes de mayo en la ciudad de Cali.

En el segundo día de descomposición se coleccionaron huevos de *Calliphora* sp., siendo los más abundantes durante el período fresco y adultos de *Calliphora vicina*, que fue la primera especie en colonizar el cadáver, también se encontraron individuos de la familia Delphacidae (Tabla 1). En contraste con los estudios de Early y Goff (1986), Anderson y VanLaerhoven (1996), Olaya (1999), Wolff *et al.* (2001), la familia Calliphoridae también apareció durante este período, pero no la especie *Calliphora vicina*, que desde el punto de vista forense es el grupo más importante involucrado en la sucesión de un cadáver en regiones templadas (Smith 1986).

En la información publicada por Smith (1986), Greenberg (1991), Goff (1993) y Byrd y Castner (2001) se reconoce a los miembros de la familia Calliphoridae como los primeros insectos en descubrir y colonizar restos humanos. En el presente trabajo, aunque la familia Calliphoridae hizo su aparición durante el estado fresco, no fue el primer grupo en descubrir el cadáver de cerdo blanco (*Sus scrofa*).

Así mismo, se coleccionaron dos posturas de dípteros colonizadores, una se recogió en la boca y la otra en la frente, cerca de la herida que dejó el primer proyectil de arma de fuego; también se observaron pequeñas posturas en la herida del tórax y en el hocico. Después de su cultivo hasta el estado adulto se observó que pertenecían a la especie *Calliphora vicina*.

Estado hinchado. El estado hinchado de descomposición cadavérica tuvo una duración de 13 días. Esta fase se inició cuando los gases empezaron a acumularse en el cadáver, presentándose hinchazón en la cabeza, tórax y distensión en el abdomen, debido a los gases producidos por la actividad metabólica de bacterias anaerobias que causaron primero una inflamación ligera del abdomen, la cual fue aumentando gradualmente hasta asumir una inflamación total (Calabuig 1991). El color del cuerpo cambió, presentando una extensa mancha blanca en el abdomen y petequias en el vientre. Los fluidos corporales empezaron a filtrarse por

las aberturas naturales de la cabeza y por la herida del tórax; un fuerte olor de putrefacción se hizo evidente, principalmente hacia el recto. La temperatura rectal mostró alguna dispersión y una tendencia a aumentar durante los días 8 al 9 y 13 al 15 (Fig. 1).

Se encontraron huevos de la familia Calliphoridae; larvas de *Calliphora* sp., *Lucilia sericata*, y adultos de los géneros *Chloroprocta* sp., *Cochliomyia* sp., *Comptosyriops* sp., *Fannia* sp., *Muscina* sp., *Coproica* sp., y de las especies *Lucilia sericata*, *Calliphora vicina* y *Oxelytrum discicolle* (Tabla 1). Así mismo se coleccionaron cuatro posturas más de dípteros colonizadores. Una se recogió en el hocico, otra en la superficie de la lengua, otra en el mentón y la última se recogió en el abdomen. Todas se llevaron al laboratorio para cultivo y correspondieron a la especie *Calliphora vicina*.

El estado hinchado de descomposición duró cuatro días más que lo observado en el estudio de Anderson y VanLaerhoven (1996), ocho días más que en el realizado por Early y Goff (1986) y Wolff *et al.* (2001) en Medellín; éstos días de diferencia con respecto a los trabajos mencionados puede deberse a las condiciones bioclimáticas de la Sabana de Bogotá. Por otro lado el incremento de la temperatura rectal durante algunos días (Fig. 1) podría explicarse, tanto por los procesos de putrefacción como por las actividades metabólicas y físicas de las masas larvales, como lo mencionan algunos autores en sus trabajos (Early y Goff 1986; Goff y Flynn 1991; Anderson y VanLaerhoven 1996).

Al igual que en el trabajo de Wolff *et al.* (2001), durante esta fase se encontraron huevos de Calliphoridae, larvas de *Lucilia* y Sarcophagidae, adultos de Calliphoridae y Muscidae. Se mantuvo la familia Sepsidae, al igual que en los trabajos de Anderson y VanLaerhoven (1996) y Olaya (1999). También hicieron su aparición, aunque en muy bajo número, adultos de las familias Silphidae y Staphylinidae (Tabla 1), como en el trabajo de Anderson y VanLaerhoven (1996).

Estado de descomposición activa. El estado de descomposición activa duró cinco días. Comenzó con el colapso del tórax y la deflación del cuerpo cuando la epidermis se rompió como consecuencia de la presión de los gases putrefactos y la alimentación de las larvas de Diptera (Calabuig 1991; Komar y Beattie 1998). Los fluidos corporales salieron copiosa-

mente por la herida del tórax y el recto, el cual se reventó perdiendo su forma y dejando entrever algunas vísceras. En el abdomen, alrededor de las vísceras, se fijó una extensa mancha negra y un fuerte olor de putrefacción estuvo asociado con el cadáver. La temperatura rectal estuvo entre 14°C y 18°C, la temperatura ambiental se mantuvo entre 15°C y 17°C y la humedad relativa osciló entre 72% y 80% (Fig. 1).

En este estado de descomposición, solo se hicieron presentes los órdenes Diptera y Coleoptera (Tabla 1), siendo las larvas de *Lucilia sericata* las más abundantes. Con respecto a los adultos, la familia Muscidae tuvo el mayor número de individuos, seguida por Sepsidae, Calliphoridae y Sarcophagidae.

El estado de descomposición activa duró un día menos que lo observado por Anderson y VanLaerhoven (1996) y Wolff *et al.* (2001) en sus respectivos estudios. Por otra parte, se coleccionaron individuos de *Lucilia* sp. en estado larval y adulto, como en los trabajos de British Columbia y Medellín durante este mismo estado de descomposición. Como en Medellín, se encontraron las familias Calliphoridae, Muscidae y Sarcophagidae, del orden Diptera, Silphidae y Staphylinidae, del orden Coleoptera.

Estado de descomposición avanzada. El estado de descomposición avanzada duró 41 días. Esta fase se inició con la pupación de las larvas de Diptera y la aparición de las larvas de Coleoptera. A lo largo de esta fase hubo gran remoción de tejido blando. El olor asociado fue menos intenso que en la fase anterior. Aunque durante esta fase no había un orificio rectal definido, se registró la temperatura durante el período que se mantuvieron presentes los órganos abdominales. Los datos indicaron que la temperatura rectal se mantuvo por encima de la ambiental, a excepción del día 24 de la sucesión, en el que la temperatura ambiental estuvo 8° C por encima de la temperatura rectal. Tanto los valores de temperatura como de humedad relativa fluctuaron bastante durante este período (Fig. 2).

Colonizaron el cuerpo larvas de *Oxelytrum discicolle*, aumentó el número de adultos de Silphidae y Staphylinidae, con respecto a la fase anterior. La familia Muscidae manifestó su mayor actividad y abundancia durante este período con respecto a toda la sucesión. La familia Phoridae hizo su reaparición y el número de individuos de la familia Sphaeroceridae aumentó en comparación con las

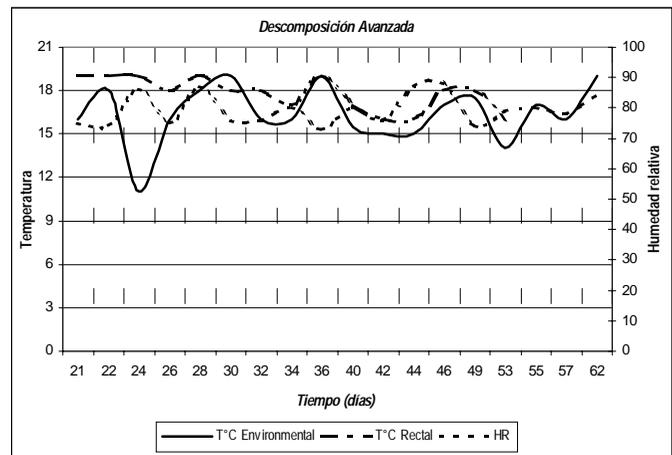
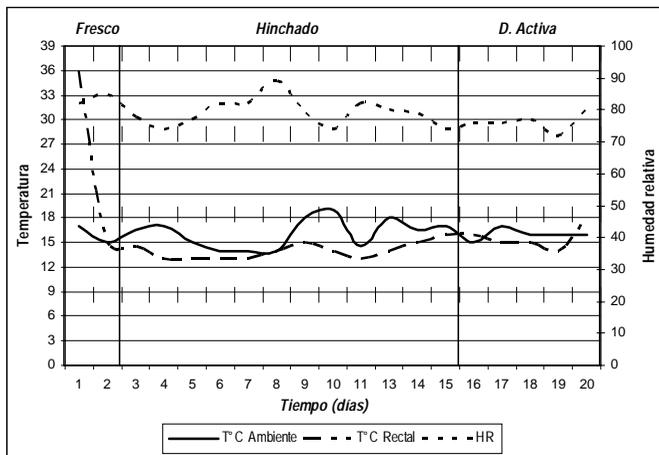


Figura 1. Curvas de temperatura ambiental, temperatura rectal y humedad relativa para los estados de descomposición fresco, hinchado y de descomposición activa.

Figura 2. Curvas de temperatura ambiental, temperatura rectal y humedad relativa para el estado de descomposición avanzado.

fases anteriores. También apareció la familia Pseudocheilidae del orden Acari. Se coleccionaron individuos de los géneros *Fannia*, *Muscina* y *Coproica*, del orden Diptera (Tabla 1).

El estado de descomposición avanzada duró dos días más que en el trabajo de Wolff *et al.* 2001 y quince días más que en el estudio de Anderson y VanLaerhoven (1996). En comparación con el trabajo de Medellín (Wolf *et al.* 2001) se encontraron las familias Cleridae, Silphidae, Histeridae y Staphylinidae y en comparación con British Columbia (Anderson y VanLaerhoven 1996) se encontraron las familias Cleridae, Silphidae y Staphylinidae.

Estado de restos secos. El estado de restos secos tuvo una duración de 123 días hasta que se completaron los seis meses de muestreo. Este período se caracterizó por una mayor deshidratación de los restos, aunque algunas precipitaciones ocurridas durante este período rehidrataron el cuerpo en varias ocasiones. Hacia el final de este período el cuerpo quedó transformado en huesos, cartílago y pelo, con muy poco tejido blando. El olor asociado con los restos fue escaso. Durante esta fase no se registraron valores de temperatura rectal. La temperatura ambiental y la humedad relativa fluctuaron considerablemente.

En esta fase se mantuvieron presentes las familias Pseudocheilidae, del orden Acari; Silphidae y Staphylinidae, del orden Coleoptera, al igual que Phoridae, Sarcophagidae, Sepsidae, Sphaeroceridae, los géneros *Fannia* y *Muscina*, del orden Diptera. Llegaron al cuerpo por primera vez larvas y adultos de la familia Elateridae (Tabla 1).

Tabla 1. Sucesión de entomofauna en el cerdo blanco (*Sus scrofa*)

Estado Descomposición (tiempo de muerte)	Orden	Familia	Género/Especie	Estadio
Fresco (día 0-2)	Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	H
		Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>	A
		Sarcophagidae		A
		Sepsidae		A
		Delphacidae		A
Hinchado (día 3-15)	Coleoptera	Silphidae	<i>Oxelytrum discicolle</i>	A
		Staphylinidae		A
	Diptera	Anthomyiidae		L3-A
		Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	H-L2-L3
		Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>	A
			<i>Chloroprocta</i>	A
			<i>Cochliomyia</i>	A
			<i>Compsomyiops</i>	A
			<i>Lucilia</i>	L3
			<i>Lucilia sericata</i>	L3-A
		Chironomidae		A
		Clusiidae		A
		Ephydriidae		A
		Muscidae	<i>Muscina</i>	A
		Fanniidae	<i>Fannia</i>	A
	Phoridae		A	
	Sarcophagidae		L3-A	
	Scatopsidae		A	
	Sepsidae		A	
	Sphaeroceridae	<i>Coproica</i>	A	
Descomposición Activa (día 16-20)	Coleoptera	Silphidae	<i>Oxelytrum discicolle</i>	A
		Staphylinidae		A
	Diptera	Anthomyiidae		L3-A
		Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	L3
		Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>	A
			<i>Chloroprocta</i>	A
			<i>Cochliomyia</i>	A
			<i>Compsomyiops</i>	A
			<i>Lucilia</i>	L3
			<i>Lucilia sericata</i>	L3-A
	Clusiidae		A	
	Drosophilidae		A	
	Muscidae	<i>Muscina</i>	A	
	Fanniidae	<i>Fannia</i>	A	

Continuación Tabla 1.

Estado Descomposición (tiempo de muerte)	Orden	Familia	Género/Especie	Estadio	
		Odiniidae		A	
		Sarcophagidae		L3-A	
		Sepsidae		A	
		Sphaeroceridae	<i>Coproica</i>	A	
Descomposición Avanzada (21-61)	Acari	Pseudochelidae		A	
		Coleoptera	Cleridae		A
			Histeridae		A
			Silphidae	<i>Oxelytrum discicolle</i>	L-A
	Diptera	Staphylinidae		A	
		Anthomyiidae		L3-A	
		Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	L3	
			<i>Calliphora vicina</i>	A	
			<i>Chloroprocta</i>	A	
			<i>Cochliomyia</i>	A	
			<i>Cochliomyia macellaria</i>	A	
			<i>Comptosyops</i>	A	
			<i>Lucilia</i>	L3	
			<i>Lucilia sericata</i>	L3-A	
			Chironomidae		A
			Clusiidae		A
		Dolichopodidae		A	
		Drosophilidae		A	
		Ephydriidae		A	
		Muscidae	<i>Muscina</i>	L3-A	
	Fanniidae	<i>Fannia</i>	L3-A		
	Mycetophilidae		A		
	Phoridae		A		
	Sarcophagidae		L3-A		
	Sepsidae		A		
	Sphaeroceridae	<i>Coproica</i>	A		
	Restos Secos (día 62-184+)	Acari	Horpyrhynchidae		A
Pseudochelidae				A	
Coleoptera		Carabidae		A	
		Cleridae		A	
		Curculionidae		A	
		Elateridae		L-A	
		Histeridae		A	
		Leioiidae		A	
		Scarabaeidae		A	
		Silphidae	<i>Oxelytrum discicolle</i>	L-A	
		Staphylinidae		A	
		Diptera	Anthomyiidae		L3-A
Calliphoridae			<i>Calliphora vicina</i>	A	
			<i>Chloroprocta</i>	A	
			<i>Cochliomyia</i>	A	
Chironomidae				A	
Chloropidae				A	
Clusiidae				A	
Culicidae				A	
Dolichopodidae				A	
Ephydriidae				A	
Muscidae			<i>Muscina</i>	A	
Fanniidae			<i>Fannia</i>	A	
Odiniidae				A	
Phoridae				A	
Pipunculidae				A	
Sarcophagidae				A	
Sepsidae			A		
Sphaeroceridae	<i>Coproica</i>	A			

(H: huevo. L: larva. L2: ínstar larval 2. L3: ínstar larval tres. A: adulto)

Abundancia de las principales familias de Diptera y Coleoptera durante la sucesión

Durante la sucesión los órdenes Diptera y Coleoptera fueron los colonizadores más abundantes (Tabla 2). Allí se observa que la familia Muscidae fue la más abundante, su mayor actividad correspondió al segundo mes de la sucesión aunque no se hizo presente en el último mes. La familia Calliphoridae también registró su mayor actividad en el segundo mes de sucesión, manteniéndose cuatro meses seguidos, de junio a septiembre. La familia Sphaeroceridae colonizó durante los cinco primeros meses de sucesión mostrando mayor actividad durante el segundo mes. La familia Anthomyiidae aunque estuvo representada por pocos adultos, fue la única familia de Diptera que se mantuvo en todos los meses de la sucesión. La familia Phoridae registró su mayor actividad durante el quinto mes de sucesión. La familia Sarcophagidae fue abundante durante el primer mes de sucesión, manteniéndose durante dos meses más. Las familias Clusiidae y Dolichopodidae permanecieron cinco meses de la sucesión cada una. Con respecto al orden Coleoptera, Silphidae fue la familia más abundante y se mantuvo durante los cinco primeros meses de sucesión. Staphylinidae fue la única familia del orden Coleoptera que se mantuvo durante todos los meses de sucesión. Histeridae colonizó por primera vez durante el segundo mes de sucesión, reapareció el cuarto mes y se mantuvo por dos meses más.

Probabilidad de aparición de las principales familias del orden Diptera y Coleoptera

Es de gran utilidad conocer la probabilidad de aparición de las principales familias de interés forense en el estudio de la sucesión de fauna cadavérica y la determinación IPM. Por esta razón, como uno de los productos del presente trabajo, se elaboró una tabla de probabilidad para las principales familias de interés forense, durante cada uno de los días de muestreo. Sin embargo, solo se muestra una parte de la tabla (Tabla 3). Ésta indica los valores de probabilidad de aparición de cada familia durante cada uno de los días de muestreo.

La aplicación de esta tabla se da en el momento de recolección de una muestra entomológica forense. Al comparar los valores de probabilidad más altos de las familias encontradas en un momento de la sucesión de fauna cadavérica se determinan los grupos de familias presentes en un

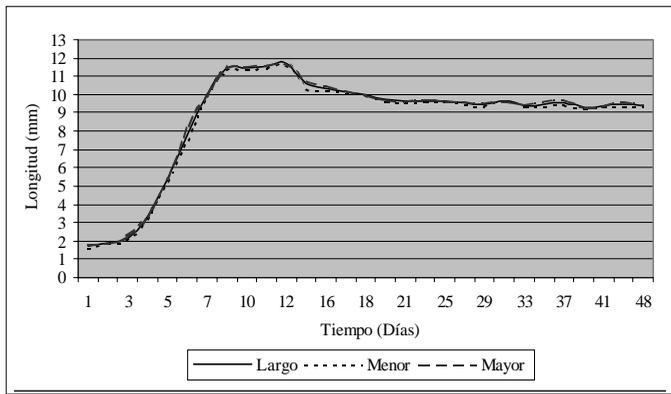


Figura 3. Curva de crecimiento y desarrollo para la variable largo corporal de *Calliphora vicina*.

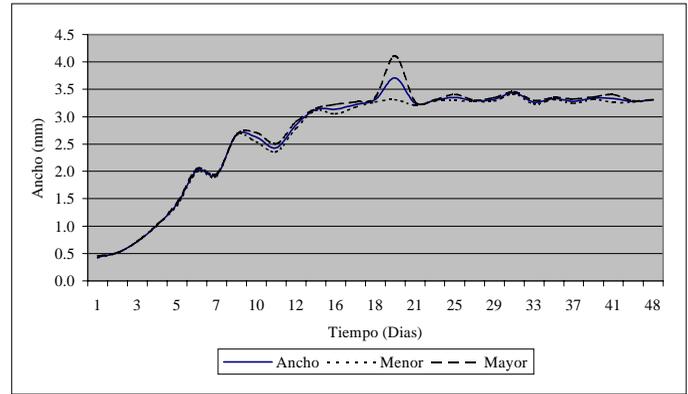


Figura 4. Curva de crecimiento y desarrollo para el ancho corporal de *Calliphora vicina*.

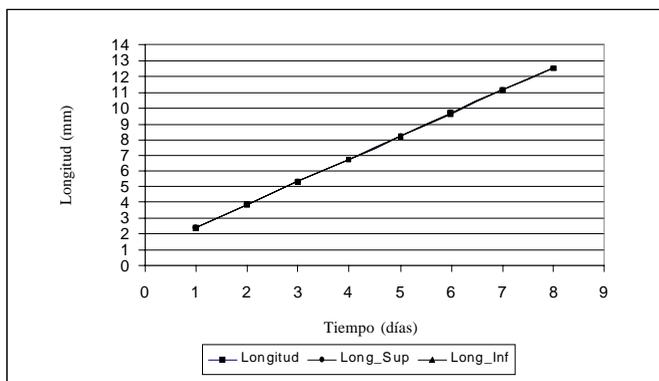


Figura 5. Curva de crecimiento larval para la variable longitud de *Calliphora vicina*. El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen así: $L = 0,946 + 1,452 t$, donde L: longitud, t: tiempo de desarrollo larval.

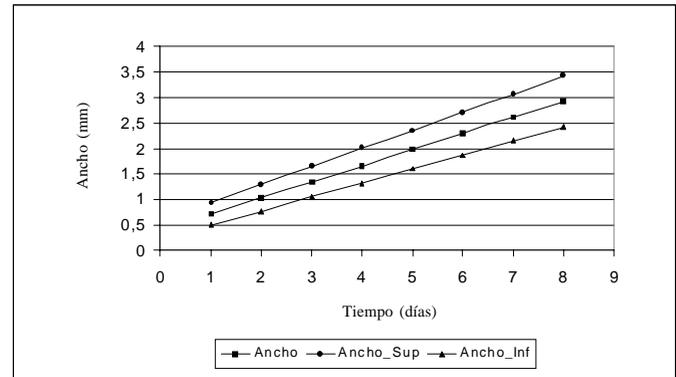


Figura 6. Curva de crecimiento larval para la variable ancho de *Calliphora vicina*. El modelo ajustado para esta variable correspondió a parámetros lineales que se definen así: $A = 0,398 + 0,316 t$, donde A: ancho, t: tiempo de desarrollo larval.

tiempo con un alto nivel de confianza (95%).

Dada la importancia del ciclo larval como método para determinar el IPM se ajustó un modelo para cada una de las variables: largo y ancho, utilizando un diseño experimental en medidas repetidas programado en la plataforma STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). Este modelo permite tener medidas más confiables de los individuos, y por lo tanto del cálculo del IPM.

Para estimar los valores promedio de longitud y ancho correspondientes a cada uno de los días de desarrollo larval y sus valores límite, se utilizó un intervalo de confianza con un alfa de 0.05. En la figura 5 se observa que la variable longitud del cuerpo de *Calliphora vicina*, presenta los intervalos superior e inferior prácticamente superpuestos sobre la longitud promedio, lo que indica que la desviación es baja. En la figura 6 se observa que la variable ancho del cuerpo, presenta los intervalos superior e inferior muy cercanos al promedio, indicando una dispersión baja.

Aplicación de la curva de crecimiento y desarrollo y de la tabla de probabilidad en la determinación del intervalo *postmortem* (IPM)

Se ensayó la curva de crecimiento y desarrollo elaborada en el presente estudio en la resolución de un caso forense. En éste se calculó el tiempo de muerte utilizando las curvas de crecimiento y desarrollo en conjunto con la tabla de probabilidad.

Descripción de Caso Los restos de una persona fueron encontrados a orillas de una quebrada en un paraje de la sabana de Bogotá. Se recolectaron muestras larvales de la familia Calliphoridae y adultos de *Calliphora vicina* y Silphidae. El estudio del ciclo de vida de las larvas a partir de ese momento hasta el estado adulto tardó 24 días, dando como resultado adultos de *Calliphora vicina*. La diferencia para alcanzar ese estado es de ocho días (teniendo en cuenta los modelos ajustados), así que el primer tiempo se calculó en 32 días. Como ya había transcurrido un ciclo completo de adultos (38 días), el intervalo *postmortem* se fijó entre 32 y 38 días. Otro elemento que se tuvo en cuenta durante

este caso fue la sucesión, en la cual Silphidae debía estar presente. De hecho así ocurrió, Silphidae como familia encontrada en la sabana de Bogotá colonizó el cuerpo durante ese período (32-38 días) en el presente caso. Este valor se verificó con el obtenido por los médicos forenses del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

Conclusiones

En general, los órdenes Diptera y Coleoptera fueron los más abundantes, tanto en número de familias, como en número de individuos, al igual que en otros trabajos realizados en el país, específicamente en Medellín y Cali.

Se construyó la tabla de probabilidad de aparición de las principales familias de interés forense, pertenecientes a los órdenes Diptera y Coleoptera, la cual tiene una aplicación forense en la determinación del intervalo *postmortem* (IPM) tras la recolección de una muestra entomológica en el lugar del deceso.

Se construyeron curvas de crecimiento y desarrollo de *Calliphora vicina* y se ajustó

tó un modelo estadístico para el estado larval, como instrumento para determinar el intervalo *postmortem* (IPM), durante las primeras fases de descomposición.

Se demostró la eficacia de las curvas de crecimiento y desarrollo, de la sucesión de fauna cadavérica y de la tabla de probabilidad en la resolución de un caso forense.

En algunos estudios en Bogotá D.C. se ha encontrado a *Lucilia sericata* como especie colonizadora de fauna cadavérica. En el presente trabajo *Calliphora vicina* fue la primera especie colonizadora de *Sus scrofa*. Estos resultados pueden sugerir la estacionalidad de estas dos especies, puesto que los experimentos se realizaron en diferentes épocas del año.

Los individuos recolectados en el presente estudio se encuentran en proceso de catalogación en el Laboratorio de Entomología Forense de la División de Investigación Científica del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, constituyendo la primera colección de referencia de entomología forense en la ciudad de Bogotá.

Agradecimientos

La autora expresa sus agradecimientos a los profesores Paulina Muñoz, William Usaquén Martínez y al grupo de entomología forense del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses – Universidad Distrital por su valiosa colaboración durante el desarrollo del trabajo. A los profesores Germán Amat, Eduardo Florez y Marta Wolff por su ayuda durante la corroboración taxonómica del material y a la Dra. Sandra Patricia Díaz por sus aportes médico forenses. Al Centro de Investigación Tibaitatá, al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

Literatura Citada

- ANDERSON, G.; VANLAERHOVEN, S. 1996. Initial studies on insect succession on carrion in Southwestern British Columbia. *Journal of Forensic Sciences* 41 (4): 617-625.
- ANDERSON, G. 1997. The use of insects to determinate time of decapitation: A case-study from British Columbia. *Journal of Forensic Sciences* 42 (5): 947-950.
- ARIAS, A.; USAQUÉN, W.; SEGURA, A.; CAÑÓN, L. 2002. Estimación de la curva de crecimiento y desarrollo en Dípteros colonizadores de hígado humano. Resúmenes. XI Congreso Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses “Desastres y derecho internacional humanitario”. CD. Manizales.
- BARRETO, M.; BURBANO, M.; BARRETO, P. 2002. Flies (Calliphoridae, Muscidae) and Beetles (Silphidae) from Human Cadavers in Cali, Colombia. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 97 (1): 137-138.
- BENECKE, M. 1998. Six forensic entomology cases: description and commentary. *Journal of Forensic Sciences* 43 (4): 797-805.
- BYRD, J.; CASTNER, J. 2001. *Forensic Entomology the Utility of Arthropod in Legal Investigations*. CRC Press LLC. U.S.A. 418 p.
- CALABUIG, J. 1991. *Medicina Legal y Toxicología*. Cuarta edición. Salvat Editores S.A. Barcelona, España. 1058 p.
- CAMACHO, G. 2003. Sucesión de la entomofauna cadavérica y ciclos de vida de las primeras especies colonizadoras, utilizando como biomodelo cerdo blanco (*Sus scrofa*) en la sabana de Bogotá. Resúmenes. XXX Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 59-60. Cali.
- CAMACHO, G. 2004a. Entomología Forense. p. 215-250. En: Sanabria, C. *Antropología Forense y la Investigación Médico-Legal de las Muertes*. Fondo Rotatorio de la Policía. Bogotá. Colombia. 445 p.
- CAMACHO, G. 2004b. Ciclo de vida de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) como primera especie colonizadora presente en hígado humano realizado en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Bogotá. 2000. *Revista del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses* 18 (2): 31-36.
- CAMACHO, G. 2005. Manejo de Muestras Entomológicas. p. 1-11. En: Manual Único de Policía Judicial. Fiscalía General de la Nación. Colombia.
- CAMPOBASSO, C.; DI VELLA, G.; INTORNA, F. 2001. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Science International* 120: 18-27.
- CAÑÓN, L.; SEGURA, A. 2003. Efecto de cianuro y barbitúricos en el ciclo de vida de dípteros colonizadores en hígados humanos bajo condiciones de campo en la Universidad Nacional de Colombia y de laboratorio en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses Regional Bogotá. Trabajo de Grado de Licenciatura en Biología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad de Ciencias y Educación, Bogotá. 122 p.
- CATTS, P.; GOFF, M.L. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology* 37: 253-272.
- CATTS, P.; HASKELL, N. 1997. *Entomology & Death a Procedural Guide*. Second Printing. Joyce's Print Shop, Inc. Clemson, South Carolina. 182 p.
- DAZA, M.; VANEGAS, Z. 2003. Caracterización de la entomofauna asociada a la descomposición cadavérica empleando el cerdo (*Sus scrofa*) como patrón para la descomposición cadavérica humana en el municipio de Tunja. Resúmenes. XXX Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 60. Cali.
- EARLY, M.; GOFF, L. 1986. Arthropod succession patterns in exposed carrion on the island of O'ahu, Hawaiian Islands, USA. *Journal of Medical Entomology* 23 (5): 520-531.
- GOFF, M.; FLYNN, M. 1991. Determination of postmortem interval by arthropod succession: a case study from the Hawaiian Islands. *Journal of Forensic Sciences* 36: 607-614.
- GOFF, M. 1993. Festín de Pruebas Insectos al Servicio Forense. Memorias. Taller de la Academia Americana de Ciencias Forenses, Reunión Anual de la AAFS. 16 febrero 1993. Boston, Massachusetts. En: Morales, M. (Traducción) Informe Científico Patología Forense No. 4 (2001). Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Colombia. p. 28-34.
- GREENBERG, B. 1991. Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology* 28 (5): 565-577.
- JIMÉNEZ, S.; LATORRE, L.; ROMAN, A.; USAQUÉN, W. 2002. Estudio preliminar de sucesión entomológica en cuerpo de cerdo domestico (*Sus scrofa*) en la estación de carabineros Parque Nacional de Bogotá. Resúmenes. XI Congreso Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses “Desastres y derecho internacional humanitario”. CD. Manizales.
- JIMÉNEZ, S.; LATORRE, L. 2003. Determinación de la incidencia del sol y la sombra en la sucesión de la entomofauna cadavérica en dos cerdos *Sus scrofa* ubicados en la estación XXVI de Carabineros Coronel José A. Ramos del Parque Nacional Bogotá. Trabajo de grado de Licenciatura en Biología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad de Ciencias y Educación, Bogotá. 159 p.
- KOMAR, D.; BEATTIE, O. 1998. Postmortem insect activity may mimic perimortem sexual assault clothing patterns. *Journal of Forensic Sciences* 43 (4): 792-796.
- LAIRD, N.; LANGE, N.; STRAM, D. 1987. Maximum likelihood computations with repeated measures: application of the EM algorithm. *Journal of the American Statistical Association* 82 (397): 97-105.
- MAGAÑA, C. 2001. La Entomología Forense y su aplicación a la medicina legal. Data de la muerte. *Aracnet 7-Bol. S.E.A* 28: 49-57.

- OLAYA, L. 1999. Estudio de la entomofauna sucesional en el cadáver de dos cánidos en condiciones de campo. Trabajo de Grado de Biología. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Cali. 96 p.
- OLAYA, L. 2001. Entomofauna sucesional en el cadáver de un cánido en condiciones de campo en la universidad del valle (Cali-Colombia). Cuadernos de Medicina Forense 23: 5-14.
- SHEAN, B.; MESSINGER, L.; PAPWORTH, M. 1993. Observations of differential decomposition on sun exposed Vs. shaded Pig Carrion in Coastal Washington State. Journal of Forensic Sciences 38: 938-949.
- SMITH, K. 1986. A Manual of forensic entomology. Department of Entomology British Museum (Natural History) and Cornell University Press. London. 205 p.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. 1979. SAS User's guide. SAS Inst. Inc., Raleigh, North Carolina.
- USAQUÉN, W.; CAMACHO, G. 2000. Caracterización de fauna cadavérica en hígado humano en descomposición realizado en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Memorias. X Congreso Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Bogotá. CD
- USAQUÉN, W.; CAMACHO, G. 2002. Sucesión de la entomofauna cadavérica en la sabana de Bogotá. Memorias. VIII Seminario de Investigaciones Biológicas. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá D.C.
- VÁSQUEZ, H. 2000. Autopsias Médico-Legales. Ediciones Depalma. Buenos Aires, Argentina. 256 p.
- WOLFF, M.; URIBE, A. 2000. Sucesión de insectos carroñeros en cerdo blanco (*Sus scrofa*). Memorias. XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 177-185. Medellín.
- WOLFF, M.; URIBE, A.; ORTIZ, A.; DUQUE, P. 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. Forensic Science International 120: 53-59.
- WOLFF, M.; GIRALDO, N.; PÉREZ, M. 2004a. Estudio de la entomofauna cadavérica encontrada en humanos alrededor de Medellín, Colombia y su aplicación en la determinación del intervalo Post mortem. Memorias. XXXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 125-130. Bogotá.
- WOLFF, M.; BUILES, A.; ZAPATA, G.; MORALES, G.; BENECKE, M. 2004b. Detección del Parathion por HPLC en la sucesión de insectos de importancia legal en Medellín-Colombia. Memorias. XXXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 135-139. Bogotá.

Recibido: 20-jul-04 • Aceptado: 22-jul-05

Nota científica

Susceptibilidad de larvas de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) de São Paulo, Brasil al *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* H-14¹

Larval susceptibility of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil to *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* H-14¹

JONNY E. DUQUE L.^{2,3}, MARIO ANTÔNIO NAVARRO-SILVA^{3,4}

Resumen. Se determinó la susceptibilidad de larvas de *Aedes albopictus* en condiciones de laboratorio de origen del "Vale do Ribeira Ilha Cumprida" São Paulo, Brasil. El producto utilizado fue *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* H-14 Vectobac-AS con 1.200 unidades internacionales de toxicidad (UIT) por miligramo. Como parámetro de comparación se empleó la colonia *Aedes aegypti* Rockefeller CDC (Center for Disease Control) de Puerto Rico. Las concentraciones letales obtenidas de *Ae. albopictus* fueron LC₅₀= 0,12 ppm y LC₉₀= 0,28 ppm y para la especie referencia *Ae. aegypti* fue CL₅₀ de 0,07 ppm y CL₉₅ de 0,17 ppm. Se puede concluir que *Ae. albopictus* presentó una respuesta al bioinsecticida diferente a *Ae. aegypti*.

Palabras clave: Control de mosquitos. Bioinsecticida. Control biológico.

Summary. The susceptibility of *Aedes albopictus* larvae, originating from "Vale do Ribeira Ilha Cumprida" São Paulo, Brasil, was determined under laboratory conditions. The product used was *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* H-14 Vectobac-AS with 1,200 international toxic units (TU) per milligram. An *Aedes aegypti* Rockefeller colony from CDC (Center for Disease Control) of Puerto Rico was used as a reference. Lethal concentrations determined for *Ae. albopictus* were LC₅₀= 0.12 ppm and LC₉₀= 0.28 ppm and for the reference species *Ae. aegypti* they were LC₅₀ 0.07 ppm and LC₉₅ 0.17 ppm. It is concluded that *Ae. albopictus* presented a different response to the bioinsecticide than *Ae. aegypti*.

Key words: Mosquito control. Bioinsecticide. Biological Control.

Introducción

Aedes albopictus Skuse, 1894 es un mosquito exótico, originario de la región sureste de Asia que se expandió rápidamente a África, Europa meridional, las Américas y también a algunas islas del océano pacífico, como en el archipiélago de Hawaii. Es posible que la introducción en el norte de América haya sido en 1946; sin embargo, el primer registro de poblaciones establecidas de este mosquito es de 1985 (Sprenger y Wuithiranyagool 1986).

Fue identificado por primera vez en Sur América en 1986 en el estado de São Paulo, Brasil, después en otros países. La entrada de este culicido al continente americano es posiblemente atribuida al comercio internacional de llantas usadas (Forattini 1986; 2002; Vélez *et al.* 1998).

La expansión global de esta especie ha alarmado a la comunidad científica por su capacidad vectorial. En laboratorio se ha demostrado la transmisión de dife-

rentes virus que originan varias enfermedades como, encefalitis japonesa, encefalitis equina venezolana, encefalitis del oeste, encefalitis San Luis, encefalitis del Oeste del río Nilo, del río Roos y Mayaro, incluidas la transmisión directa y transovárica de las arbovirosis que causan la enfermedad de dengue y fiebre amarilla (Mirchell 1991).

El primer registro de *Ae. albopictus* infectado con el virus del dengue para América fue documentado en Reynosa, México (Ibáñez-Bernal *et al.* 1997). A pesar de este descubrimiento aún no existen más referencias en todo el continente americano que incriminen este mosquito como vector del virus que trasmite el dengue.

La biología de *Ae. albopictus* es similar a la de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 y es frecuentemente colectado en recipientes naturales y artificiales donde coexisten con otros mosquitos (Hawley 1988). Una preocupación debido a esta coexistencia es el sometimiento a presión selectiva de *Ae. albopictus* por parte de los

insecticidas químicos utilizados para el control de *Ae. aegypti*.

Existen registros de poblaciones resistentes de *Ae. albopictus* a organo-fosforados así: En Vietnam a malation, en Malasia a fenitrothion, en Madagascar a fenitrothion, en la India, Malasia, Sur este Asia, Filipinas y Japón a los organoclorados DDT y dieldrin/HCH (Brown 1986). A malation en los Estados Unidos, Singapur y Sri Lanka, a DDT en Camboya, China, Indonesia, Singapur, Tailandia y Vietnam (WHO 1992; Somboon *et al.* 2003). Hasta ahora no existen casos registrados de resistencia en Sur América.

Una de las alternativas para demorar el apareamiento de la resistencia a insecticidas químicos en el continente americano es el empleo de control biológico por medio de *B. thuringiensis* var *israelensis* (Bti), ampliamente utilizado para control de *Ae. aegypti* y en pocos casos, usado para *Ae. albopictus* (Yap *et al.* 1997; 2002; Furutani y Arita-Tsutsumi 2001).

El objetivo de este trabajo consistió en determinar las concentraciones letales

1 Contribución número 1574 del departamento de Zoología de la UFPR.

2 Autor para correspondencia: M. Sc. Entomología Ph. D. (candidato). Becario CNPq. E-mail: jonnybiomat@ufpr.br; jonnybiomat@hotmail.com

3 Laboratorio de Entomología Médica y Veterinaria, Departamento de Zoología, programa de postgrado en Ciencias Biológicas, Entomología. Universidad Federal de Paraná. Curitiba-Brasil. Caja Postal 19020, 81531-980 Curitiba,PR. Teléfono: (41) 361-1763. Fax: (41) 266-2042.

4 Ph. D. Entomología. E-mail: manavarro@bio.ufpr.br.

medias CL_{50} y CL_{90} de *B. thuringiensis* H-14 Vectobac-AS en una población de larvas de tercer ínstar tardío y cuarto temprano de *Ae. albopictus* en condiciones de laboratorio, con el fin de auxiliar la comparación de la efectividad del producto entre poblaciones sudamericanas.

Materiales y Métodos

Para determinar las concentraciones letales de *Ae. albopictus* en laboratorio, se empleó el entomopatógeno *B. thuringiensis* H-14 var *israelensis* Vectobac-AS Lote 69-149-N9, con 1.200 unidades internacionales de toxicidad por miligramo (UIT), marca comercial Sumitomo Chemical, siguiendo los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (WHO 1981). La colonia usada fue originaria del "Vale do Ribeira Ilha Cumprida" San Paulo, Brasil, establecida en la sala de cría del laboratorio de Entomología Médica y Veterinaria de la Universidad Federal de Paraná en Curitiba, Brasil.

Inicialmente se evaluaron diferentes concentraciones de *B. thuringiensis* H-14. Desde 0,50 ppm hasta 0,01 ppm, para determinar los límites de mortalidad de las larvas, variando entre 99% y 1%. Se establecieron las siguientes concentraciones: 0,03 ppm, 0,12 ppm, 0,18 ppm y 0,25 ppm para *Ae. albopictus* y 0,03 ppm, 0,06 ppm, 0,18 ppm y 0,25 ppm para la colonia referencia de *Ae. aegypti* Rockefeller CDC (Center for Disease Control) de Puerto Rico.

Las anteriores concentraciones se adicionaron a recipientes plásticos de polietileno de 350 ml de capacidad, formando cinco grupos de cuatro réplicas y su respectivo control. Cada grupo constó de cinco recipientes, cada uno con veinte larvas (tercer ínstar final y/o cuarto ínstar inicial), que sumaron cien individuos, con un volumen final (agua potable +

Bti) de 150 ml. Posteriormente, se guardaron los potes con las larvas a una temperatura 25°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) con fotoperiodo 12:12 y humedad relativa de 80% ($\pm 10\%$) en cámaras climatizadas modelo CDG-347 marca FANEM.

La lectura de la mortalidad de las larvas se realizó 24 h después de la adición del producto. Los datos de CL_{50} y CL_{95} se estimaron a través de análisis Probit (Finney 1981) utilizando el programa PROBIT.

Resultados y Discusión

Bacillus thuringiensis H-14 var *israelensis* se ha convertido en el método más evaluado y seguro cuando se compara con los tratamientos tradicionales con base en insecticidas. Con todo esto, muchos trabajos están orientados para evaluar la efectividad de esta bacteria en *Ae. aegypti* y pocos en *Ae. albopictus*; sin embargo, trabajos como el de Yap *et al.* (1997, 2002), Furutani y Arita-Tsutsumi (2001) y Ali *et al.* (1995) muestran la efectividad de esta bacteria en el control de *Ae. albopictus*.

Como consecuencia de las diferentes dosificaciones del producto, se obtuvo la respuesta a Bti en porcentajes de mortalidad, resultando que la concentración letal que originó mayor mortalidad fue la de 0,25 ppm y la que originó menor mortalidad fue de 0,03 ppm. El análisis Probit arrojó la CL_{50} de 0,12 ppm y la CL_{95} de 0,36 ppm para *Ae. albopictus* y la CL_{50} de 0,07 ppm y CL_{95} de 0,17 ppm para la colonia referencia. Los datos expresaron un (c^2) bajo con pendientes altas y próximas, lo cual es importante para determinar que las poblaciones tuvieron una respuesta uniforme al bioinsecticida (Tabla 1).

Hubo diferencia significativa en la respuesta a las concentraciones letales entre las especies. La colonia *Ae. aegypti*

(Rockefeller CDC) fue más susceptible que la de *Ae. albopictus*. Dentro de las posibles explicaciones es que especies con mayor tiempo de estabilización en laboratorio, sin exposición a ningún insecticida, tienden a ser más susceptibles (Thiéry *et al.* 1999), ó que el modo de acción de este producto varía entre estas dos especies. Esta cuestión no es respondida en este trabajo debido a que no son analizadas más poblaciones de este mosquito.

La CL_{50} de 0.06 ppm arrojada para *Ae. aegypti* en este experimento, comparada con la colonia utilizada por Amalraj *et al.* (2000) fué similar. Esta comparación con otros trabajos es necesaria para determinar la calibración de los experimentos que utilizan colonias diferentes a la Rockefeller CDC, usada generalmente como patrón de comparación.

Cuando se cotejan los resultados de la acción de Bti sobre *Ae. albopictus* (CL_{50} 0.12 ppm), con los registros de otra colonia de la misma especie colectada en Florida, USA (Ali *et al.* 1995) se ve que la colonia de la Florida es menos susceptible a la acción de la bacteria (CL_{50} 0,84 ppm) y los intervalos de confianza no coinciden entre las concentraciones de la cepa originaria de San Paulo, indicando estadísticamente que tienen respuestas diferentes.

Si bien, el producto Bactimos® (1.200 UIT) utilizado por Ali *et al.* (1995) tiene la misma potencia que Vectobac, no es suficiente para asegurar que los resultados sean similares; este producto tiene una presentación en polvo que se disuelve en agua más lentamente que la formulación líquida. El tipo de presentación (polvo, líquido o tabletas) utilizada por las diferentes empresas fabricantes de estos productos puede alterar la respuesta cuando es aplicado en los mosquitos (Skovmand *et al.* 1998).

Con estos resultados se puede concluir que *Ae. albopictus* tiene una respuesta diferente a la de *Ae. aegypti* en su concentración letal, y es posible que las poblaciones de *Ae. albopictus*, provenientes de localidades diferentes, expresen resultados variados. Igualmente, se puede tomar como punto de referencia para evaluaciones de control en especies vectores potenciales de dengue y fiebre amarilla en América del Sur.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Doctor José Lopes y a João Zequi M. Sc. de la Universidad Estadual de Londrina (UEL) por

Tabla 1. Concentraciones letales 50 y 95 (CL_{50} y CL_{95}) e intervalo de confianza para *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* a 25°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) con fotoperiodo 12:12 y humedad relativa de 80% ($\pm 10\%$)

Especie	Concentración letal (ppm)	Intervalo de confianza IC	
		Inferior	Superior
^a <i>Aedes albopictus</i> Vale do Ribeira/ Ilha Cumprida	CL_{50} 0,12	0,110408	0,138105
	CL_{95} 0,36	0,306505	0,477911
^b <i>Aedes aegypti</i> Rockefeller	CL_{50} 0,07	0,073252	0,086802
	CL_{95} 0,17	0,151675	0,206291

$a = X^2$ 1,7433, con 95% de confianza, pendiente $3,515 \pm 0,39$ $b = X^2$ 1,1147, con 95% de confianza, pendiente $4,882 \pm 0,40$

el suministro de Bti. Al Doctor José Domingos Fontana y Carolina Bueno Wandscheer M. Sc. de la Universidad Federal de Paraná (UFPR) por la ayuda con los materiales de los experimentos. A Gregorio Guadalupe Carbajal Arizaga M. Sc. del Laboratorio de Química del Estado Sólido (UFPR) por las sugerencias al trabajo.

Literatura citada

- ALI, A.; NAYAR, A. J.; XUE, DE. R. 1995. Comparative toxicity of selected larvicides and insect growth regulators to a Florida Laboratory population of *Aedes albopictus*. Journal of the American Mosquito Control Association 11 (1): 72-76.
- AMALRAJ, D. D.; SAHU, S. S.; JAMBULINGAM, P.; BOOPATHI, D. P. S.; KALYANASUNDARAM, M.; DAS, P. K. 2000. Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. Acta Tropica 75: 243-246.
- BROWN, A. W. A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. Journal of the American Mosquito Control Association. 2(2): 123-140.
- FINNEY, D. J. 1981. Probit analysis. S. Chand & Company Ltd, Ram Nagar, New Delhi, 333 p.
- FURUTANI, S. C.; ARITA-TSUTSUMI, L. 2001. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* and methoprene to control Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), in non-circulating hydroponics tanks. Proceedings of the Hawaiian Entomological Society 35: 113-119.
- HAWLEY A WILLIAM. 1988. The Biology of *Aedes albopictus*. Journal of the American Mosquito Control Association 4: 2-435.
- IBÁÑES-BERNAL, S.; BRISEÑO, B.; MUTEBI, J. P.; ARGOT, E.; RODRÍGUEZ, G.; MARTÍNEZ-CAMPOS, C.; PAZ, R.; FUENTE-SAN ROMÁN, P. DE LA F.; TAPIA-CONYER, R.; FLISSER, A. 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. Medical and Veterinary Entomology 11: 305-309.
- MITCHELL, C. J. 1991. Vector competence of North and South America strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses: a review. Journal of the American Mosquito Control Association 7 (3): 446-451.
- SKOVMAND, O.; THIERY, I.; BENZON, G. L.; SINÉGRE, G.; MONTENY, N.; BECKER N. 1998. Potency of products based on *Bacillus thuringiensis* Var *israelensis*: Inter laboratory variations. Journal of the American Mosquito Control Association 14 (3): 298-304.
- SOMBOON P.; PRAPANTHARA, L.; SUWONKERD, W. 2003. Insecticide susceptibility of *Anopheles minimus* S.L., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* in Northern Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 34(1): 87-93.
- SPRENGER, D.; WUITHIRANYAGOO, T. 1986. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris Country, Texas. Journal of the American Mosquito Control Association 2 (2): 217-219.
- THIÉRY, I.; FOUQUE, F.; GAVEN, B.; LAGNEAU, C. 1999. Residual activity of *Bacillus thuringiensis* servars medellin and *jegathesan* on *Culex pipiens* and *Ae. aegypti* larvae. Journal of the American Mosquito Control Association 15 (3): 371-379.
- VÉLEZ I. D.; QUIÑONES M. L.; SUÁREZ, M.; OLANO, V.; MURCIA, L. M.; CORRREA, E.; ARÉVALO, C.; PÉREZ, L.; BROCHERO, H.; MORALES, A. 1998. Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. Biomédica 18 (3): 192-198.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva (WHO/VBC/81.807). 6 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1992. Vector resistance to pesticides. Geneva; 1992. WHO-Technical Report Series, 818. 63 p.
- YAP, H. H.; CHONG, A. S. C.; ADANAN, C. R.; CHONG, N. L.; ROHAIZAT, B.; ABDUL, M. Y.; LIM, S. Y. 1997. Performance of ULV formulations (Pesguard™ 102/Vectobac™ 12AS) against three mosquito species. Journal of the American Mosquito Control Association 13 (4): 384-388.
- YAP, H. H.; LEE, Y. W.; ZAIRI, J. 2002. Indoor thermal fogging against vector mosquitoes with two *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations, Vectobac ABG 6511 water-dispersible granules and vectobac 12 AS® Liquid. Journal of the American Mosquito Control Association 18 (1): 52-56.

Recibido: 01-feb-05 • Aceptado: 01-jun-05

Nota científica

Modificación de un método de extracción de ADN genómico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Modification of a method to extract genomic DNA from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

YAXSIER DE ARMAS R.¹, MARÍA M. RODRÍGUEZ C.², JUAN A. BISSET L.^{3,4}

Resumen. Se extrajo el ADN genómico a 20 mosquitos *Aedes aegypti* de la cepa Rockefeller. Se evaluaron los resultados de la modificación del protocolo empleado para extraer el ADN de los mosquitos. La modificación del método consistió en macerar las muestras en nitrógeno líquido antes de ser extraído el material genético. Los resultados demostraron que empleando el protocolo modificado se obtuvo un material genómico con mayor rendimiento (9,55) y concentración (0,46 µg/µl) que con el método original. Se pudo corroborar que el ADN resultante de la extracción presenta suficiente calidad para emplearse como molde en la técnica del RAPD y probablemente en otras técnicas moleculares basadas en la amplificación por la PCR. Estos resultados se utilizarán en futuros estudios genéticos de *Ae. aegypti*, principal vector del dengue.

Palabras claves: Mosquitos. Material genético. Nitrógeno líquido. Insectos. Vectores.

Summary. The genomic DNA was extracted from 20 *Aedes aegypti* mosquitoes of the Rockefeller strain. The results from a modified protocol for DNA extraction of mosquitoes were evaluated. The modification of the method consisted in grinding up samples in liquid nitrogen before the extraction of genetic material. The results demonstrated that through the modified protocol genetic material was obtained with higher yield (9.55) and concentration (0.46 µg/µl) than the original method. It was corroborated that the resulting DNA was of sufficient quality for RAPD technology and probably other molecular based techniques based on PCR amplification. These results will be used in future genetic studies on *Ae. aegypti*, the principal vector of dengue.

Key words: Mosquitoes. Genetic material. Liquid nitrogen. Insects. Vectors.

Introducción

Aedes aegypti (L.) es el responsable directo de la transmisión de los cuatro serotipos del virus del Dengue, por lo que se considera como el principal vector en América Latina (Soper 1967). El rango de muchas poblaciones de este género no es estático y recientemente se ha extendido por los países de Asia y América Latina, incrementando el riesgo del dengue en esas regiones. La reducción de los criaderos del vector, los programas de saneamiento ambiental con la participación comunitaria, son continuos esfuerzos que se han desarrollado para el control del mismo; sin embargo estos no han sido suficientes para la lucha contra el principal vector del dengue (Rodríguez *et al.* 2004). Las técnicas moleculares aportan importantes resultados que pueden ser utilizados para la confección de estrategias de control de las poblaciones de mosquitos. Estas metodologías han ayudado al entendimiento de los procesos bioquímicos, moleculares y fisiológicos

de este importante vector (Hemingway *et al.* 1998).

La extracción del ADN es el primer paso de muchas técnicas moleculares. A pesar de su aparente sencillez, a menudo existen problemas con el rendimiento de los métodos, la calidad del ADN obtenido encontrándose posibles contaminantes, degradaciones parciales, así como el tiempo de duración de los protocolos. Un estudio detallado de estos importantes parámetros garantizaría las bases para futuros estudios genéticos del principal vector del dengue. El empleo del nitrógeno líquido como variante en los protocolos de extracción de ADN de diferentes especies (Mann *et al.* 1989; Kang *et al.* 2004; Nichols *et al.* 2004), ha permitido aumentar el rendimiento y la calidad del material genético obtenido. En varias familias de insectos esta variante ha sido empleada, demostrándose además del aumento del rendimiento su posible empleo en técnicas moleculares comprobándose la calidad del ADN resultante (Reineke *et al.*

1998; Fraga *et al.* 2004). En un estudio reciente, para caracterizar genéticamente dos poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti* de Santiago de Cuba nuestro grupo de trabajo ha empleado esta simple y fácil modificación, obteniéndose un material genético con suficiente calidad para ser utilizado en la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Bisset *et al.* en prensa).

En este trabajo se muestran los resultados al modificar un método de extracción de ADN genómico de mosquitos *Ae. aegypti* (Gaillard y Strauss 1990). Con el protocolo modificado, el cual consiste en macerar con nitrógeno líquido la muestra antes de ser extraído el ADN, se obtienen mejores resultados en el rendimiento y concentración de ADN resultante, el que tiene calidad suficiente para emplearse en técnicas moleculares como el RAPD, y probablemente en otras técnicas moleculares basadas en la amplificación por la PCR, lo que representa una gran ventaja en los estudios genéticos del *Ae. aegypti*.

1. Autor para correspondencia: Lic. Bioquímica. Departamento de Control de Vectores, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Ciudad de la Habana. Cuba. Fax: (537) 204 6051. E mail: yaxsier@ipk.sld.cu
2. Lic. Bioquímica. Departamento de Control de Vectores. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Ciudad de la Habana. Cuba.
3. Lic Biología, Dr. Ciencias Biológicas, Ph. D. Departamento de Control de Vectores. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Ciudad de la Habana. Cuba.
4. Lic. Bioquímica. Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Ciudad de la Habana. Cuba.

Materiales y Métodos

Origen de las muestras

Se utilizaron mosquitos *Ae. aegypti* de la cepa susceptible de referencia Rockefeller suministrada por el laboratorio del Centro de Control de Enfermedades de San Juan, Puerto Rico. Los mosquitos se mantuvieron en condiciones de laboratorio: $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa, con un foto-período de 10 h de luz y 14 h de oscuridad.

Metodología de trabajo

Se escogieron 20 mosquitos hembras al azar, se dividieron de forma aleatoria en dos grupos de 10 individuos cada uno y se pesaron para que esa variable no afectara los resultados. De un grupo de culícidos se extrajo el ADN por el método de Gaillard y Strauss 1990; mientras que en el segundo grupo se empleó el mismo método con la modificación realizada. La misma consistía en usar el nitrógeno líquido para macerar los individuos antes de la extracción del material genómico. Posteriormente, a ambos grupos se les eliminó el ARN.

Extracción del ADN

Método de Gaillard y Strauss 1990

Se maceraron 10 mosquitos de forma individual en 500 μl del tampón de extracción (SDS al 20%, Tris-HCl 1M pH 8,25, EDTA 0,5 M, Sacarosa 1M). El homogenizado se incubó a 65°C por 10 min, se añadieron 120 μl de acetato de potasio 5M, se colocó en hielo por 10 min y se centrifugó a 10.000 g por 10 min. Al sobrenadante se le adicionaron 35 μl de mezcla de acetato (acetato de sodio 4M y acrilamida al 0,25%) y 1.200 μl de etanol absoluto, incubándose 10 min a temperatura ambiente. El homogenizado se centrifugó a 10.000 g por 20 min, el precipitado se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó a 10.000 g por 10 min, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 μl del tampón Tris-EDTA (TE 1X) (Tris-HCl 1mM pH 8,0, EDTA 0,1mM pH 8,0). Posteriormente, se adicionaron 2 μl de RNAsa (10 mg/ml), se incubó 1 h a 37°C , se añadió igual volumen de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10.000 g por 10 min. El sobrenadante se conservó a 4°C .

Electroforesis de la extracción del ADN

Para la visualización del producto de la extracción del ADN en las muestras se

realizó la electroforesis al 0,8% en geles de agarosa en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE 0,5X) (Tris-Borato 0,045 M y EDTA 0,001 M, pH 8,0) conteniendo bromuro de etidio (0,5 mg/ml).

RAPD

El ADN extraído por los dos métodos (50 ng) se amplificó en un volumen de reacción de 25 μL , utilizando los cebadores OPA-1, OPA-2 y OPA-9 (Kit A, Operon Technologies, USA) manteniendo constante el resto de los componentes de la reacción (2,5 μL de tampón de amplificación 10x (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 500 mM; gelatina al 0,01%) (Promega, USA), 200 μM de cada deoxinucleótido trifosfato (Promega, USA), 2,5 mM de MgCl_2 , 5 pmol de cebador, 2 U Taq ADN polimerasa (Promega, USA) con el objetivo de determinar la calidad del ADN para ser utilizado en la técnica de RAPD. La amplificación se realizó en un termociclador (Perkin Elmer, USA) con el siguiente perfil: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 45 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 36°C por 1 min y extensión 72°C por 2 min, con una extensión final después del último ciclo a 72°C por 15 min. Para la detección del producto se analizaron 20 μL de cada mezcla resultante en electroforesis en gel de agarosa al 1,2 %, preparado en tampón TBE 0,5x con bromuro de etidio 0,5 mg/mL. La corrida electroforética se realizó a 150 V durante 1 hora. La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante luz ultravioleta.

Análisis estadístico

Se realizaron las lecturas de las muestras del ADN obtenido a las longitudes de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia, LKB, USA). Se calculó el grado de pureza a través del cociente DO 260/280, la concentración y el rendimiento del ADN resultante. Finalmente, se realizó un análisis de varianza de clasificación simple (Statistic version 5.0) para el peso de los mosquitos y los valores del grado de pureza, rendimiento y la concentración del ADN extraído.

Resultados y Discusión

El método de Gaillard y Strauss (1990) es empleado en la extracción de pequeñas cantidades en el orden de los picogramos de material genómico, aprovechando su alta eficiencia debido al uso de la acrilamida (Gaillard y Strauss 1990). El protocolo se extrapola a estudios en muestras de *Ae. aegypti* porque posee bajo costo y buen rendimiento, además de presentar un tiempo de extracción muy rápido, lo que permite procesar un gran número de muestras y dar resultados fidedignos en un corto tiempo. Estas ventajas indican claros beneficios en la confección de estrategias y toma de decisiones para el control de las poblaciones del vector del dengue.

El análisis de varianza de clasificación simple para la variable peso demostró que no existieron diferencias significativas para los valores comparados ($P > 0,05$). Resultado que indica que esta variable no influye en el análisis del rendimiento.

En la tabla 1 se aprecian los valores de las medias de la variable concentración, grado de pureza y rendimiento para el método original y su modificación. Se demostró que el método modificado tiene un mejor rendimiento en la extracción del ADN genómico (9,55), con diferencias altamente significativas ($P = 0,001$) con respecto al original, posee además una mayor media de concentración de ADN extraído (0,46 $\mu\text{g}/\text{ml}$), estadísticamente significativo ($P = 0,01$) a la obtenida por el método original. Este resultado tiene un gran significado, ya que se dispone de mayor cantidad de ADN obtenido para emplearse en más reacciones de técnicas moleculares. Realizando el mismo análisis estadístico, se llegó a la conclusión que las medias del grado de pureza entre el método empleado y su modificación no son significativamente diferentes ($P > 0,05$). En la figura 1, las diferentes intensidades de los patrones de las corridas electroforéticas obtenidos con las dos metodologías evidencian claramente los resultados antes explicados. Es válido añadir que en ninguna de las dos metodologías se observó contamina-

Tabla 1. Valores de las medias de concentración, grado de pureza y rendimiento para las dos metodologías empleadas en la extracción de ADN genómico de mosquitos *Aedes aegypti*

Metodología	Grado de pureza (Media \pm DE)	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Media \pm DE)	Rendimiento
Modificado (n = 10)	1,51 \pm 0,07	0,455 \pm 0,09	9,55
Original (n = 10)	1,46 \pm 0,12	0,338 \pm 0,11	6,98

DE: Desviación estándar.

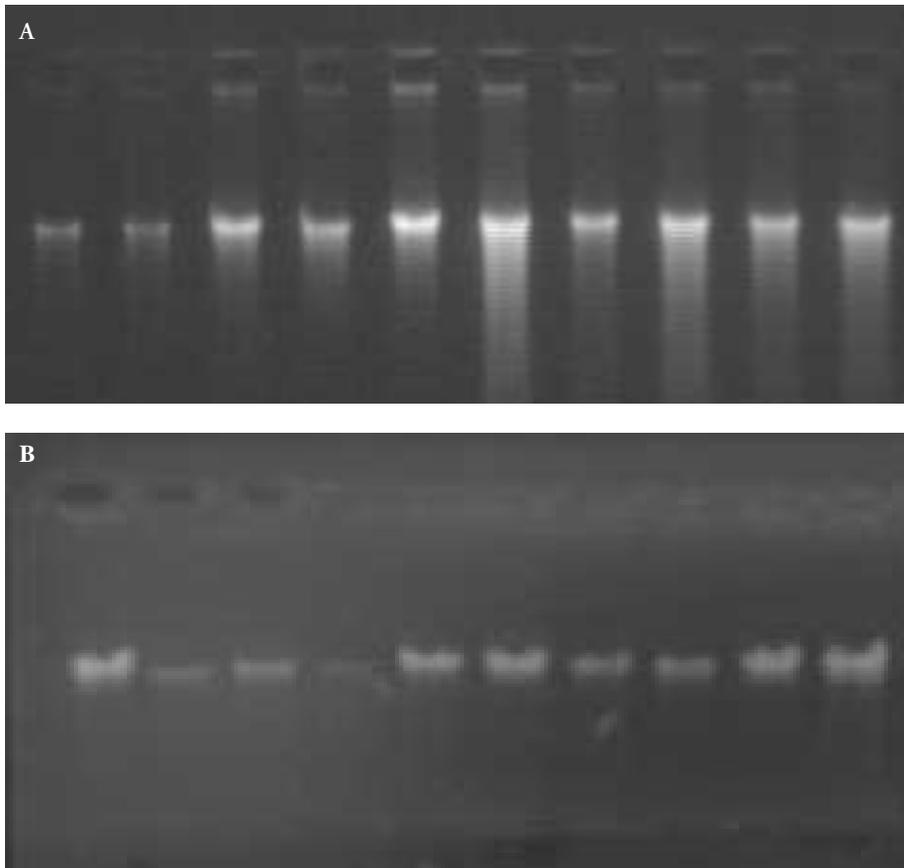


Figura 1. Corridos electroforéticos de las muestras de ADN genómico extraído por las dos metodologías empleadas con los mosquitos *Aedes aegypti* de la cepa susceptible de referencia Rockefeller. A: método modificado, B: método Gaillard y Strauss 1990.

ción con ARN (Fig.1), lo que es un aspecto importante para emplearse en la técnica del RAPD, técnica muy utilizada en estudios genéticos de poblaciones de mosquitos (Apostol *et al.* 1996; Zhu *et al.* 1998; Ayres *et al.* 2002).

A pesar de no tener un alto grado de pureza (valores $\geq 1,8$) se han obtenido patrones reproducibles en la técnica del RAPD con el cebador OPA-9 (Fig. 2), así como con el resto de los cebadores analizados (datos no mostrados), pudiéndose demostrar con patrones amplificables, claros y reproducibles la calidad del ADN obtenido por ambas metodologías y especular sobre su uso en otras técnicas moleculares que contengan en algunos de sus pasos la PCR. Este resultado se pretende utilizar en futuros estudios genéticos donde se encuentre involucrado el principal vector del dengue en las Américas.

La utilidad del nitrógeno líquido en los protocolos de extracción de ADN genómico en insectos ha sido reportada por muchos autores. Similares resultados a los obtenidos por nuestro

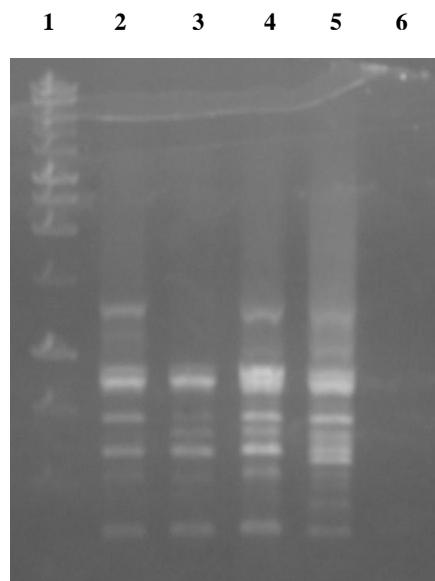


Figura 2. Patrones obtenidos por la técnica del RAPD de las muestras de ADN genómico extraído por las dos metodologías empleadas a los mosquitos *Aedes aegypti* de la cepa susceptible de referencia Rockefeller. Línea 1: Marcador de Peso Molecular, línea 2, 3: método modificado, línea 4, 5: método Gaillard y Strauss 1990, línea 6: control negativo.

grupo fueron reportados por Reineke *et al.* (1998) al comparar seis protocolos de extracción de ADN de insectos y evaluar su aplicación en la técnica del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). En hemípteros cubanos, Fraga y colaboradores (2004) demostraron que con el uso del nitrógeno líquido se obtienen mejores rendimientos en la extracción del ADN genómico.

Obtener un material genético con una buena calidad (libre de contaminación y sin degradaciones parciales), unido a un buen rendimiento y concentración, así como en un tiempo breve, sería una herramienta muy importante para el trabajo en la Entomología Molecular. El ADN extraído es el primer paso de muchas técnicas moleculares, que se emplean entre otras cosas, en la confección y elaboración de estrategias que permitan un mejor control sobre los insectos vectores que transmiten enfermedades que afectan al hombre. Por lo que el empleo de la modificación con nitrógeno líquido del protocolo original aquí descrito, proporciona una beneficiosa opción para el trabajo futuro.

Conclusiones

La maceración con nitrógeno líquido antes de extraer el ADN genómico, brinda una nueva y ventajosa variante, que permite contar con un método con mejor rendimiento y concentración del ADN obtenido sin variar significativamente el tiempo empleado en la metodología de la extracción. Obteniéndose un ADN con calidad suficiente para emplearse como molde en la técnica del RAPD y probablemente en otras técnicas moleculares basadas en la amplificación por la PCR.

Agradecimientos

A Alfredo Gutiérrez por la revisión y sus críticas valoraciones del manuscrito.

Literatura citada

- APOSTOL, B. L.; BLACK, W. C. IV.; MILLER, B. R.; REITER, P. 1996. Populations genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325-336.
- AYRES, C. F. J.; ROMAO, T. P. A.; MELOSANTOS, M. A. V.; FURTADO, A. F. 2002. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 871-875.
- BISSET, J. A.; RODRÍGUEZ, M. M.; DE ARMAS Y. 2005. Comparación de dos po-

- blaciones de mosquitos *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba con diferente conducta de reposo. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 57 (en prensa).
- FRAGA, J.; RODRÍGUEZ, J.; FUENTES, O.; CASTEX, M.; FERNÁNDEZ-CALIENES, A. 2004. Comparación entre cinco métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: Su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56: 23-27.
- GAILLARD, C.; STRAUSS, F. 1990. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Research* 15: 378.
- HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, H. P. 1998. Mosquito carboxylesterases : a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 1-12.
- KANG, T. J.; YANG, M. S. 2004. Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BioMedical Central Biotechnology* 4: 20.
- MANN, W.; JEFFERY, J. 1989. Isolation of DNA from yeasts. *Annual Biochemistry* 178: 82-87.
- NICHOLS, R.A.; SMITH, H.V. 2004. Optimization of DNA extraction and molecular detection of *Cryptosporidium* oocysts in natural mineral water sources. *Journal of Food Protection* 67: 524-532.
- REINEKE, A.; KARLOVSKY, P.; ZEBITZ, C. P. W. 1998. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Molecular Biology* 7: 95-99.
- RODRÍGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; FERNÁNDEZ, D.; PÉREZ, O. 2004. Resistencia a insecticidas en larvas y en adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56: 54-60.
- SOPER, F. L. 1967. The prospects for *Aedes aegypti* eradication in Asia in the light of its eradication in Brazil. *Bulletin World Health Organization* 36: 645-647.
- ZHU, C. L.; TIAN, H. S.; LI, J. M.; YU, X. Z.; YE B. H. 1998. Identification of deltamethrin-resistant mosquito, *Culex pipiens pallens*, with RAPD-PCR. *Chinese Journal of Parasitic Disease* 11: 214-216.

Recibido: 05-jun-04 • Aceptado: 10-dic-04

Sección Morfológica, Comportamiento, Ecología, Evolución y Sistemática

Trips del suborden Terebrantia (Insecta: Thysanoptera) en la Sabana de Bogotá

Thrips of the suborder Terebrantia (Insecta: Thysanoptera) from the Bogotá plateau

CLAUDIA LILIANA CALIXTO ÁLVAREZ ¹

Resumen. Se realizó un reconocimiento de las especies pertenecientes al suborden Terebrantia presentes en la Sabana de Bogotá. Los insectos se colectaron en campo y fueron llevados al laboratorio donde se identificaron hasta el nivel de especie. Se obtuvo un listado de las especies encontradas en la Sabana, incluyendo nuevos registros de trips para Colombia, nuevos registros altitudinales y algunas observaciones biológicas. También se mencionan nuevos registros de plantas asociadas a diferentes especies de trips. Se identificaron 79 especies distribuidas en 23 géneros y tres familias para la Sabana de Bogotá, de los anteriores, el 43% son nuevos registros para Colombia.

Palabras clave: Familia. Género. Especie. Inventario. Nuevos registros. Colombia.

Summary. An inventory was conducted of the species pertaining to the suborder Terebrantia present in the Bogotá plateau. The insects were collected in the field and taken to the laboratory for identification to species. A list was made of the species found in the Bogotá plateau, including new records for Colombia, new altitude records, and some biological observations. New records of plant associations with different thrips species are also mentioned. Seventy-nine species distributed in 23 genera and three families were identified for the Bogotá plateau; of these, 43% are new records for Colombia.

Key words: Family. Genus. Species. Survey. New records. Colombia.

Introducción

El presente trabajo es un estudio descriptivo que tuvo por objeto reconocer las especies pertenecientes al suborden Terebrantia (Insecta: Thysanoptera) que se encuentran en la Sabana de Bogotá. Es el grupo que tiene mayor importancia económica en el orden Thysanoptera debido a que se encuentran distribuidos por todo el mundo, particularmente en los trópicos (Mound 1997; Mound y Kibby 1998).

Estas especies ocasionan importantes pérdidas económicas en cultivos de flores, frutales y hortalizas al producir daños en hojas, flores y frutos (Davidson y Lyon 1992; Medina *et al.* 1994). Estos pueden ser ocasionados durante la alimentación o bien durante la puesta de huevos, generando aborto de flores, deformación de frutos e incluso defoliación (Ellsworth *et al.* 1995; Mound y Teulon 1995). Entre los daños indirectos se destacan, la transmisión de tospovirus, fitopatógenos de la familia Bunyviridae (Hei *et al.* 1995; Mound 1996; Mound y Teulon 1995). Existen otras especies que resultan benéficas ya que son enemigos naturales de otros artrópodos (Goldaracena y Mound 1997; 1998).

Los trabajos taxonómicos más recientes de este orden para la Sabana de Bogotá son: Mound e Isaza (1994) quienes identificaron dos familias, Thripidae y Heterothri-

pidae, presentando la primera cinco géneros distribuidos en nueve especies y la segunda una especie no identificada del género *Heterothrips*. Forero (1999) reportó algunas especies de Thripidae y una especie de la familia Aeolothripidae. Debido a la necesidad de complementar la información sobre este grupo, se realizó el presente trabajo, en donde se citan nuevos registros de trips para Colombia.

Se realizó un muestreo prospectivo en más de 30 municipios durante un año. Se utilizaron trampas especiales para la recolección de trips, colectas manuales y se obtuvieron datos sobre los aspectos biológicos y ecológicos a partir de las observaciones realizadas en campo. Fue posible generar un listado de las especies presentes en la Sabana de Bogotá así como nuevos registros de plantas asociadas a diferentes especies de trips y nuevos registros altitudinales.

El orden Thysanoptera comprende 5.500 especies descritas, las cuales se encuentran distribuidas en dos subórdenes, Tubulifera y Terebrantia. El primero está constituido por una sola familia, Phlaeothripidae, que presenta alrededor de 3.100 especies. El segundo suborden incluye ocho familias, de las cuales Thripidae es la más numerosa con al menos 1.750 especies descritas. Las siete familias

restantes son relativamente pequeñas: Aeolothripidae comprende 250 especies (Mound *et al.* 1980), Heterothripidae 70 especies, Merothripidae 17 especies, Melanthripidae 60 especies y las otras tres familias con apenas 12 especies descritas (Moritz *et al.* 2001).

Los estados de desarrollo de los Terebrantia comprenden: el huevo, dos estadios larvarios (larva de primero y segundo estadio) y dos estadios ninfales (proninfa y ninfa). El huevo es oval y alargado. Las larvas se alimentan activamente y son móviles; por el contrario, los estadios ninfales no se alimentan y tienen escasa movilidad (Lewis 1973). Los insectos adultos pueden presentar un desarrollo alar variable, desde especies ápteras hasta macrópteras, dependiendo de diferentes factores ambientales (Heming 1991).

Los trips son haplodiploides, tienen reproducción sexual y partenogenética. Las hembras son diploides y los machos haploides originándose de huevos no fertilizados. Los trips del Suborden Terebrantia presentan tres tipos de partenogénesis: telitokia (tipo de reproducción unisexual, en donde las hembras son capaces de duplicar el número de cromosomas y producir hembras), arrenotoquia (reproducción sexual, en donde se producen machos haploides, y hembras

¹ Bióloga, candidata a M. Sc. en Ciencias Agrarias con énfasis en Entomología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. c_calixto@hotmail.com

diploides) y deuterotoquia (las hembras no fecundadas ponen huevos que dan lugar a hembras, pero si la reproducción tiene lugar a bajas temperaturas, aparecen machos) (Lewis 1997).

Los trips comúnmente viven en las flores, pero probablemente el 50% de todas las especies se alimentan de hongos, principalmente de las hifas que se encuentran en la hojarasca y en la madera en descomposición, uno de los hongos más comunes, consumidos por estos ejemplares son los Micromycetes, los cuales se desarrollan sobre las superficies de las hojas, debajo de la corteza de los árboles, en las galerías excavadas por otros insectos o en los restos vegetales en contacto con el suelo (Williams 1997). Aquellos que ingieren esporas presentan el cono bucal ligeramente modificado con relación a los fitófagos, siendo más corto y con el tubo formado por los estiletes maxilares más anchos. Por lo general se encuentran en hábitats tropicales bastante efímeros (al degradarse rápidamente el sustrato donde se desarrollan, produciendo cambios en los microhábitats) (Mound 1997). Los que se alimentan de hifas, sea absorbiendo su contenido o ingiriéndolas, colonizan preferiblemente hábitats estables, hojarasca de cultivos caducifolios o herbáceos estacionales, pudiéndose encontrar especies asociadas a un mismo lugar (Mound y Teulon 1995; Plasencia y Climent 1996). Frecuentemente una especie se encuentra capacitada para alimentarse tanto de esporas como de micelio, haciéndolo en todos los estados activos del desarrollo (Mound y Palmer 1983).

En algunos grupos de trips, los adultos y las larvas se alimentan solamente de las flores en donde chupan los contenidos celulares de sus tejidos, de la base de las anteras y de los frutos en desarrollo (Kirk 1984; Mound y Marullo 1996).

Muchas especies de Aeolothripidae, al igual que unos pocos Thripidae incluyendo varias de las especies plagas más comunes y universalmente reconocidas por sus hábitos alimenticios (no necesariamente con un amplio rango en plantas, flores y restos vegetales), regularmente se alimentan de ácaros (Wilson *et al.* 1996; Mound y Kibby 1998). Mientras que otras especies de los géneros de Aeolothripidae probablemente son depredadores facultativos ya que además de alimentarse de ácaros, viven en flores y se alimentan del polen sin ver limitados sus parámetros de reproducción o desarrollo (Kirk 1984).

Se tiene conocimiento de aproximadamente unas 300 especies depredadoras, más o menos especializadas. La mayoría de las especies no presentan modificaciones sobresalientes para ejercer este tipo de alimentación. Tanto las larvas como los adultos pican a sus presas y absorben su contenido de forma similar a cuando se alimentan de vegetales. En general son especies adaptadas a las condiciones y hábitats donde se desarrollan sus presas (Mound y Palmer 1992).

Las especies de trips con hábitos fitófagos son las que presentan mayor importancia desde el punto de vista agrícola. En la actualidad, de las 5.500 especies de trips descritas, tan sólo el 1% son consideradas plagas puesto que causan las mayores pérdidas en los cultivos de interés comercial (Mound y Marullo 1996). Las especies que tienen un tiempo corto de generación, rango alimenticio amplio y reproducción partenogenética tienen que ser tenidas en cuenta como futuras plagas potenciales (Mound y Marullo 1996).

En ataques severos ocasionados por trips, se puede producir defoliación, aborto de flores y deformación de hojas y frutos (Ellsworth *et al.* 1995). Los daños indirectos causados por ser vectores de virus del género *Tospovirus* (Familia Bunyviridae) son también muy importantes. Entre los virus transmitidos, se destacan el virus del bronceado del tomate (TSWV), el virus de la necrosis del cacahuate (maní) (PBNV) y el virus del mosaico del maní (PYSV) (Hunter y Hsu 1995; Mound 1996; Ullman *et al.* 1995; Wijkamp *et al.* 1995). Las especies plaga que causan mayores problemas en cultivos hortícolas en Colombia son *Frankliniella occidentalis*, *Thrips palmi* y *Thrips tabaci* (Estrada y Nápoles 1994; Vergara 1998; Zapata *et al.* 1994).

Materiales y Métodos

Se realizó un muestreo prospectivo en más de 30 municipios (Fig. 1) desde febrero 2001 hasta febrero de 2002. Para las colectas se utilizaron trampas y se efectuaron colecciones manuales. Los trips se colectaron por golpeteo utilizando una bandeja plástica pequeña sobre flores y otras estructuras vegetales, así como en ramas secas. Se utilizó la bandeja ya que éstos insectos presentan unos pequeños arolios tarsales los cuales se adhieren a la superficie, evitando su desplazamiento (Mound y Marullo 1996; Steiner y Goodwin 1998).

Los trips que fueron colectados por golpeteo o mediante inspección manual,

se removieron con la ayuda de un pincel delgado (No. 0-2) y fueron colocados en frascos plásticos con una mezcla de AGA (etanol al 60%: 10 partes, glicerina: 1 parte, ácido acético: 1 parte) (Palmer y Mound 1990). Después fueron transferidos a una nueva solución AGA que se llevó al congelador para mantenerlos frescos y donde no estuvieran expuestos a la luz.

En los cultivos de flores se colectaron por medio de trampas adherentes utilizadas como parte del convenio de la Asociación Colombiana de Exportadores de Flores (ASOCOLFLORES) y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para el "Plan de detección, prevención y contingencia de *Thrips palmi*" (ICA-ASOCOLFLORES 2000). Las trampas se ubicaron en los puntos cardinales de las fincas, se revisaron, cuantificaron y limpiaron dos veces por semana.

Las trampas consisten en un tubo de PVC de 4" de diámetro de color blanco fijadas al suelo por medio de una estaca de madera inmunizada de 5 cm de lado y 1,8 m de alto (Fig. 2). Las trampas se ubicaron en posición vertical, a 50 cm de distancia entre el borde inferior y la superficie del suelo. La estaca va en el interior del tubo de tal manera que la superficie blanca quede expuesta. Los tubos se impregnaron con aceite para motor 20-30 sin quemar, el cual sirvió como adhesivo para la captura de los ejemplares. Las trampas se protegieron mediante una cubierta de plástico de las mismas especificaciones utilizadas para la construcción de invernaderos. Al retirarse los trips de las trampas se depositaron en frascos con etanol al 70% con los datos del sitio correspondiente y se enviaron al laboratorio. Allí, los individuos se colocaron en varsol para retirarles el aceite y luego de seleccionarlos en el estereoscopio, se colocaron en frascos con etanol al 70% hasta realizar los estudios taxonómicos respectivos.

Para realizar el estudio taxonómico, los trips se montados en láminas de micropreparados de 76 x 26 mm, con sus respectivas laminillas y con solución de Hoyer (Upton 1991). La identificación taxonómica se realizó con la ayuda de claves para familias, géneros y especies de diferentes autores como Sakimura y O'Neill (1979); Nakahara (1994); Mound y Marullo (1996); Mound y Kibby (1998). Para identificar hasta el nivel de especie se utilizó un microscopio con reglilla (en micras), utilizando las medidas de algunos caracteres morfológicos externos en individuos adultos.



Figura 1. Localidades de la Sabana de Bogotá en las se realizaron colectas: *: sitios donde se colocaron trampas. Δ: Sitios donde se colectó manualmente.

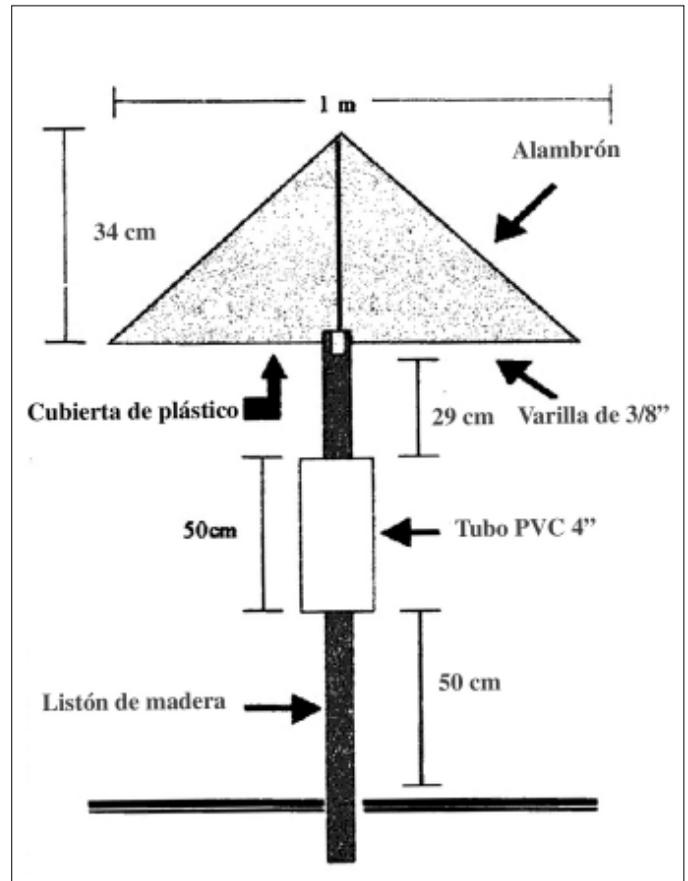


Figura 2. Esquema de la trampa ubicada en los diferentes cultivos de flores (Tomado de ICA, ASOCOLFLORES, 2000).

El protocolo que se utilizó para la elaboración de los montajes se modificó y adaptó de otros protocolos propuestos por diferentes autores como Mound y Marullo (1996), Calixto (2000). Estos montajes se depositaron en la colección entomológica de la Pontificia Universidad Javeriana (MUJ), y los duplicados se donaron a la colección entomológica del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional, sede Bogotá.

Resultados y Discusión

En Colombia es muy poco lo que se conoce de la fauna de Thysanoptera así como sus efectos sobre los diferentes sistemas agrícolas y forestales. Tal situación es frecuente en países tropicales donde la diversidad de artrópodos es alta y los recursos para investigaciones biológicas son limitados (Mound e Isaza 1994).

Se identificaron tres familias, 23 géneros y 79 especies. La familia Aeolothripidae presentó dos géneros *Aeolothrips* con tres

especies y *Eryothrips* con una sola especie; Heterothripidae con dos géneros y nueve especies, y Thripidae con 14 géneros y 54 especies (Tabla 1).

Nuevos Registros

En este trabajo se exponen nuevos registros para Colombia. Así la familia Aeolothripidae registró dos géneros: *Aeolothrips* y *Eryothrips*, ambos con una especie respectivamente. Las otras dos familias representadas en quince géneros de los cuales, diez son nuevos registros, que a su vez presentan 34 nuevos registros de especies para Colombia. De éstos la familia Heterothripidae presentó dos géneros y cinco especies y Thripidae 13 géneros y 27 especies. Estos taxos se han registrado también para el Neotrópico en países como México, Costa Rica, Panamá, Brasil, entre otros. De los registros inesperados, ya que son especies que se encuentran solo en la región Neártica, están, *Heterothrips analis* Hood (Fig. 3a) registrada en Maryland (EE.UU.) y *Frankliniella caudiseta* Sakimura y O'Neill (Fig. 3b) en otras zonas de Estados Unidos, sien-

do estas dos especies, nuevos registros para Suramérica.

Además se obtuvieron nuevos registros altitudinales y 10 nuevos registros de plantas asociadas a trips (Tabla 2). Por primera vez se registran ejemplares en páramo: *F. panamensis*, *F. insularis* y *F. fallaciosa*.

Aspectos Taxonómicos

Uno de los géneros que presentó enorme dificultad para identificación fue *Frankliniella* debido a que el grupo es muy homogéneo. Algunos autores utilizan la coloración de los especímenes como caracteres para la identificación, los cuales causan considerables confusiones. Un ejemplo de lo anterior son las variaciones que presenta en la coloración *F. panamensis*, algunas hembras tienen el margen anterior del pronoto pálido y otras lo muestran uniformemente marrón (Mound y Nakahara 1994).

Dentro de los caracteres más utilizados en la identificación para las especies del género *Frankliniella* se encuentran las setas del pronoto pues éstas varían en

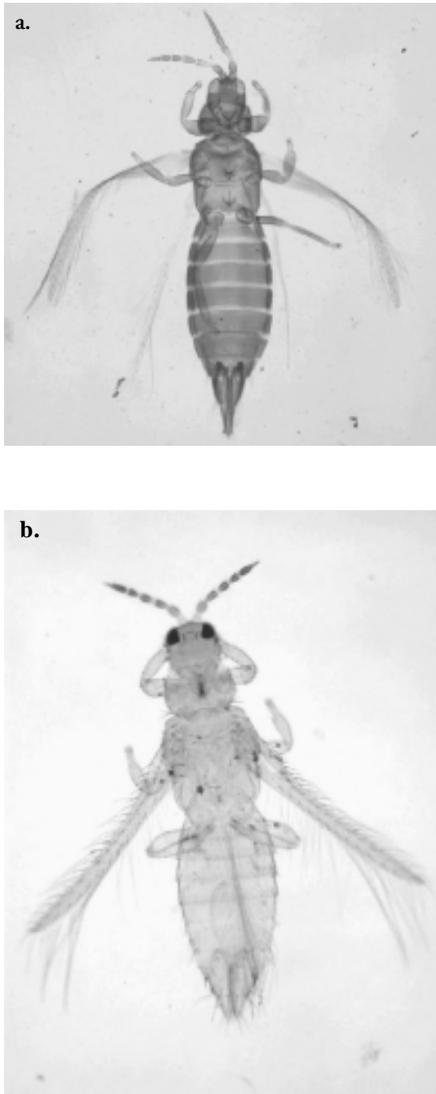


Figura 3. Nuevos registros para Sur América. **a.** *Heterothrips analis* Hood; **b.** *Frankliniella caudiseta* Sakimura y O'Neill. (Fotografías Claudia Calixto).

longitud y número de acuerdo con la especie. Por ejemplo, algunos autores (Sakimura y O'Neill 1975) utilizan estos caracteres para diferenciar especies, tal es el caso del grupo "minuta" en donde algunas exponen este tipo de variaciones: *F. bertelsi* presenta las setas postero-marginales ii reducidas en contraste con *F. trisetosa* que tiene las setas postero-marginales ii más largas que el par i, iii, iv, y v. Otro carácter que es muy utilizado, puesto que ofrece una buena distinción entre especies, es la presencia o ausencia de las sensilas campaniformes en el metanoto. Este carácter también se utiliza en otros géneros para distinguir entre especies, tal es el caso de las especies de *Thrips*, por ejemplo en *T. australis* se encuentran presentes mientras que en *T. simplex* están ausentes.

Frankliniella auripes es una especie que presenta una gran variabilidad cromática, muy evidente en las patas. De acuerdo con Mound y Marullo (1996) las tibias son amarillas en contraste con el fémur el cual presenta la mitad posterior de color marrón. Pero lo que se pudo observar durante el proceso de identificación es que las tibias presentan una coloración variable. Algunas especies presentan la mitad basal o distal, oscura o pálida, también se presenta la parte media pálida con la porción basal y distal oscuras, pálidas o simplemente con la porción media oscura. Esta variación no permite que el carácter sea conveniente en las claves; por el contrario, otros caracteres como la coloración de las alas o la forma del peine postero-marginal en el VIII tergito abdominal son estables y fáciles de observar. La coloración de las tibias no había sido comentada anteriormente por lo que algunas claves utilizan esta variación como carácter estable. Lo anterior determina la importancia de realizar colectas intensivas y continuas, las cuales facilitarán la obtención de grandes series de individuos permitiendo la identificación de caracteres probablemente variables.

Las especies de *Frankliniella* dentro del grupo *minuta*, presentan una gran homogeneidad en las estructuras, lo cual refleja la dificultad del reconocimiento de las especies que conforman dicho grupo. Por ejemplo algunas de éstas presentan un pequeño pedicelo en el VI segmento antenal. Este carácter es difícil de observar por lo que es necesario que el ejemplar, haya tenido un excelente proceso de montaje, lo que facilitará la observación del carácter y permitirá diferenciar las especies.

Una de las grandes limitaciones que se presentan a la hora de la identificación, es la falta de material bibliográfico con relación a los aspectos taxonómicos y sistemáticos de las especies. Muchas especies del orden Thysanoptera presentes en el continente americano no han sido estudiadas o algunos grupos ya descritos necesitan ser redefinidos. Por ejemplo, el género *Ceratothripoides* "sensu lato" presentó una gran dificultad a la hora de ser identificado hasta el nivel de especie. Mound y Marullo (1996) comentan que este género solo tiene claves que se restringen al grupo de las especies africanas, por lo que es necesario redefinir y establecer un nuevo género para las especies Neotropicales.

Es importante recalcar la necesidad de incrementar los estudios del orden a escala

Tabla 1. Listado de las familias, subfamilias, géneros y especies de Terebrantia encontradas en la Sabana de Bogotá (2.600-3.500 msnm)

TAXÓN	ESPECIE
Familia Aeolothripidae	
<i>Aeolothrips</i>	A. sp. 1 A. sp. 2 A. <i>surcalifornianus</i>
<i>Erythothrips</i>	E. <i>diabolus</i>
Familia Heterothripidae	
<i>Heterothrips</i>	H. cf. <i>alvarezii</i> H. <i>analis</i> H. aff. <i>bolivianus</i> H. aff. <i>decoratus</i> H. <i>sericatus</i> H. sp. 1 H. sp. 2
<i>Scutothrips</i>	S. <i>byrsonimae</i> S. <i>incaensis</i>
Familia Thripidae	
Subfamilia Thripinae	
<i>Anaphothrips</i>	A. <i>obscurus</i> A. <i>sudanensis</i>
<i>Apterothrips</i>	A. <i>apteris</i>
<i>Aptinothrips</i>	A. <i>rufus</i>
<i>Arorathrips</i>	A. sp. 1 A. <i>mexicanus</i> A. sp. 2 A. sp. 3
<i>Aurantothrips</i>	A. <i>xanthius</i>
<i>Ceratothripoides</i>	A. <i>orchidaceus</i> C. aff. <i>chillicus</i> C. aff. <i>funestris</i> C. aff. <i>silvestris</i>
<i>Charassothrips</i>	C. <i>incomparabilis</i> C. <i>piperaffinis</i> C. <i>urospathae</i>
<i>Chirothrips</i>	C. sp. 1 C. <i>manicatus</i> C. sp. 1 C. sp. 2 C. sp. 3
<i>Frankliniella</i>	F. <i>auripes</i> F. <i>bruneri</i> F. <i>caudiseta</i> F. <i>chamulae</i> F. <i>colombiana</i> F. <i>crawfordi</i> F. <i>falluciosa</i> F. <i>gardeniae</i> F. <i>insularis</i> F. cf. <i>lorena</i> F. <i>minuta</i> F. <i>occidentalis</i> F. <i>panamensis</i> F. <i>pestinae</i> F. cf. <i>salviae</i> F. sp. 1 F. sp. 2 F. sp. 3 F. sp. 4 F. <i>trisetosa</i> F. <i>tympanona</i> F. <i>valdiviana</i> F. <i>verbesinae</i>
<i>Microcephalothrips</i>	M. <i>abdominalis</i>
<i>Psectrothrips</i>	P. <i>delostomae</i> P. <i>palmerae</i>
<i>Stenchaetothrips</i>	S. <i>biformis</i>
<i>Scirtothrips</i>	S. cf. <i>bisbravae</i> S. <i>euthyntus</i>
<i>Thrips</i>	T. <i>australis</i> T. <i>tabaci</i> T. <i>simplex</i>
Subfamilia Sericothripinae	
<i>Hydatothrips</i>	H. <i>sternalis</i> H. cf. <i>trincinctus</i> H. cf. <i>volcano</i>
<i>Neohydatothrips</i>	N. <i>basilaris</i> N. <i>gracilipes</i> N. cf. <i>humberto</i> N. cf. <i>mirandai</i> N. cf. <i>rapoportii</i> N. <i>signifer</i> N. sp. 1 N. <i>tibialis</i>
<i>Scirtothrips</i>	S. cf. <i>bisbravae</i> S. <i>euthyntus</i>
Subfamilia Panchaetothripinae	
<i>Selenothrips</i>	S. <i>rubrocinctus</i>
<i>Echinothrips</i>	E. <i>caribbeanus</i> E. sp. 1
<i>Heliothrips</i>	H. <i>haemorrhoidalis</i>

Tabla 2. Listado de nuevos registros de plantas asociadas

ESPECIE	MUESTRA BOTÁNICA	LOCALIDAD
<i>Erythothrips diabolus</i>	* <i>Podocarpus oleifolius</i> (nombre vulgar, Pino romeron)	Bogotá
	Pastos naturales	Sopó
<i>Apterothrips apteris</i>	Pastos naturales	Bogotá, Sopó
<i>Aptinothrips rufus</i>	Melastomataceae	Bogotá
<i>Arorathrips xanthius</i>	Pastos naturales	Sopó
<i>Frankliniella minuta</i>	Compositae	Sopó
<i>Frankliniella pestinae</i>	Compositae	Sopó
<i>Frankliniella auripes</i>	Melastomataceae	Bogotá
	Compositae (<i>Taraxacum officinae</i> , diente de león)	Sopó
	Compositae	Supatá
<i>Frankliniella fallaciosa</i>	*Ericaceae (<i>Gaylussacia buxifolia</i>)	Supatá
	*Compositae (<i>Espeletia grandiflora</i>)	Supatá
<i>Frankliniella insularis</i>	Compositae	Cogua
	Compositae (<i>Taraxacum officinale</i> , nombre vulgar diente de león)	Bogotá
	*Compositae (<i>Espeletia grandiflora</i>)	Supatá
<i>Frankliniella panamensis</i>	Compositae	Cota
	*Compositae (<i>Eupatorium stoechidifolium</i> , nombre vulgar chilco)	Cota
	*Compositae (<i>Eupatorium stoechidifolium</i> , nombre vulgar chilco)	Bogotá
	* <i>Ornitogalum</i> sp. (Conocida como estrella de belén)	Cota
	*Ericaceae (<i>Gaylussacia buxifolia</i>)	Supatá
	Compositae (<i>Taraxacum officinae</i> , nombre vulgar diente de león)	Bogotá
	*Clusiaceae (<i>Hypericum juniperinum</i>)	Supatá
	*Ericaceae (<i>Maclenia rupestris</i>)	Supatá
	*Bromeliaceae (<i>Tillandsia biflora</i>)	Supatá
	*Compositae (<i>Espeletia grandiflora</i>)	Supatá
	Fabaceae	Cota
	*Rubiaceae (<i>Borreria bogotensis</i>)	Cota
	Solaneceae	Cota
<i>Hydatothrips sternalis</i>	*Helecho	Facatativá
<i>Hydatothrips volcano</i>	Melastomataceae	Bojacá
<i>Neohydatothrips basilaris</i>	Pastos naturales	Sopó
<i>Neohydatothrips signifer</i>	Melastomataceae	Facatativá
<i>Psectothrips palmerae</i>	Pastos naturales	Sopó
<i>Selenothrips rubrocinctus</i>	Pastos naturales	Sopó

* Nuevos registros de trips asociadas a plantas.

nacional y Neotropical; haciendo énfasis en los temas taxonómicos los cuales permitirán obtener caracteres morfológicos de peso que facilitarán la identificación y generarán una diferenciación más precisa entre especies; lo que se verá reflejado en la disminución sinonimias. Lo anterior también permitirá ampliar conocimientos referentes a la distribución, aspectos biológicos, ecológicos y sistemática de otras especies que no han sido consideradas plagas pero que de igual manera son importantes.

Aspectos biológicos

En Colombia no existe una colección entomológica de referencia la cual facilite y permita iniciar los estudios del orden Thysanoptera. En la actualidad la información que existe de los trips se basa fundamentalmente en estudios realizados por pocos especialistas en pocos lugares o áreas restringidas; dando como resultado un limitado conocimiento sobre estos insectos. De acuerdo con Mound (1997), es en los trópicos donde la mayoría de los trips viven, destacando la importan-

cia del continente americano como centro de dispersión del orden, en contraste con el Viejo Mundo, el cual presenta una menor proporción de especies. Recientes estudios de América Central y del Sur, muestran un incremento (con respecto a estudios previos, como los de Nakahara, 1994 Lewis 1973 entre otros) considerable en el número de especies, determinando que su distribución es extensa y aparentemente natural (Mound y Marullo 1996).

De acuerdo con Mound y Nakahara (1994) el género *Frankliniella* es el más ampliamente distribuido en América, lo que concuerda con el gran número de especies de este género, encontradas en la Sabana de Bogotá. *Frankliniella occidentalis* es una de las especies que representa uno de los problemas plaga que enfrenta la industria de ornamentales en la Sabana de Bogotá, ya que además de los daños que ocasiona sobre las plantas, dejando una serie de cicatrices provocadas por su aparato bucal (tipo raspador - suctor), la peligrosidad de estos aumenta con

la capacidad que tienen de transmitir el virus de la marchitez del tomate (TSWV) (Estrada y Nápoles 1994). Los ejemplares que se colectaron manualmente en este trabajo siempre se hallaron dentro del invernadero y en pocas oportunidades en los alrededores. No se encontraron en otras áreas como bosques o zonas no intervenidas. Lo anterior va en concordancia con el número de organismos hallados en trampas. Por último es importante mencionar que la fauna de trips para los diversos sitios muestreados es un pequeño reflejo de la fauna residente (Mound 1997).

Conclusiones

En general la fauna de tisanópteros encontrados en la Sabana de Bogotá es bastante rica; de los 500 ejemplares examinados, se encontró que la familia Aeolothripidae presentó dos géneros, siendo el grupo con el menor número de ejemplares colectados para este trabajo. La familia Heterothripidae presentó dos géneros con 9 especies: *Heterothrips* con siete especies y *Scutothrips* con dos

especies, siendo ambos nuevos registros para Colombia. La familia Thripidae es la que se encuentra mejor representada en la Sabana de Bogotá, puesto que se identificaron 14 géneros y 54 especies. Los nuevos registros representan en este trabajo el 43% del total de especies identificadas. Esta riqueza encontrada en un área relativamente pequeña del país contrasta significativamente con estudios realizados en otras regiones más amplias de Suramérica en donde se ha encontrado menor cantidad de especies pertenecientes al orden.

La especie más frecuente en la Sabana de Bogotá, encontrándose entre los 2.550-3.600 msnm, fue *Frankliniella panamensis*. Por primera vez se registran ejemplares en páramo; tal es el caso de *F. panamensis*, *F. insularis* y *F. fallaciosa* que se hallaron asociadas a *Espeletia grandiflora* (Compositae), especie típica de páramo.

Este trabajo ofrece la primera colección entomológica de referencia para Colombia, conformada por 500 ejemplares, la cual fue depositada en el museo de la Pontificia Universidad Javeriana y los duplicados fueron donados al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá).

Es necesario incrementar los estudios a nivel taxonómico del orden, así como desarrollar y estimular la formación de especialistas nacionales para estudiar la gran diversidad de tisanópteros presentes en nuestro país.

Agradecimientos

Agradezco a Laurence Mound (CSIRO, Australia), Steven Nakahara (USDA, Florida, EE.UU.) y Arturo Goldaracena (G. Neikers, país Vasco, España) quienes me colaboraron en la aclaración de dudas taxonómicas y envío de valiosa literatura. Fabio González (I.C.N., Universidad Nacional de Colombia en Bogotá) facilitó el uso del microscopio. A Dimitri Forero quien me dirigió y colaboró durante la elaboración del trabajo, a Giovanni Fagua [MUJ], Carolina Torres y Luis Carlos Martínez, quienes revisaron una versión preliminar y brindaron comentarios oportunos sobre el manuscrito. A Syngenta, en especial a Adela Rodríguez, por su interés en el trabajo y colaboración en la divulgación y publicación del mismo. De igual manera a la Asociación Colombiana de Exportadores de Flores (ASOCOLFLORES), por la financiación parcial del proyecto. Al Ins-

tituto Colombiano Agropecuario (ICA) que facilitó las instalaciones y equipos utilizados en la realización del trabajo. A la Universidad Jorge Tadeo Lozano (CIAA) que gentilmente colaboró permitiéndonos tomar las fotos usadas en este documento.

Literatura citada

- CALIXTO, C. 2000. Taxonomía del suborden Terebrantia (Insecta: Thysanoptera) en la Sabana de Bogotá. Trabajo de grado de Bióloga. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Bogotá. 182 pp.
- DAVIDSON, R. H.; LYÓN, W. F. 1992. Plagas de insectos agrícolas y del jardín. Limusa S. A., México.
- ELLSWORTH, D. S.; TYREE, M. T.; PARKER, B. L.; SKINNER, M. 1995. Impact of pear *Thrips* damage on sugar maple physiology: a whole-tree experiment. p. 53-60. En: Parker, B.; Skinner, S.; Lewis, T. (eds). *Thrips biology and management*. Editora Plenum Press, New York. 636 p.
- ESTRADA, C.; NÁPOLES, J. 1994. *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) como vector del virus de la Marchitez Manchada del Tomate. ASOCOLFLORES 38: 39-54.
- FORERO, D. 1999. Aspectos biológicos de *Thrips palmi*, con anotaciones de un pequeño muestreo de *Thrips* hecho en la sabana de Bogotá. ASOCOLFLORES. (56): 41-49.
- GOLDARACENA, A.; MOUND, L. A. 1997. Introducción a la fauna de los tisanópteros (Cl. Insecta; O. Thysanoptera), de Navarra, sus plantas hospedadoras y su distribución. I Terebrantia. Revista del Museo de Ciencias Naturales de Alava, (12): 167-202.
- GOLDARACENA, A.; MOUND, L. A. 1998. The fauna of Tubulifera (Cl. Insecta: O. Thysanoptera) of Navarre (Northern Spain), with their habitat, host-plant and distribution data: an introduction. Revista del Museo de Ciencias Naturales de Alava (13):185-200.
- HEI, T. H.; TSAI, J. H.; YUE, B.; WEBB, S. E.; FUNDERBURK, J. E. 1995. Effects of host plant and temperature on grown and reproduction of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). p. 157-162. En: Parker, B.; Skinner, M.; Lewis, T. (eds). *Thrips biology and management*. Editora Plenum Press, New York. 636 pp.
- HEMING, B. S. 1991. Order Thysanoptera. p. 1-21. En: Stehr F. W. (eds). *Inmature Insects*. Editora: Kendall/Hunt Publishing Company. USA.
- HUNTER, W.; HSU, H. 1995. Establishing *Thrips* cell cultures to study tospovirus. p. 163-166. En: Parker, B.; Skinner, M.; Lewis, T. (eds). *Thrips biology and management*. Editora Plenum Press, New York. 636 p.
- ICA, ASOCOLFLORES. 2000. Plan de detección, prevención y contingencia contra *Thrips palmi* Karny en ornamentales. Produmedios. 25 p.
- KIRK, W. D. J. 1984. Pollen-feeding in thrips (Insecta: Thysanoptera). *Journal of Zoology, London*. 204: 107-117.
- LEWIS, T. 1973 *Thrips*. Their biology, ecology and economic importance. Academic Press London and New York. 349pp.
- LEWIS, T. 1997. *Thrips as Crop Pests*. Cab International. 736 pp.
- MEDINA, G.; ESCOBAR, J. H.; ACOSTA, A. 1994. Evaluación de la población de trips (Thysanoptera: Thripidae [sic]) con trampas acrílicas comerciales de diferentes colores en un cultivo comercial de Pomón. *Revista Colombiana de Entomología* 20(4): 215-224.
- MORITZ, G.; MORRIS, D.; MOUND, L. A. 2001. *ThripsID*, Pest thrips of the World. An interactive identification and information system. ACIAR. CSIRO. Australia. CD-Rom.
- MOUND, L. A. 1996. The Thysanoptera, vector species of Tospoviruses. *Acta Horticulturae* 431, Tospoviruses and Thrips. CSIRO Division of Entomology, Canberra. :298-309
- MOUND, L. A. 1997. Biological Diversity 197-215 en: Lewis, T (ed.). *Thrips as Crop Pest*. CAB International.
- MOUND, L. A.; HEMING, B. S.; PÁLMEZ, J. M. 1980. Phylogenetic relationships between the families of recent Thysanoptera. *Zoological Journal of the Linnean Society of London* 69: 111-141.
- MOUND, L. A.; PALMER, J. M. 1983. The generic and tribal classification of spore-feeding Thysanoptera (Phlaeothripidae: Idolothripinae). *Bulletin of the British Museum (Natural History) (Entomology)*. 46: 1-174.
- MOUND, L. A.; PALMER, J. M. 1992. *Thrips of Panamá: a biological catalogue and bibliography (Thysanoptera)*. Chapter 21. p. 321-328. En: Quintero, D.; Aiello A. (eds). *Insects of Panama and Mesoamerica. Selected Studies*. Editora: Oxford Science Publication.
- MOUND, L. A.; ISAZA, J. C. 1994. Trips comunes en la Sabana de Bogotá. *Asocolflores* (38): 55-59.
- MOUND, L. A.; NAKAHARA, S. 1994. The genus *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae): character assessment at generic and

- specific levels. *Zoology (Journal of Pure and Applied Zoology)*. New Delhi. 4: 287–295.
- MOUND, L. A.; TEULON, D. A. J. 1995. Thysanoptera as phytophagous opportunists. p. 3-20. En: Parker, B. L.; Skinner, M.; Lewis, T. (eds). *Thrips biology and management*. Editora Plenum Press. New York. 636pp.
- MOUND, L. A.; MARULLO, R. 1996. The thrips of central and south America: an introduction (Insecta: Thysanoptera). *Memoirs on Entomology International*. Associated Publishers. Florida. 487pp
- MOUND, L. A.; KIBBY, G. 1998. *Thysanoptera, a Guide*. Second edition. CAB International. Australia. 70 pp.
- NAKAHARA, S. 1994. The genus *Thrips* Linnaeus (Thysanoptera: Thripidae) of the New World. United States Department of Agriculture. Technical Bulletin 1822: 1-183.
- PALMER, J. M.; MOUND, L. A. 1990. Thysanoptera. p: 241-242. En: Rosen, D. (Ed.). *The armored scale insects, their biology, natural enemies and control*, Vol. B. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands.
- PLASENCIA, A. L.; CLIMENT, J. 1996. *Thrips y su control biológico*. Pisa Ediciones. España. 205 p.
- SAKIMURA, K.; O'NEILL, K. 1979. *Frankliniella*, redefinition of genus and revision of *minuta* group species (Thysanoptera: Thripidae). United States Department of Agriculture, Technical. Bulletin 1572: 49 p.
- STEINER, M. Y.; GOODWIN, S. 1998. Methods for collecting and rearing thrips (Thysanoptera) and their natural enemies. *Australian Journal of Entomology*. 37: 101–106.
- ULLMAN, D. E.; GERMAN, T. L.; SHERWOOD, J. L.; WESTCOT, D. M. 1995. Thrips transmission of tospovirus: future possibilities for management. p. 135-152. En: Parker, B.; Skinner, M.; Lewis, T. (eds). *Thrips biology and management*. Editora Plenum Press, New York. 636 pp.
- UPTON, M. S. 1991. Methods for collecting, preserving and studying insects and allied forms. The Australian Entomology Society. Miscellaneous Publication No. 3 Fourth Edition. Brisbane.: 86 p.
- VERGARA, R. R. 1998. El *Thrips palmi* Karny, nueva plaga de la agricultura Colombiana. Comité Departamental del *Thrips palmi* Karny. Medellín. 163pp.
- WIJKAMP, I.; ALMARZA, N.; PETERS. 1995. Median latent period and transmission of Tospoviruses vectored by thrips. p. 153-156. En: Parker, B.; Skinner, M.; Lewis, L. (eds). *Thrips biology and management*. Editora Plenum Press, New York. 636 p.
- WILLIAMS, D.J.K. 1997. Biological Diversity. p: 197-215. En: Lewis, T. (eds). *Thrips as Crop Pests*. Editorial: CAB International. 736pp.
- WILSON, L. J.; BAUER, L. R.; WALTER, G. H. 1996. "Phytophagous" thrips are facultative predators of twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae) on cotton in Australia. *Bulletin of Entomological Research*. 86: 297-305 p.
- ZAPATA, A. M.; HINCAPIÉ, Y.; MADRIGAL, A. 1994. Reconocimiento de thrips en cultivos de flores y áreas aledañas y biología de *Frankliniella panamensis* Hood (Thysanoptera: Thripidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 20(1): 47-52.

Recibido: 03-ago-04 • Aceptado: 04-jun-05

Mirmecofauna (Hymenoptera: Formicidae) del Parque Nacional Isla Isabel, Mar de Cortés, México

Myrmecofauna (Hymenoptera: Formicidae) of the Isabel Island National Park, Sea of Cortés, Mexico

FABIO GERMÁN CUPUL-MAGAÑA¹, ABRAHAM REYES-JUÁREZ¹

Resumen. Durante el 2004 se registró sistemáticamente la presencia de doce especies de hormigas en el Parque Nacional Isla Isabel, Mar de Cortés, México. Se aplicó un modelo lineal teórico para pronosticar el número de especies de hormigas que la isla puede albergar en función de su área. El modelo estimó un valor de 12.50 especies para un área total de 1.94 km². La concordancia entre este valor teórico, el registro total de especies observadas y la tendencia asintótica de la curva de acumulación de especies, permitieron suponer que la diversidad de hormigas listada es muy próxima a la máxima que se puede observar. Sin embargo, se discute también cómo el muestreo, la diversidad de plantas o la presencia de aves marinas, pueden afectar positiva o negativamente la diversidad de hormigas.

Palabras clave: Diversidad. Hormigas. Regiones Insulares.

Summary. During 2004 the presence of 12 species of ants in the Isabel Island National Park, Sea of Cortés, Mexico, was reported systematically. A theoretical linear model was applied to estimate the number of species of ants that the island can support based on its area. The model calculated a value of 12.50 species for an area of 1.94 km². The agreement between this theoretical value, the total species recorded, and the asymptotic tendency of the species-accumulation curve, allowed us to suggest that the listed diversity of ants is close to the maximum that can be observed. Nevertheless, it is also discussed how sampling, plant diversity or the presence of marine birds, can affect positively or negatively the diversity of ants.

Key words: Diversity. Ants. Insular Regions.

Introducción

El estudio de la mirmecofauna de las islas del Mar de Cortés es particularmente interesante desde un punto de vista biogeográfico porque permite plantearse interrogantes sobre cómo esta fauna varía en función del área de la isla y de su aislamiento, o si las especies se encuentran relacionadas con uno u otro factor biótico o abiótico. No obstante, los estudios en estas islas son escasos (Boulton y Ward 2002).

Algunos de los pocos trabajos desarrollados sobre el tema en el Mar de Cortés son los de Boulton y Ward (2002) y Johnson y Ward (2002) quienes han estudiado aspectos biogeográficos de las especies presentes en las islas de la costa occidental. Por su parte Cupul-Magaña (en prensa), realizó uno de los primeros registros sobre la presencia de formicidos en las islas orientales de su boca: la Isla Isabel y el archipiélago de las Marietas.

La Isla Isabel fué decretada Parque Nacional por el Gobierno de México el 8 de diciembre de 1980, con el propósito de conservar sus valores naturales para el desarrollo de la investigación científica

y aprovechar su belleza escénica para la realización de actividades recreativas en beneficio de las comunidades costeras cercanas (Vargas-Márquez 1984). En concordancia con el primer precepto este trabajo tiene por objetivo contribuir al conocimiento de la diversidad de hormigas del Parque Nacional Isla Isabel y observar su variación con relación al área insular.

Materiales y Métodos

Las coordenadas extremas del Parque Nacional Isla Isabel son 21° 51' 21.84"-21° 50' 56.93" N y 105° 53' 31.84"-105° 52' 43.52" W, con una altitud máxima de 80 msnm. Se encuentra a una distancia perpendicular a la costa de 28 km y a 70 km al noroeste del puerto de San Blas, Nayarit. La isla tiene un origen volcánico que data de aproximadamente 3.5 millones de años (Vargas-Márquez 1984). El relieve presenta cerros y depresiones, así como un cráter bien conservado en cuyo interior existe una laguna de agua hipersalina. No hay agua dulce. La isla abarca una superficie de aproximadamente 1.94 km². La flora dominante es el Bosque Tropical Subcaducifolio (70%)

dentro del cual dominan la capparidacea *Crataeva tapia* L. y la euforbiacea *Euphorbia schlehtendalii* Boissier. Existen también pastizales (20%), así como vegetación introducida y ruderal (10%). La isla es sitio de anidación de alrededor de 20,000 aves marinas de nueve especies (Ruiz-López 1977; Vargas-Márquez 1984; Drummond *et al.* 2000).

Para realizar el estudio de la mirmecofauna, se llevaron a cabo siete expediciones a la Isla Isabel los días marzo 18, mayo 19, junio 24, julio 29, agosto 24, así como octubre 7 y 28 de 2004. En las tres primeras salidas se coleccionaron de forma directa hormigas a partir de búsquedas visuales. En las restantes cuatro, las hormigas fueron coleccionadas con la ayuda de cebos de atún y sardina (3-4 g) colocados sobre hojas de papel "bond" de 22 cm x 8 cm sobre el terreno y dispersas por la isla. Se utilizaron de 8 a 12 cebos por expedición, mismos que se dejaron actuar por una hora. La unidad básica de muestreo fue el día muestreado, siete en este caso. Los ejemplares coleccionados se preservaron en alcohol al 70% y se depositaron en el Departamento de Ciencias del Centro Universitario de la

1 Autor para correspondencia: Fabio Germán Cupul-Magaña. Departamento de Ciencias, Centro Universitario de la Costa, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad de Guadalajara #203, Delegación Ixtapa, C.P. 48280, Puerto Vallarta, Jalisco, México. Tel. (322)2262218, Fax. (322)2811680. Correo: fabio_cupul@yahoo.com.mx

Costa de la Universidad de Guadalajara. Para la determinación de los géneros de hormigas a partir de las obreras, se consultaron los trabajos de MacKay y MacKay (1989), Bolton (1994), Longino (2004) y Radchenko (2004). Solamente *Atta mexicana* Smith, 1958 y *Tapinoma melanocephalum* Fabricius, 1793 fueron determinadas hasta el nivel de especie.

Con base en el registro de especies de hormigas coleccionadas durante los siete días de muestreo, se construyó una curva acumulativa de especies para observar su tendencia. Para ello, se aplicó un modelo de ajuste no lineal del tipo logarítmico con ayuda del programa DATAFIT versión 8.0:

$$Y_i = \frac{\ln X_i - \ln \gamma}{\delta}$$

donde δ y γ son los parámetros de la curva de regresión

Para determinar el número potencial de especies de hormigas presentes en la Isla Isabel en función de la superficie de la misma, se aplicó el modelo lineal que Bolton y Ward (2002) generaron con alto nivel de confiabilidad para 13 islas del Mar de Cortés. Bolton y Ward (2002) establecieron la alta confiabilidad de su modelo, en función de lo sistemático de sus muestreos al utilizar trampas de caída, colectas oportunistas y material proveniente, en gran cantidad, de los depósitos de cadáveres de arañas. El modelo relaciona el logaritmo del número de especies de hormigas en función del logaritmo del área de la isla, de acuerdo con la siguiente expresión algebraica: $y = 0,3342x + 1,0009$, $R^2 = 0,6591$.

Resultados y Discusión

Se encontraron 12 especies de hormigas comprendidas dentro de 10 géneros y tres

subfamilias, con lo cual se añaden siete géneros (dos determinados hasta nivel de especie) más al inventario de tres géneros (*Leptothorax*, *Dorymyrmex* y *Paratrechina*) que Cupul-Magaña (en prensa) listó con anterioridad para la Isla Isabel.

Aunque Cupul-Magaña (en prensa) determinó la presencia en la Isla Isabel del género *Leptothorax*, es importante aclarar que tanto los ejemplares analizados por Cupul-Magaña (en prensa) como por este estudio, deberán ser considerados dentro del género *Nesomyrmex* en concordancia con el arreglo propuesto por Bolton (2003).

Dentro de las tres subfamilias de hormigas que ocurren en la Isla Isabel, la mejor representada fue Myrmicinae con siete especies: *A. mexicana*; *Cardiocondyla* sp *Crematogaster* sp *Nesomyrmex* sp (sólo en ésta se observó casta alada); *Monomorium* sp y; *Solenopsis* spp. (género con dos especies no determinadas). La subfamilia Formicinae tuvo como representantes a tres especies: *Camponotus* sp y *Paratrechina* spp. (género con dos especies no determinadas). La familia Dolichoderinae fue la que contó con menor representación: *Dorymyrmex* sp. y *T. melanocephalum*. Salvo los géneros *Atta* y *Dorymyrmex*, cuya distribución es de afinidad Neotropical y Neártica, el resto presenta amplia distribución mundial (Bolton 1995).

El género *Cardiocondyla* y las especies *A. mexicana* y *T. melanocephalum*, se catalogan por vez primera para las islas del Mar de Cortés; aunque al igual que los otros géneros restantes, éstos también se han registrado en la franja continental adyacente del Pacífico mexicano, principalmente en los estados de Nayarit y Jalisco (Rojas-Fernández 1996, 2001; Cupul-Magaña 2004; Vásquez-Bolaños y Navarrete-Heredia 2004). Lo anterior permite suponer que el margen continental es la fuente que alimenta la diversidad de hormigas que ocurren en la Isla Isabel, tal cual ha sido observado para otras islas del Mar de Cortés (Bolton y Ward 2002). De hecho, Cupul-Magaña (en prensa) llegó a especular que las hormigas pueden ser transportadas desde el continente a la Isla Isabel, dada la corta distancia de 28 km, por las embarcaciones de los pescadores o, en el caso de la casta alada, por los vientos de las tormentas tropicales. También las hormigas pueden llegar flotando en troncos de árboles. El proceso de transporte antrópico se hace evidente por la presencia de especies y géneros asociados a asentamientos huma-

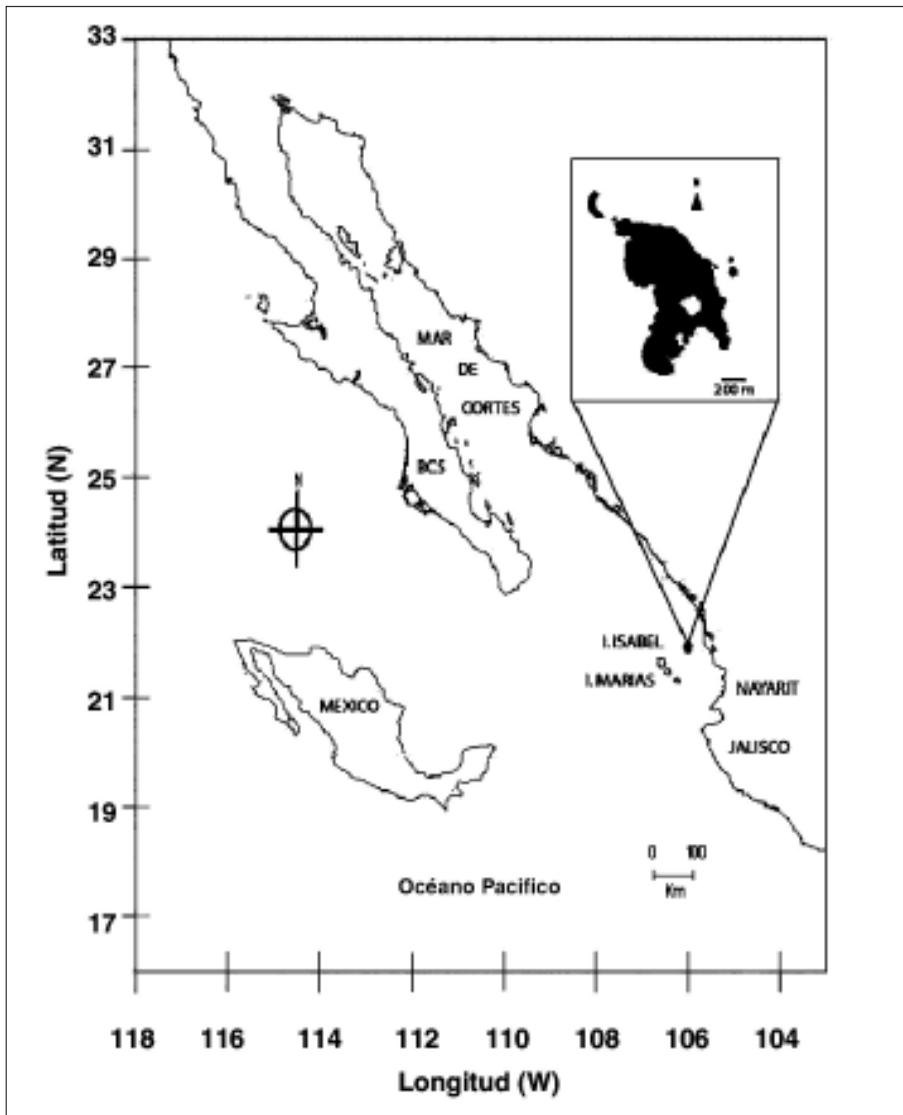


Figura 1. Área de estudio.

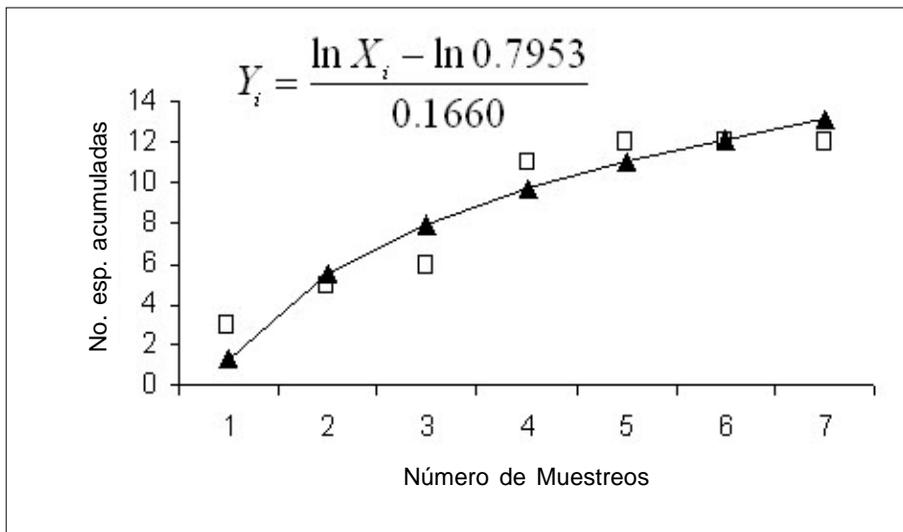


Figura 2. Curva de acumulación de especies de hormigas para la Isla Isabel, México (Cuadros: valores observados; Línea continua: valores esperados).

nos como *A. mexicana*, *Paratrechina* sp o *T. melanocephalum* (Klotz *et al.* 1995; Márquez-Luna 1996; Cupul-Magaña 2004).

A partir del quinto muestreo, la curva acumulativa de especies (Fig. 2) mostró una tendencia a estabilizar el inventario alrededor de los 12 registros. Mas no se puede asegurar que se cuenta con la lista completa de formicidos ya que una posible limitante para ello es el empleo de sólo dos técnicas de muestreo. Por ejemplo, se ha probado que el uso de trampas Winkler es muy productivo cuando se llevan a cabo estudios sistemáticos de inventarios de hormigas (Agosti *et al.* 2000; Longino *et al.* 2001; Johnson y Ward 2002).

Sin embargo, como el área de la isla puede ser un buen pronosticador de la diversidad de hormigas que alberga (Bolton y Ward 2002), la aplicación del modelo lineal desarrollado por Bolton y Ward (2002) para una selección de islas del Mar de Cortés, fue una herramienta de ayuda para estimar la precisión de nuestro inventario. De acuerdo con el modelo, la Isla Isabel, con una superficie de 1.94 km², potencialmente puede albergar 12.50 especies de hormigas; registro similar al obtenido de los muestreos directos en campo. Lo anterior hace notar la consistencia de este resultado con una de las premisas de la teoría clásica de la biogeografía de islas, en donde para cada isla hay un número de especies que corresponde a una condición normal de equilibrio entre el área, la variedad de su ambiente, el clima, la competencia inter e intraespecífica, inmigración y tasa de

extinción (Zunino y Zullini 2003). En el caso del área de una isla, mientras mayor sea ésta, mayor será el número de especies esperadas (Bolton y Ward 2002; Sánchez-Piñero y Aalbu 2002; Zunino y Zullini 2003).

Por otro lado, se ha establecido que la distancia a la masa continental es un factor que determina la presencia de especies en las islas (Sánchez-Piñero y Aalbu 2002; Zunino y Zullini 2003). Pero, para las hormigas de las islas del Mar de Cortés, no se ha podido establecer una correlación significativa con esta variable, siendo, como se mencionó, el área la que explica parte de la variación en el número de especies de hormigas presentes (Bolton y Ward 2002). Asimismo, la riqueza de especies de plantas es con frecuencia un buen estimador de la riqueza de especies de hormigas, en vista de que un número importante de ellas son usuarias de tejido vegetal o semillas (Quiroz-Robledo y Valenzuela-González 1995; Bolton y Ward 2002; Sánchez-Piñero y Aalbu 2002; Schöning *et al.* 2004); mas no contamos con datos recientes específicos de la flora de la isla para analizar este punto.

La Isla Isabel cuenta con colonias importantes de aves marinas (Drummond *et al.* 2000), por lo que sería interesante realizar estudios sobre su relación con las hormigas, ya que se ha observado que el guano producido por las aves marinas puede llegar a reducir la diversidad de plantas (las quema y limita su crecimiento) y de animales (Polis *et al.* 2002). Al respecto, Bolton y Ward (2002) encontraron que la variación en la diversidad

de las hormigas de las islas del Mar de Cortés, puede ser afectada negativamente por la ocurrencia de aves marinas anidantes o perchantes. En un estudio realizado por estos mismos autores en la Isla El Piojo, encontraron una mayor abundancia y riqueza de especies de hormigas en sitios con ausencia de aves, en comparación con aquellos con presencia. Los autores concluyeron que los aspectos causales de esta relación necesitan ser mejor estudiados pero sostienen que la ocurrencia de aves marinas posiblemente controle y tenga un impacto negativo sobre la riqueza de las plantas y de las hormigas de forma separada. Además, conjeturaron que el hábitat o heterogeneidad del paisaje juega un papel importante en el control de la diversidad de plantas y hormigas, tal como se ha llegado a establecer en una amplia gama de estudios ecológicos (Escofet 1989).

Finalmente, es posible concluir que la diversidad de hormigas registradas en la Isla Isabel sea muy próxima a la máxima que se puede observar, en virtud de la concordancia entre el inventario y el valor teórico obtenido en función de su área. Para corroborar lo anterior, será necesario realizar la caracterización de sus hábitats y diversificar las técnicas de muestreo. Además, la influencia de factores bióticos sobre la diversidad de hormigas, sólo será averiguada, si se identifica su tipo de relación con las aves marinas y se llega a determinar la estructura de la comunidad vegetal presente.

Agradecimientos

A Amílcar Cupul, Pedro Medina y a la Dirección General del Parque Nacional Isla Isabel por su apoyo para la realización de este estudio. A los revisores anónimos por sus acertados comentarios.

Literatura citada

- AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. 2000. *Ants: Standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C., USA. 280 p.
- BOLTON, B. 1994. *Identification guide to the ant genera of the world*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 222 p.
- BOLTON, B. 1995. *A new general catalogue of the ants of the world*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 504 p.
- BOLTON, B. 2003. *Synopsis and classification of Formicidae*. *Memoirs of the American Entomological Institute* 71:1-370.
- BOLTON, A. M.; WARD, P. S. 2002. *Ants*. p. 112-128. En: Case, T. J.; Cody, M. L.;

- Ezcurra, E. (eds.). A new island biogeography of the Sea of Cortés. Oxford University Press, New York, USA. 669 p.
- CUPUL-MAGAÑA, F. G. 2004. Mirmecofauna (Hymenoptera: Formicidae) común del estero "El Salado" y Puerto Vallarta, Jalisco, México. *Dugesiana* (México) 11(1):13-20
- CUPUL-MAGAÑA, F. G. (en prensa). Algunos géneros de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) observados en tres islas de la boca del Golfo de California, México. *Entomotropica*.
- DRUMMOND, H.; MACÍAS, C.; VALIENTE-BAUNET, A.; OSORNO, J. L.; REBÓN-GALLARDO, F.; CARRERA, N.; OSORIO, M. 2000. AICA 50 Isla Isabel. p. 41-42. En: Arizmendi, M. del C.; Márquez-Valdelamar, L. (eds.). Áreas de importancia para la conservación de las aves en México. CONABIO, México, D. F., México. 440 p.
- ESCOFET, A. 1989. Ecología aplicada en Baja California. p. 285-318. En: Rosa-Vélez, J. de la; González-Farías, F. (eds.). Temas de oceanografía biológica en México. Enseñada, México. 337 p.
- JOHNSON, R. A.; WARD, P. S. 2002. Biogeography and endemism of ants (Hymenoptera: Formicidae) in Baja California, Mexico; a first overview. *Journal of Biogeography* 29:1009-1026.
- KLOTZ, J.H.; MANGOLD, J. R.; VAIL, K. M.; DAVIS, L. R. Jr.; PATTERSON, R. S. 1995. A survey of the urban pest ants (Hymenoptera: Formicidae) of peninsular Florida. *Florida Entomologist* 78(1): 109-118.
- LONGINO, J. T.; CODDINGTON, J.; COLWELL, R. K. 2001. The ant fauna of a tropical rainforest: estimating species richness in three different ways. *Ecology* 83: 689-702.
- LONGINO, J. T. 2004. Key to *Nesomyrmex* and *Temnothorax* of Costa Rica. <http://www.evergreen.edu/ants/Genera/temnothorax/key.html>. Fecha última revisión: 5 septiembre 2004. Fecha último acceso: 19 mayo 2005.
- MACKAY, W. P.; MACKAY, E. E. 1989. Clave de los géneros de hormigas en México (Hymenoptera: Formicidae). *Memorias. II Simposio Nacional de Insectos Sociales de la Sociedad Mexicana de Entomología*. p. 1-82. Oaxtepec.
- MÁRQUEZ-LUNA, J. 1996. Las hormigas "arrieras", *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) de México. *Dugesiana* (México) 3(1): 33-45.
- POLIS, G. A.; ROSE, M. D.; SÁNCHEZ-PIÑERO, F.; STAPP, P. T.; ANDERSON, W. B. 2002. Island food webs. p. 362-380. En: Case, T. J.; Cody, M. L.; Ezcurra, E. (eds.). A new island biogeography of the Sea of Cortés. Oxford University Press, New York, USA. 669 p.
- QUIROZ-ROBLEDO, L.; VALENZUELA-GONZÁLEZ, J. 1995. A comparison of ground ant communities in a tropical rainforest and adjacent grassland in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Southwestern Entomologist* 20:203-213.
- RADCHENKO, A. 2004. A review of the ant genera *Leptothorax* Mayr and *Temnothorax* Mayr (Hymenoptera, Formicidae) of the eastern palaeartic. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 50(2): 109-137.
- ROJAS-FERNÁNDEZ, P. 1996. Formicidae. p. 483-500. En: Llorente, J.; García-Aldrete, A. N.; González, E. (eds.). Biodiversidad de Artrópodos de México: Hacia una Síntesis de su Conocimiento. UNAM-CONABIO, México. 660 p.
- ROJAS-FERNÁNDEZ, P. 2001. Las hormigas del suelo en México: diversidad, distribución e importancia (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie) (1):189-238.
- RUIZ-LÓPEZ, A. L. 1977. Algunos aspectos ecológicos de la isla Isabel, Nay. Tesis de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México, D. F. 115 p.
- SÁNCHEZ-PIÑERO, F.; AALBU, R. L. 2002. Tenebrionid beetles. p. 129-153. En: Case, T. J.; Cody, M. L.; Ezcurra, E. (eds.). A new island biogeography of the Sea of Cortés. Oxford University Press, New York, USA. 669 p.
- SCHÖNING, C.; ESPADALER, X.; HENSEN, I.; ROCES, F. 2004. Seed predation of the tussock-grass *Stipa tenacissima* L. by ants (*Messor* spp.) in south-eastern Spain: the adaptative value of trypanocarp. *Journal of Arid Environments* 56:43-61.
- VARGAS-MÁRQUEZ, F. 1984. Parques nacionales de México y reservas equivalentes: pasado, presente y futuro. Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM, México. 226 p.
- VÁSQUEZ-BOLAÑOS, M.; NAVARRETE-HEREDIA, J. L. 2004. Checklist of the ants (Hymenoptera: Formicidae) from Jalisco state, México. *Sociobiology* 43(2): 351-365.
- ZUNINO, M.; ZULLINI, A. 2003. Biogeografía: la dimensión espacial de la evolución. Fondo de Cultura Económica, México. 359 p.

Recibido: 05-feb-05 • Aceptado: 10-jun-05

Uso de macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de la calidad de agua en el río Rímac, Lima-Callao, Perú

Use of benthic macroinvertebrates as bioindicators of water quality in Rímac River, Lima-Callao, Perú

CHRISTIAN PAREDES E.^{1,2}, JOSÉ IANNAcone O.^{1,3}, LORENA ALVARIÑO F.^{1,4}

Resumen. Las comunidades de macroinvertebrados bentónicos (MIB) pueden emplearse como eficientes indicadores biológicos de la calidad de agua en los ecosistemas dulceacuícolas. Durante el período Octubre del 2002 a Setiembre del 2003, se desarrollaron evaluaciones de MIB en el río Rímac, aguas abajo de la Atarjea, Lima- Callao, Perú. El objetivo fue analizar su composición faunística, riqueza de familias y calidad del agua con base en el índice Biological Monitoring Working Party modificado (BMWP' modif.). La evaluación se realizó en seis estaciones de muestreo ubicadas a lo largo del curso del río Rímac, que cruza Lima y Callao. Se registraron 35 taxa de MIB: Hexapoda (27), Annelida (2), Mollusca (2), Arachnida (2), Plathyelminthes (1) y Chilopoda (1). De los 2.166 especímenes coleccionados, Oligochaeta (n = 597) obtuvo la mayor abundancia absoluta, seguido por Psychodidae (n = 521), Physidae (n = 442), Chironomidae (n = 300) y Dixidae (n = 168). El índice BMWP' modif. valoró el agua del Río Rímac, aguas abajo de la Atarjea como de calidad crítica o de aguas muy contaminadas (29 puntos). De los análisis fisicoquímicos evaluados, la Demanda Bioquímica de Oxígeno, indicó efectos de perturbación en el ecosistema acuático. Finalmente se analizó la potencialidad del empleo de los MIB para evaluar la calidad de agua de los ríos en el Perú.

Palabras clave: Agua dulce. BMWP' modif. Contaminación. Indicador biológico. Perú.

Summary. The communities of benthic macroinvertebrates (BMI) can be used as efficient biological indicators of the water quality in fresh aquatic ecosystems. Between October 2002 and September 2003, evaluations of MIB were developed in the Rímac River downstream from Atarjea, Lima- Callao, Peru. The objective was to analyze their faunistic composition, richness of families and water quality, based on the modified Biological Monitoring Working Party index (BMWP' modified). The evaluation was conducted in six sampling stations located along the course of the Rimac river that crosses Lima and Callao. Thirty-five taxa of BMI were reported: Hexapoda (27), Annelida (2), Mollusca (2), Arachnidae (2), Plathyelminthes (1) and Chilopoda (1). From 2,166 specimens collected, Oligochaeta (n = 597) had the higher absolute abundance, followed by Psychodidae (n = 521), Physidae (n = 442), Chironomidae (n = 300), and Dixidae (n = 168). The modified BMWP' index scored the water of Rimac River downstream from Atarjea as critical quality or very polluted waters (29 points). Of all the physicochemical analyses evaluated, Biochemical Oxygen Demand indicated perturbation effects in this freshwater ecosystem. Finally, the potential of the BMI to evaluate the water quality of the rivers in Peru is analyzed.

Key words: Water. BMWP' modif. Contamination. Biological indicator. Perú.

Introducción

Las comunidades de macroinvertebrados bentónicos (MIB) empleados como bioindicadores acuáticos vienen aumentando en estos últimos años en lo que respecta a la protección y restauración de los ambientes acuáticos (Brown *et al.* 1997; Cole 1998; Wetzel y Likens 2000; Acosta 2001, Marques *et al.* 2001; Metzeling *et al.* 2003). En contraste con los análisis fisicoquímicos y microbiológicos, que sólo proporcionan información puntual e indirecta, la evaluación de las comunidades de macroinvertebrados en los ecosistemas acuáticos, con énfasis en insectos, proporcionan una excelente alternativa en el diagnóstico de la calidad del agua (Huryn y Wallace 2000; Baptista

et al. 2001; Galdean *et al.* 2001; Rogers *et al.* 2002; Figueroa *et al.* 2003).

Muchos representantes de estos grupos de invertebrados pueden distribuirse en distintos tipos de condiciones ambientales, así como ser muy susceptibles a la contaminación, motivo por el cual son recomendados en el establecimiento de sistemas de vigilancia y control de los ecosistemas hídricos (Leslie *et al.* 1999; Ogbeibu y Oribhabor 2002; Riss *et al.* 2002; Iannacone *et al.* 2003). El Perú es uno de los países Neotropicales que enfrenta serios problemas de contaminación de sus ambientes lóticos (Paredes *et al.* 2004).

Se han empleado los índices de diversidad y bióticos usando a los insectos

acuáticos para caracterizar biológicamente los cuerpos de agua dulce (Iannacone *et al.* 2000; Moreno 2001; Fenoglio *et al.* 2002; Gonçalves y Aranha 2004; Paredes *et al.* 2004). El objetivo del presente trabajo fue analizar la composición faunística, riqueza de familias y calidad del agua empleando el Índice biótico BMWP' modif. (Biological Monitoring Working Party modificado) en el río Rímac aguas abajo de la Atarjea, Callao-Lima, Perú durante el período Octubre 2002 a Setiembre del 2003.

Materiales y Métodos

Zona de estudio: Incluyeron seis estaciones de muestreo establecidas en la trayectoria del río Rímac desde las inmediaciones del puente Graña (Estación 6), cercana a la sede de captación o

1 Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad Nacional Federico Villarreal, Calle San Marcos 383, Lima-21, Perú.

2 E-mail: chepeeco@hotmail.com

3 E-mail: joseiannacone@yahoo.es

4 E-mail: lalvarino@sedapal.com.pe

bocatoma de la Atarjea de SEDAPAL en el distrito de El Agustino, Lima, Perú hasta las cercanías del puente Gambeta (Estación 1), en el Callao, próxima a la desembocadura al mar (Fig. 1) Este recorrido tiene aproximadamente 17,5 Km de longitud, con una pendiente aproximada de 1,1 % y disminuyendo desde los 195 a los 0 msnm (Fig. 1). Se determinó la ubicación geográfica de cada una de las estaciones de muestreo con un GPS 12 Garmin (Fig. 1). El río Rímac es considerado de cuarto orden según la clasificación de Strahler (Wetzel y Likens 2000).

Muestreos: Se realizaron muestreos mensuales entre Octubre 2002 y Setiembre 2003. Los análisis fisicoquímicos incluyeron mediciones de: pH y conductividad eléctrica (CE: ohm.cm^{-2}) mediante instrumentales portátiles marca Hanna®, temperatura en $^{\circ}\text{C}$ mediante un termómetro de mercurio. Los datos de caudal ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) y de velocidad superficial promedio (m.s^{-1}) del río se obtuvieron siguiendo el método propuesto por Lind (1979). El Oxígeno Disuelto (OD) y la Demanda Bioquímica de Oxígeno ($\text{DBO}_{5,20}$) en mg L^{-1} siguieron el protocolo propuesto por Winkler (APHA 1995).

El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad Nacional Federico Villarreal, Pueblo Libre, Lima, Perú.

Para tomar las muestras biológicas en las estaciones de estudio se emplearon: el método manual y la técnica rápida de Hynes modificada, con un muestreador Surber modificado, una red estándar de $30 \times 30 \text{ cm}^2$ con abertura de 1 mm (Paredes *et al.* 2004). Cada muestra biológica fue separada a nivel de familia y se fijaron con EtOH 70 % en viales de vidrio de 5 ml debidamente rotulados. Para los moluscos se siguió el procedimiento descrito por Thiengo *et al.* (2001) y para la identificación de los Hexapoda se usaron claves taxonómicas especializadas (Stehr 1987; Borror *et al.* 1995; Merritt y Cummins 1996). Para la determinación de la composición faunística y la riqueza de familias de los macroinvertebrados bentónicos se empleó el nivel taxonómico de familia por su relativa facilidad y rapidez, y por su capacidad de aportar información ecológica (Metzeling *et al.* 2003). Material representativo se depositó en el Museo de Entomología del Programa Nacional de Control Biológico (PNCB), Lima, Perú.

Análisis de datos: Se empleó el análisis de componentes principales (ACP) como

un criterio de reducción y ordenación de los siete parámetros fisicoquímicos y de los catorce índices de diversidad alfa, obtenidos de cada una de las seis estaciones de muestreo, para producir variables compuestas no relacionadas. Se realizó la rotación varimax para facilitar la interpretación de los componentes del ACP (Zar 1996; Vivanco 1999). Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson entre los índices bióticos y algunos taxa más abundantes. Se aplicó el índice biótico BMWP' modificado por Zúñiga de Cardoso *et al.* (1997) citado por Domínguez y Fernández (1998) propuesto para este estudio, que al igual que

el BMWP (Hellawell 1978), identifica un nivel de calidad de agua de acuerdo con un puntaje otorgado a ciertas familias de MIB que se encuentren en el cuerpo de agua, con la diferencia que esta modificación fue adaptada para la fauna local de la región Neotropical (Tabla 1). Similarmente el puntaje total o por estación corresponde a un valor de calidad previamente establecido (Tabla 2). También se emplearon los siguientes índices de Marqués *et al.* (2001): (Ephemeroptera + Plecoptera + Trichoptera = EPT) / Chironomidae (= Q); EPT / (EPT + Q) y porcentaje de Chironomidae en Diptera. Así como el índice de Goodnight y

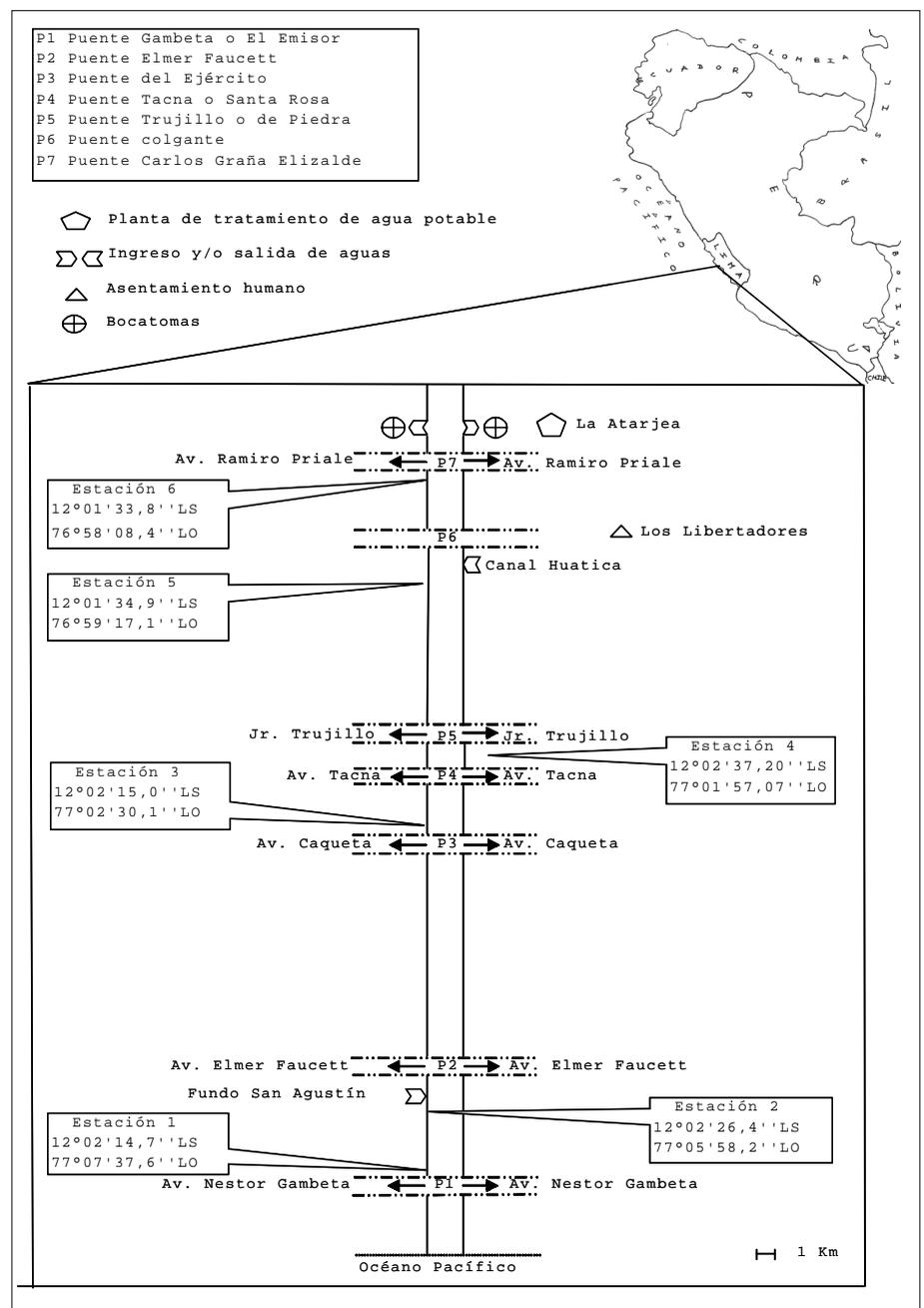


Figura 1. Estaciones de muestreo en el río Rímac, Lima, Perú.

Tabla 1. Puntuaciones asignadas a las diferentes familias de MIB para la obtención del Índice BMWP' modif.

Puntuación 10	Puntuación 7	Puntuación 4	Puntuación 3
Blepharoceridae	Calopterygidae	Belostomatidae	Glossiphoniidae
Calamoceratidae	Corixidae	Ceratopogonidae	Gyrinidae
Euthyplocidae	Glossosomatidae	Chrysomelidae	Hydrometridae
Gomphidae	Leptohyphidae	Curculionidae	Hydrophilidae
Helicopsychidae	Scirtidae	Dolichopodidae	Lymneidae
Lampyridae		Empididae	Nepidae
Leptophlebiidae	Puntuación 6	Haliplidae	Physidae
Odontoceridae		Mesoveliidae	Planorbidae
Oligoneuriidae	Aeshnidae	Naucoridae	
Perlidae	Ancylidae	Psychodidae	Puntuación 2
Polythoridae	Coenagrionidae	Pyrallidae	Chironomidae
Psephenidae	Dryopidae	Scarabaeidae	Culicidae
Ptilodactylidae	Elmidae	Stratiomyidae	Muscidae
	Libellulidae	Tabanidae	
Puntuación 8	Luthrochidae	Tipulidae	Puntuación 1
	Noteridae		Oligochaeta*
Baetidae	Staphylinidae		
Corydalidae			
Hyaellidae	Puntuación 5		
Hydrobiosidae			
Hydroptilidae	Dugesidae		
Leptoceridae	Gelastocoridae		
Lestidae	Hydropsychidae		
Philopotamidae	Notonectidae		
Pleidae			
Polycentropidae			
Pseudothelpusidae			
Saldidae			
Simuliidae			
Xiphocentronidae			

* Clase

Whittley que se basa en la relación: (Número de oligoquetos (Annelida) / Total de organismos béticos) x 100, siendo > 80% como altamente contaminado; 60 – 80%, dudoso y < 60% de buena condición (Washington 1984). Con la finalidad de evaluar la diversidad alfa en las comunidades macrozoobentónicas de la zona estudiada, se utilizaron los siguientes índices: Shannon-Wiener (Washington 1984), el índice de diversidad de Margalef (D_{mg}), el índice de equidad de Pielou, los números de la serie de Hill, el índice de dominancia de Mcintosh (D) y el índice de Berger-Parker (d) (Moreno 2001). Para la diversidad beta de similitud entre las seis estaciones de la zona de estudio, se usó el índice cualitativo de Sørensen (I_s) y el índice de Sørensen cuantitativo (IS_{cuant}) (Moreno 2001). Así mismo, para las familias más abundantes se determinó la distribución espacial (al azar, amontonada o uniforme), utilizando el criterio de S²/ X (Varianza / Promedio de individuos por estación). Para todos los casos se empleó un nivel de significancia de alfa = 0,05 (Zar 1996).

Resultados y discusión

Los promedios de siete parámetros físicoquímicos evaluados mensualmente de Octubre 2002 a Setiembre del 2003 son señalados en la Tabla 3. La DBO_{5,20} para las estaciones uno a la cinco, indicó perturbación e impacto en el río Rímac. El valor promedio anual obtenido en este estudio fue más alto que el valor permisible por la Ley General de Aguas (LGA) peruana vigente. El coeficiente de variación (CV) se vio incrementado expresamente para este parámetro (Tabla 3). La estación dos presentó niveles de degradación ambiental en términos de DBO_{5,20}, OD y CE, aparentemente como consecuencia de los efluentes vertidos por las

Tabla 2. Valoración de calidad de agua para la obtención del BMWP' modif. (Domínguez y Fernández 1998)

Calidad	Valor	Significado
Muy Buena	> 150	Aguas muy limpias
Buena	101 - 120	Aguas no contaminadas o no alteradas de modo sensible
Aceptable	61 - 100	Son evidentes algunos efectos de contaminación
Dudosa	36 - 60	Aguas contaminadas
Crítica	16 - 35	Aguas muy contaminadas
Muy Crítica	< 15	Aguas fuertemente contaminadas

Tabla 3. Parámetros físicoquímicos por estaciones de muestreo en el río Rímac, Lima-Callao, Perú.

Parámetro	Estaciones						Prom. ± DE	CV %
	1	2	3	4	5	6		
Velocidad (m.s ⁻¹)	141,89	162,05	129,27	96,22	107,68	75,88	118,83 ± 31,59	27
Caudal (m ³ .s ⁻¹)	4,4	5,29	2,09	7,73	3,66	1,59	4,13 ± 2,25	54
Temperatura (°C)	19,55	21,08	19,46	20,34	20,42	20,71	20,26 ± 0,64	3
pH	7,87	7,63	7,92	7,61	7,98	8,08	7,85 ± 0,19	2
CE (ohms.cm ⁻²)	0,83	1,15	0,61	0,63	0,55	0,64	0,74 ± 0,22	30
OD (mg.L ⁻¹)	6,32	3,46	7,97	7,13	8,91	9,96	7,29 ± 2,27	31
DBO _{5,20} (mg.L ⁻¹)	54,32	98,97	12,46	22,17	6,5	4,63	33,18 ± 37,02	112

Prom.: Promedio, DE: Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación.

CE: Conductividad específica, OD: Oxígeno disuelto, DBO_{5,20}: Demanda bioquímica de oxígeno.

inmediaciones del fundo San Agustín (Callao). Tanto el OD y el pH se encontraron dentro del límite permisible por la LGA peruana vigente. Hay que resaltar que a pesar de la pendiente que presenta el río Rímac en la zona de estudio (1,1 %) y además de la presencia de pantallas, que logran incrementar la velocidad superficial del agua y los niveles de oxígeno, estos no son suficientes para oxidar la tremenda carga orgánica disuelta en sus aguas como lo demuestran los niveles de DBO_{5,20} (Tabla 3).

El ACP produjo tres componentes con Eigenvalues > 1 para los parámetros fisicoquímicos (Tabla 4). Los parámetros fisicoquímicos fueron ordenados en un espacio de dos dimensiones, de acuerdo con el ACP (Fig. 2). La velocidad, DBO, CE y OD del agua estuvieron correlacionados con el primer componente que explicó el 64,804 % de la variabilidad. El caudal y pH estuvieron correlacionados con el segundo componente que explicó el 18,245 % de la variabilidad (Tabla 4). El tercer componente describió la variación en la temperatura del agua (Tabla 4). El CP1 va en relación con el factor oxígeno. Muy correlacionado al OD se encuentra la DBO, esta última a su vez esta relacionada con la carga orgánica que afecta a la CE. Finalmente, la velocidad del cuerpo de agua permite el ingreso de dosis importantes de oxígeno superficial al cuerpo de agua lóxico. EL CP2 correlaciona el caudal y el pH. El caudal se incrementa o se reduce, por la incorporación de aguas residuales de distintos tipos que caracterizan las seis estaciones, ya sea industrial, doméstica o agrícola, y que indudablemente afectan los niveles de pH (Bispo *et al.* 2002).

Se registraron 35 taxa con predominancia de Oligochaeta (28 %), Psychodidae (24 %), Physidae (20 %), Chironomidae (14 %) y Dixidae (8 %) (Tabla 5). Los cinco

Tabla 4. Resumen del análisis de componentes principales (CP) de los parámetros fisicoquímicos.

Parámetros	CP1	CP2	CP
Eigenvalue	4,536	1,277	1,040
% de la varianza	64,804	18,245	14,854
Velocidad (m.s ⁻¹)	0,942	0,109	-0,245
DBO _{5,20} (mg.L ⁻¹)	0,928	0,280	0,216
CE (ohms.cm ²)	0,919	0,154	0,330
OD (mg.L ⁻¹)	-0,879	-0,468	-0,080
Caudal (m ³ .s ⁻¹)	0,111	-0,978	0,086
pH	-0,426	-0,881	-0,100
Temperatura (°C)	0,090	-0,113	0,982

Los valores más altos en cada componente para cada variable son mostrados en negrita.

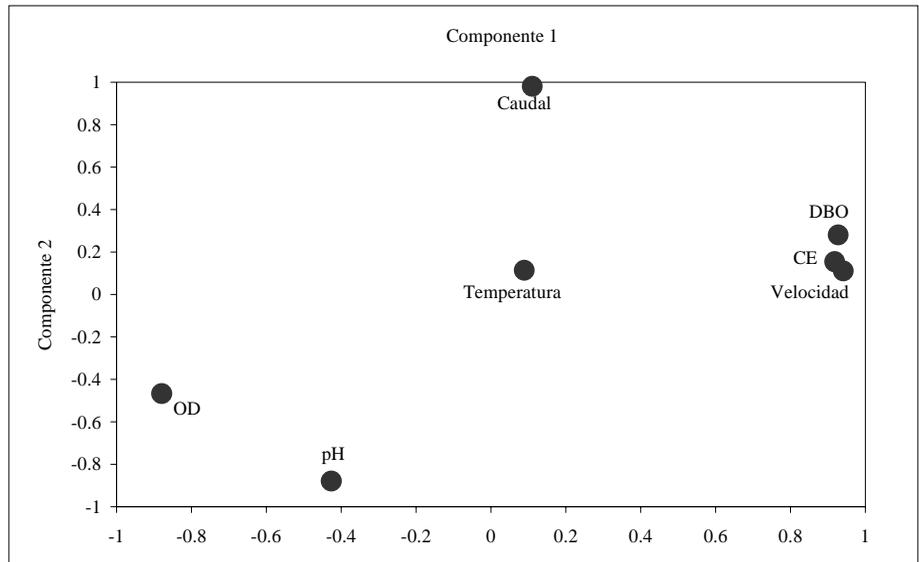


Figura 2. Ordenación de ACP de los parámetros fisicoquímicos del río Rímac, Lima, Perú.

Tabla 5. Abundancia de macroorganismos por estaciones de muestreo colectados en el río Rímac, Lima-Callao, Perú. Muchos de ellos son Macroinvertebrados Bentónicos (MIB)

Taxón superior ¹	Taxón subordinado ¹	Total	Nº estaciones que presentaron este taxa
Platyhelminthes*	Trematoda**	7	1
Annelida*	Hirudinea**	2	1
Annelida*	Oligochaeta**	597	6
Arachnida**	Araneae****	2	2
Arachnida**	Acari****	1	1
Arthropoda*	Chilopoda**	1	1
Collembola	Arthropleona*****	1	1
Ephemeroptera	Baetidae	2	1
Ephemeroptera	Baetiscidae	1	1
Ephemeroptera	Ephemerellidae	1	1
Ephemeroptera	Heptageniidae	6	3
Ephemeroptera	Siphonuridae	3	3
Orthoptera	Blattidae	1	1
Dermaptera	Carcinophoridae	1	1
Coleoptera	Carabidae	1	1
Coleoptera	Dytiscidae	4	3
Coleoptera	Hydrophilidae	2	2
Coleoptera	Staphylinidae	3	2
Trichoptera	Glossosomatidae	32	3
Trichoptera	Hydropsychidae	8	3
Trichoptera	Hydroptilidae	12	3
Trichoptera	Philopotamidae	1	1
Diptera	Chironomidae	300	6
Diptera	Dixidae	168	6
Diptera	Dolichopodidae	4	2
Diptera	Empididae	1	1
Diptera	Muscidae	18	6
Diptera	Psychodidae	521	6
Diptera	Sarcophagidae	2	2
Diptera	Sciomyzidae	1	1
Diptera	Stratiomyidae	2	2
Diptera	Tipulidae	2	2
Hymenoptera	Formicidae ²	13	3
Pulmonata***	Goniobasis*****	3	3
Pulmonata***	Physidae	442	4

¹No todos los taxa son órdenes o familia. ²Familia no acuática, foránea al sistema pudo caer en las trampas por accidentado. * Phylum ** Clase *** Subclase ****Orden *****Suborden *****Género

taxones más abundantes presentaron una distribución espacial contagiosa por presentar una relación $S^2 / X > 1$, como Oligochaeta (49,9), Psychodidae (194,8), Physidae (203,5), Chironomidae (56,2) y Dixidae (36,7). Los cuatro primeros taxa son considerados tolerantes y capaces de habitar en lugares con elevadas concentraciones de detritus orgánico que forma parte de su dieta y en tenores de concentración de oxígeno bajos (Figuroa *et al.* 2003).

Se obtuvo un puntaje biótico de 29 (Tabla 6), que según el BMWP' modif. caracteriza al río Rímac como de calidad crítica o de aguas muy contaminadas (Tabla 2). Según el puntaje obtenido para cada estación, se puede observar que las estaciones uno y dos presentan aguas fuertemente contaminadas o de calidad muy crítica, las estaciones tres y cuatro presentan aguas muy contaminadas o de calidad crítica, y las estaciones cinco y seis presentan aguas contaminadas o de calidad dudosa (Tabla 2). Es importante mencionar que sólo las estaciones cinco y seis cuentan con cercos perimétricos que de alguna manera impiden una mayor influencia antrópica. La Tabla 6 muestra los 14 índices bióticos empleados en el estudio de ecosistemas acuáticos. Podemos notar comparando los índices de dominancia evaluados que existe una notable variación. El valor promedio anual del índice de Simpson (C) y el de Berger-Parker (d) podrían estar diagnosticando buena calidad a las aguas evaluadas, en contraste, para el índice de McIntosh (D) éstas son de pobre calidad. Tal incongruencia de resultados se observa también para el índice de Goodnight y Whittley, el cual valora a las aguas del río Rímac como de buena condición. Finalmente, evaluando el índice de

Shannon-Wiener (H) (1,85), el río Rímac presentaría aguas moderadamente contaminadas (Tabla 6). Según Oliveira y Bispo (2001) las variaciones en la abundancia de los MIB pueden atribuirse a la disponibilidad de recursos, competencia, depredación y el ciclo de vida. Sin embargo, en ambientes donde impera la degradación ambiental, es importante considerar el efecto antrópico del mismo en la comunidad biótica, la cual evidentemente determina la distribución y estructura de los MIB (Riss *et al.* 2002; Figuroa *et al.* 2003; Gonçalves y Aranha 2004).

De los cinco taxa más abundantes como lo valora el N_2 de la serie de Hill, solo la familia Chironomidae obtuvo una correlación positiva significativa con la BMWP' ($r = 0,87$; $p = 0,02$). Los otros cuatro taxa abundantes no presentaron correlaciones con la BMWP'. La $DBO_{5,20}$ encontró una correlación negativa con BMWP' ($r = -0,82$; $p = 0,04$) y con H ($r = -0,81$; $p = 0,04$); y solo con el taxa Psychodidae una correlación positiva ($r = 0,98$; $p << 0,05$). Los otros cuatro taxa abundantes no presentaron correlación significativa con la $DBO_{5,20}$. Por otro lado, Dixidae y Oligochaeta presentaron una correlación positiva ($r = 0,88$; $p = 0,02$). El aumento de la abundancia de Chironomidae resultó en un aumento en la BMWP'. Hecho que no coincide con lo referido por algunos autores (Figuroa *et al.* 2003) y en la afirmación de que el aumento del grado de contaminación orgánica produciría un incremento de Chironomidae. Este resultado incorporaría nuevas variables para nuevos estudios en ecosistemas de calidad crítica a muy crítica donde parece que la familia Chironomidae no podría ser empleada individualmente como un indicador ade-

cuado de aguas degradadas (Figuroa *et al.* 2003).

En adición, se nota la presencia de la familia Dixidae en un ecosistema netamente lótico, cuando esta familia se encuentra relacionada con ambientes lénticos, como lo afirman Merritt y Cummins (1996). Posiblemente han sido traídos por arrastre al río Rímac o quizá estaríamos tratando con una excepción del comportamiento de la familia, lo cuál también quedaría para ser dilucidado en próximos estudios.

Los dendrogramas cualitativos y cuantitativos construidos con base en los índices de diversidad beta evaluados para comparar las estaciones de muestreo se aprecian en las Figuras. 3 y 4. El análisis cualitativo agrupó dos sectores, el primero conformado por las estaciones cuatro, cinco y seis, y el segundo conformado por las estaciones uno, dos y tres; distinguiéndose a sí un sector alto y uno bajo, éste último más comprometido con la actividad antrópica. El análisis cuantitativo agrupó las estaciones en tres sectores diferenciables; el primer sector conformado por las estaciones tres y cuatro, de bastante similitud; el segundo sector conformado por las estaciones uno y cinco, de regular similitud; finalmente el sector conformado por las estaciones dos y seis, de poca similitud. La estación dos presenta el mayor grado de degradación ambiental y en contraste la estación seis presentó el menor (Figs. 3-4).

El ACP produjo dos componentes con Eigenvalues > 1 para los índices bióticos (Tabla 7). Los índices bióticos de diversidad alfa fueron ordenados en un espacio de dos dimensiones, de acuerdo al ACP (Tabla 7; Fig. 5). Ocho índices bióticos (Números de Hill- N_1 , McIntosh, Números de Hill- N_2 , Simpson, Pielou, Berger-Parker, Shannon-Wiener, Margalef, Goodnight & Whittley, Números de Hill- N_0) estuvieron correlacionados con el primer componente, que explicó el 71,084 % de la variabilidad. Otros cuatro índices bióticos (ETP/ETP + Chironomidae, ETP/Chironomidae, % Chironomidae en Diptera, BMWP' modif.) estuvieron correlacionados con el segundo componente, que explicó el 20,323 % de la variabilidad (Tabla 7).

El estudio de los MIB como organismos indicadores de calidad de agua permite estimar si han sido afectados por cambios físicos o químicos de su hábitat, pero no indica cual es la causa específica que los afecta, lo cual debe ser estimado mediante asociación con información del hábitat físico (e.g. substrato de fondo, ve-

Tabla 6. Índices bióticos de diversidad alfa (α) de familias para el río Rímac, Lima-Callao, Perú.

Índices	Estaciones						Prom.
	1	2	3	4	5	6	
BMWP' modif.	15	13	24	31	45	44	29
ETP/Chironomidae	0,25	0	0,1	0,12	0,18	0,44	0,22
ETP/ETP + Chironomidae	0,2	0	0,09	0,12	0,18	0,31	0,18
% Chironomidae en Diptera	2	1	26	51	81	87	29
Goodnight & Whittley	0,36	0,04	0,56	0,54	0,25	0,06	0,28
Shannon-Wiener, H'	1,34	0,42	1,29	1,51	1,68	1,18	1,85
Simpson, C	0,35	0,84	0,38	0,34	0,24	0,5	0,2
Pielou, J'	0,49	0,2	0,48	0,54	0,59	0,43	0,52
Margalef, Dmg	2,43	1,19	2,38	2,71	2,65	2,45	2,30
McIntosh, D	0,43	0,09	0,4	0,45	0,53	0,31	0,56
Berger-Parker, d	0,46	0,92	0,56	0,54	0,35	0,69	0,28
Números de Hill, N_0	15	8	15	16	17	16	36
Números de Hill, N_1	4	2	4	5	5	3	6
Números de Hill, N_2	3	1	3	3	4	2	5

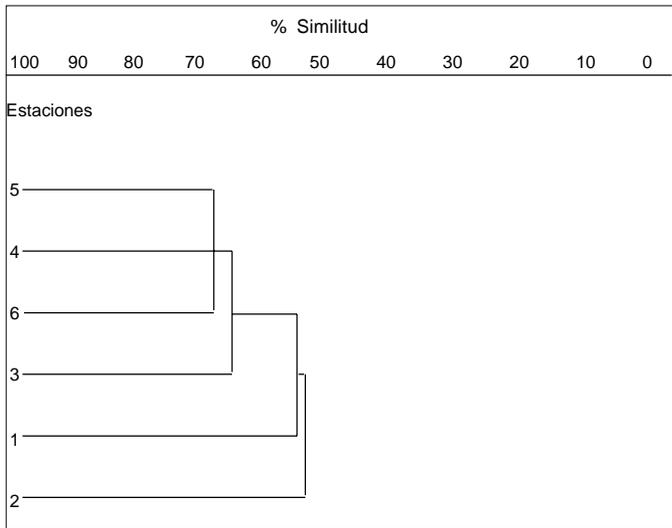


Figura 3. Análisis cualitativo de similitud empleando el Índice de Sørensen para las estaciones de muestreo en el río Rímac. 1. Puente Graña; 2. Canal Huatica; 3. Puente Trujillo; 4. Puente del Ejército; 5. Puente Faucett; 6. Puente Gambeta.

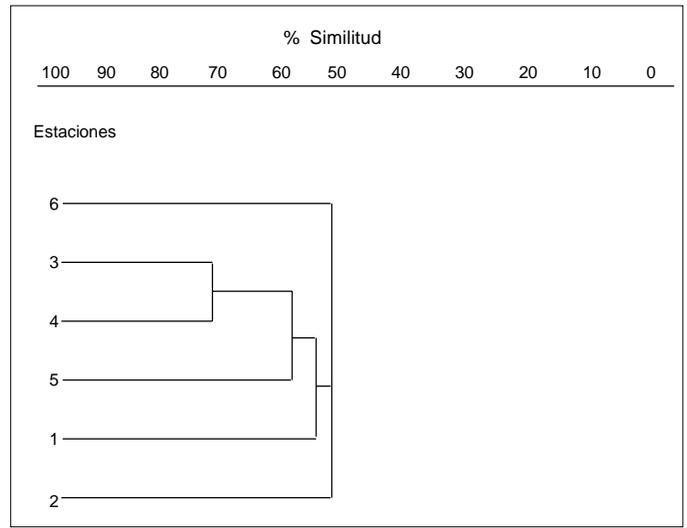


Figura 4. Análisis cuantitativo de similitud empleando el Índice de Sørensen para las estaciones de muestreo en el río Rímac. 1. Puente Graña; 2. Canal Huatica; 3. Puente Trujillo; 4. Puente del Ejército; 5. Puente Faucett; 6. Puente Gambeta.

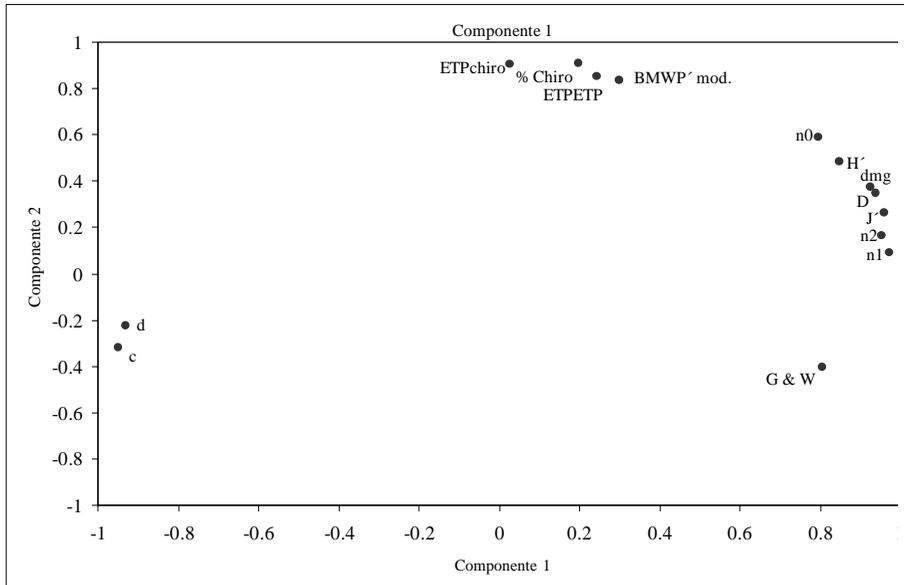


Figura 5. Ordenación de ACP de los índices bióticos de la diversidad alfa de los MIB del río Rímac, Lima, Perú. ETPchiro = ETP/Chironomidae. ETP/ETP = ETP/ETP + Chironomidae. % Chiro = % Chironomidae en Diptera. G y W = Goodnight y Whittley. H' = Shannon-Wiener. C = Simpson. J' = Pielou. Dmg = Margalef. D = McIntosh. d = Berger-Parker. N₀ = Números de Hill- N₀, N₁ = Números de Hill-N₁, N₂ = Números de Hill-N₂.

Tabla 7. Resumen del análisis de componentes principales (CP) de los Índices bióticos de diversidad alfa (α).

Índices	CP1	CP2
Eigenvalue	9,952	2,845
% de la varianza	71,084	20,323
Números de Hill, N ₁	0,972	0,093
McIntosh, D	0,959	0,267
Números de Hill, N ₂	0,955	0,163
Simpson, C	-0,950	-0,296
Pielou, J'	0,938	0,347
Berger-Parker, d	-0,931	-0,222
Shannon-Wiener, H'	0,925	0,377
Margalef, Dmg	0,849	0,486
Goodnight & Whittley	0,805	-0,399
Números de Hill, N ₀	0,796	0,588
ETP/ETP + Chironomidae	0,197	0,912
ETP/Chironomidae	0,027	0,906
% Chironomidae		
en Diptera	0,243	0,852
BMWP' modif.	0,300	0,837

Los valores más altos en cada componente para cada variable son mostrados en negrita.

locidad de corrientes, profundidad) y con potenciales fuentes de estrés (e.g. contaminantes acuáticos) (Figueroa *et al.* 2003).

Los resultados sugieren que el BMWP' es un buen indicador de la calidad de las aguas del río Rímac. Sin embargo, la aplicación del BMWP' en otras cuencas debiera realizarse con precaución debido a que pueden existir factores diferentes que pudieran afectar a las comunidades acuáticas. Al respecto se

sugiere complementar el estudio de los MIB con adecuadas caracterizaciones de la columna de agua, ictiofauna, actividades productivas desarrolladas en la cuenca y evaluaciones experimentales de taxa locales frente a diferentes tipos de contaminantes (Figueroa *et al.* 2003; Paredes *et al.* 2004).

Conclusiones

- Se registraron 35 familias de macroinvertebrados bentónicos (MIB): Hexa-

poda (27), Annelidae (2), Mollusca (2), Arachnidae (2), Plathyhelminthes (1) y Chilopoda (1). De los 2.166 especímenes coleccionados Oligochaeta obtuvo la mayor abundancia absoluta; seguido por Psychodidae, Physidae, Chironomidae y Dixidae.

- El índice Biological Monitoring Working Party modificado (BMWP' modif.), valoró el agua del Río Rímac, aguas abajo de la Atarjea, como de calidad crítica o de aguas muy contaminadas (29 puntos).

• La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_{5,20}), indicó efectos de perturbación en el ecosistema acuático.

Agradecimientos

A Álvaro Torres, María Isabel La Torre, Rafael La Rosa, Alfonso Lizarraga, Carlos Santa Cruz, Ana Gutiérrez, Margarita Robles, Augusto Mendoza, Edith Aguilar, Ana Carolina Paucar, Vicenta Morales, Jorge De la Cruz, Eric Carreño, María del Carmen León, Francisco Valdez, Denia Salinas, Pedro José Paredes, Fabiola Isabel Correa, Gloria Asunción Espinal, Víctor Miguel Espinal, Adrián Ernesto Paredes y Óscar Iván García por su ayuda y apoyo en esta investigación.

Literatura citada

- ACOSTA, C.R.R. 2001. Patrones de diversidad espacio-temporal de insectos acuáticos y caracterización limnológica en la quebrada Cantón, Tributaria del río Rímac (Huarochirí, Lima). Resúmenes. XLIII Convención Nacional de Entomología. Perú. p 75. Huancayo.
- APHA. 1995. Standard Methods for the examination of water and wastewater. Public Health Assoc. Washington. 19th Ed. 8:1-21p, 10:106-127p, 10:153-173p.
- BAPTISTA, D.F., BUSS, D.F., DORVILLE, L.F., NESSIMIAN, J.L. 2001. Diversity and habitat preference of aquatic insects along longitudinal gradient of the Macae River basin, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 61: 249-258.
- BISPO, P.C., FROEHLICH, C.G., OLIVEIRA, L.G. 2002. Stonefly (Plecoptera) fauna of streams in a mountainous area of Central Brazil: abiotic factors and nymph density. *Revista Brasileira de Zoologia* 19 (Supl. 1): 325-334.
- BORROR, D., DE LONG, D., THRIPLHORN, C. 1995. An introduction to the study of insects. Saunders College Publishing. USA. 6th Ed. 827 p.
- BROWN, S.C., SMITH, K., BATZER, D. 1997. Macroinvertebrate response to wetland restoration in northern New York. *Environmental Entomology* 26:1016-1024.
- COLE, G.A. 1998. Manual de Limnología. Ed. Hemisferio Sur S.A. Argentina. 405 pp.
- DOMÍNGUEZ, E., FERNÁNDEZ, H.R. 1998. Calidad de los Ríos de la Cuenca del Salí (Tucumán, Argentina) medido por un índice biótico. Serie Conservación de la Naturaleza. Fundación Miguel Lillo, Tucumán. Argentina. 38 p.
- FENOGLIO, S., BADINO, G., BONA, F. 2002. Benthic macroinvertebrate communities as indicators of river environment quality: an experience in Nicaragua. *Revista biología tropical* 50: 1125-1131.
- FIGUEROA, R., VALDOVINOS, C., ARAYA, E., PARRA, O. 2003. Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua de ríos del sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 275-285.
- GALDEAN, N., CALLISTO, M., BARBOSA, F.A. 2001. Biodiversity assessment of benthic macroinvertebrates in altitudinal ecosystems of Serra do Cipo (MG, Brazil). *Brazilian Journal of Biology* 61: 239-248.
- GONÇALVES, F.B., ARANHA, J.M.R. 2004. Spatial occupation and spatio-temporal by benthonic macroinvertebrates in Riberão river, Paranaíba, PR (Brazil). *Acta Biologica Paraná, Curitiba* 33: 181-191.
- HELLAWELL, J.M. 1978. Biological surveillance of rivers- (A biological monitoring handbook). Natural Environment Research Council. Water Research Center-Regional Water Authorities. England. p. 135-262.
- HURY, A.D., WALLACE, J.B. 2000. Life history and production of stream insects. *Annual Review of Entomology* 45: 83-110.
- IANNACONE, J., ALVARIÑO, L., MORENO, R., REYES, M., CHAUCA, J. 2000. Culicids (Diptera) of the Chillón River and adjacent areas from Constitutional Province of Callao, Peru, during "El Niño" event 1997-1998. *Acta Entomológica Chilena* 24: 51-60.
- IANNACONE, J., MANSILLA J., VENTURA, J. 2003. Macroinvertebrados en las lagunas de Puerto Viejo, Lima -Perú. *Ecología Aplicada* 2: 116-124.
- LESLIE, H.A., PAVLUK, T., DE VAATE, A.B., KRAAK, M.H. 1999. Triad assessment of the impact of chromium contamination on benthic macroinvertebrates in the Chusovaya river (Urals, Russia). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37: 182-189.
- LIND, O.T. 1979. Handbook of common methods in Limnology. C.V. Mosby Company. U.K. 199 p.
- MARQUÉS, M.J., MARTÍNEZ-CONDE, E., ROVIRA, J.V. 2001. Los macroinvertebrados como índices de evaluación rápida de ecosistemas acuáticos contaminados por metales pesados. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* 4: 25-31.
- METZELING, L., CHESSMAN, B., HARDWICK, R., WONG, V. 2003. Rapid assessment of rivers using macroinvertebrates: the role of experience, and comparison with quantitative methods. *Hydrobiologia* 510: 39-52.
- MERRITT, R.W., CUMMINS, K.M. 1996. An introduction to the aquatic insects of North America. Kendall Hunt Publishing Co. Dubuque, IA. U.S.A. 3rd. Ed. XIII + 862 p.
- MORENO, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. Manuales y Tesis SEA. Sociedad Entomológica Aragonesa Ed. Madrid, España. 80 p.
- OGBEIBU, A.E., ORIBHABOR, B.J. 2002. Ecological impact of river impoundment using benthic macro-invertebrates as indicators. *Water Research* 36: 2427-2436.
- OLIVEIRA, L.G., BISPO, P.C. 2001. Ecología de comunidades das larvas de Trichoptera Kirby (Insecta) em dois córregos de primeira ordem da Serra dos Pireneus, Pirenópolis; Goiás, Brazil. *Revista Brasileira Zoologia* 18: 1245-1252.
- PAREDES, C., IANNACONE, J., ALVARIÑO, L. 2004. Macroinvertebrados bentónicos como indicadores biológicos de la calidad de agua en dos ríos de Cajamarca y Amazonas, Perú. *Revista Peruana de Entomología* 44: 107-118.
- RISS, W., OSPINA, R., GUTIÉRREZ, J.D. 2002. Establecimientos de valores de bioindicación para macroinvertebrados acuáticos de la sabana de Bogotá. *Caldasia* 24: 135-156.
- ROGERS, C.E., BRABANDER, D.J., BARBOUR, M.T., HEMOND, H.F. 2002. Use of physical, chemical, and biological indices to assess impacts of contaminants and physical habitat alteration in urban streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1156-1167.
- STEHR, W.F. 1987. Immature insects. Kendall/Hunt Publishing Company. Dubuque, Iowa. US. 754 p.
- THIENGO, S.C., FERNÁNDEZ, M.A., BOAVENTURA, M.F., GRAULT, C.E., SILVA, H.F.R., MATTOS, A.C, SANTOS S. B. 2001. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: I-Metropolitan Mesoregion. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 96: 177-184.
- VIVANCO, M. 1999. Análisis estadístico multivariable. Teoría y práctica. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. 234 p.
- WASHINGTON, H.G. 1984. Diversity, Biotic and similarity indices: A review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Research* 18: 653-694.
- WETZEL, R.G., LIKENS, G.E. 2000. Limnological analyses. Springer - Verlag, New York. 3th Ed. pp. 424-429.
- ZAR J. H. 1996. Bioestatistical analysis. 3th Ed. Prentice-Hall. Inc. Upper Saddle River, New Jersey. 662 p.

Un eslabón entre dos géneros cercanos de saltamontes payaso (Orthoptera: Eumastacidae): una nueva especie de Colombia

A link between two closely related genera of clown grasshoppers (Orthoptera: Eumastacidae): a new species from Colombia

MITZY FERNANDA PORRAS¹, ALBA BENTOS-PEREIRA²

Resumen. Se describe una nueva especie del género *Homeomastax* de la subfamilia Eumastacinae, en el área limítrofe entre las regiones Andina y Orinoquía (departamentos del Meta y Huila) de Colombia. Debido a características únicas en la anatomía fálica la especie se plantea como un eslabón entre los géneros *Erythromastax* y *Homeomastax*, además la coloración exclusiva de la especie llevan a plantear la posibilidad de una nueva clasificación en la subfamilia.

Palabras clave: *Homeomastax*. Fauna colombiana. Anatomía fálica.

Summary. A new species of the genus *Homeomastax* of the subfamily Eumastacinae is described found in the border area between the Andean and Orinoquia regions (Meta and Huila departments) of Colombia. Due to the unique features in the phallic anatomy of the species, it is proposed as a link between the genera *Erythromastax* and *Homeomastax*; additionally, the exclusive colour pattern of the species may lead to a new classification of the subfamily.

Key words: *Homeomastax*. Colombian fauna. Phallic anatomy.

Introducción

Los ortópteros eumastácidos comprenden las subfamilias Morseinae, Masynteinae, Parepisactinae, Pseudomastacinae, Paramastacinae, Temnomastacinae y Eumastacopinae y Eumastacinae en la región neotropical (Descamps 1973a), con un total de 162 especies en 29 géneros; en Colombia se encuentran cinco subfamilias, con un total de 14 géneros y 40 especies, siendo el género más importante *Eumastax*, que incluye 11 especies. Las principales contribuciones para el conocimiento del grupo en nuestro país lo constituyen los trabajos de Hebard (1923) y Descamps (1971, 1973a, 1979), este último describió numerosas especies y propuso la clasificación actual del grupo a nivel mundial (Descamps 1973b). Posteriormente Rowell y Bentos-Pereira (2001) realizaron una nueva revisión del género *Eumastax* y separaron *Homeomastax* debido a diferencias en los caracteres internos de genitalia.

Del género *Homeomastax* se conocen 22 especies, es probablemente el taxón más

rico en especies en selva lluviosa, se encuentra sobre helechos (Rowell & Bentos-Pereira 2001; Marquis 1991) y sobre otras plantas pertenecientes a las familias: Asteraceae, Piperaceae, Rubiaceae y Flacourtiaceae. Las especies de *Homeomastax* se distribuyen en cuatro grupos (Tabla 1).

El género se encuentra distribuido en Colombia desde la costa pacífica hasta los valles del río Cauca y Magdalena, siendo reemplazado desde allí por el género cercano, *Eumastax* (Rowell y Bentos-Pereira 2001). A partir de la revisión del material depositado en la colección del Instituto Humboldt (IAvH) se encontró material que corresponde a una nueva especie del grupo *Bouvieri*, que se describe a continuación:

***Homeomastax eduardoi* n. sp.** Figs.1 a-e.

Holotipo- 1 ♂: COLOMBIA: Huila: PNN Cueva de los Guácharos, Alto el Mirador, 1°38' N 76°6' W, 980m, M 2805. 7 dic 2001- 21 dic 2001(R. Paramero) espécimen MFP n° 003, ABP n° 647 Depositado en la colección del Instituto Humboldt.

Paratipo.- ♂: COLOMBIA: Meta, Sumapáz: Quebrada la Cristalina, 3°48' N 73°50' W 614m, M 4323. 19 sep 2003 - 4 oct 2003 (A. Torrijos) espécimen MFP n° 004, ABP n° 648 depositado en la colección del Instituto Humboldt.

Etimología.- Especie nombrada en honor al apreciado amigo y profesor Eduardo Flórez, aracnólogo del Instituto de

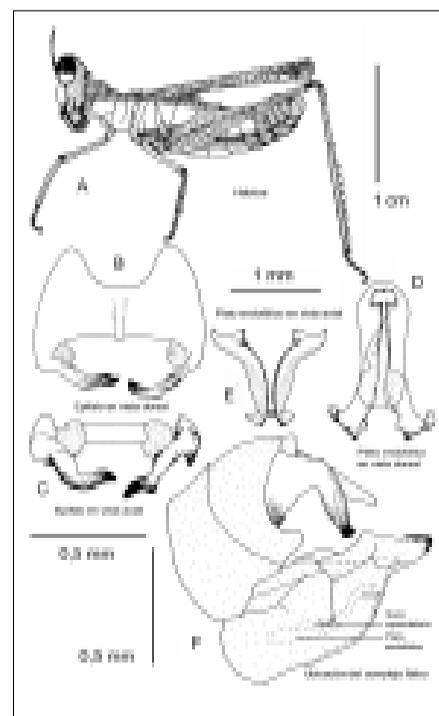


Figura 1. *Homeomastax eduardoi* "v" n. sp. ♂, habitus.

Tabla 1. Grupos de especies del género *Homeomastax* (Rowell y Bentos-Pereira 2001).

Grupo	Características
Surda	Phallus pequeño, placa endofálica corta, epifalo separado del pliegue dorsal.
Bouvieri	Epifalo conectado con el pliegue dorsal, ápice de la placa subgenital a menudo trilobulado.
Kressi	Placa endofálica larga, epifalo y escleritos bien desarrollados.
Silvicola	Esclerito ectofálico con una línea de denticulos en la cresta dorsoapical, pliegue dorsal simple o bilobulado con escleritos pareados.

1 Estudiante Biología, Universidad Nacional de Colombia. E-mail: mfporrasbe@unal.edu.co. A. A. 8545, Bogotá.

2 Universidad de Guadalajara. Centro universitario Los Lagos. Lagos de Moreno. Jalisco. México.

Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.

Diagnos

Macho. Macróptero. Patas con bandas lisas, 28 espinas; pronoto rectangular en vista dorsal, banda color blanco extendida desde la parte anterior del pronoto hasta el sexto segmento abdominal en vista lateral. Complejo fálico: epifalo membranoso.

Descripción

Tamaño 4.8 cm. antenas con doce segmentos, presentan una espina en la parte media ventral del quinto segmento antenal; escapo y pedicelo largos, cilíndricos, y de coloración café. Ojos globosos, circulares; cabeza dos veces más larga que ancha; fastigio no muy pronunciado, ligeramente dividido por una sutura que se proyecta hasta el occipucio, en vista frontal, hasta el ocelo medio, ancho ligeramente mayor que el diámetro del escapo. Triángulo fronto-clipeal subobsoleto no distinguible, coloración blanca desde la parte inferior del ojo hasta la sutura epistomal. Margen anterior del pronoto más o menos recto, margen posterior convexo en vista dorsal. Carena media desarrollada en la metazona, carenas laterales intersectadas por un sulcus en la metazona; disco pronotal convexo, con tegumento rugoso. Borde superior de los lóbulos laterales proyectado en forma rectilínea hasta el borde inferior en donde forma una curva. Borde inferior del lóbulo lateral posterior formando un ángulo recto. Sulcus principal bifurcado extendido hacia la parte media del lóbulo lateral; parte media hacia la inferior del lóbulo lateral color blanco. Episterno subcuadrado. Membrana pronoto-pleural con espina lateral ubicada en el vértice del borde inferior del pronoto. Macróptero, élitros proyectados cubriendo totalmente el abdomen, monocromos, color café. Dimensiones y morfometría (Tabla 2).

Placa subgenital con margen liso, convexa en vista lateral, el esclerito ectofálico agudo en la parte posterior en vista dorsal, presenta una larga carena media en vista axial, lóbulos laterales muy esclerotizados con una carena corta oblicua ubicada hacia la parte superior en vista lateral (Fig. 1a). Epifalo subcircular en vista dorsal, membranoso, placa sensorial pequeña, base de los lophi corta, con extremos truncados en vista dorsal, dirigidos hacia la zona media, agudos en

Tabla 2. Dimensiones y morfometría de *H. eduardoi* n. sp.

Macho	Largo del fastigio al final del abdomen	Largo de la prozona	Largo de la metazona	Largo del pronoto	Largo del fémur trasero	Largo de la tegmina	Largo de la antena	Distancia interocular
Holotipo	21.40	1.60	0.80	2.40	16.55	16.25	4.40	0.60
Paratipo	21.38	1.60	0.82	2.40	16.50	16.20	4.40	0.60
H/P	0.02	0.0	0.02	0.0	0.05	0.05	0.0	0.0

vista axial (Fig. 1b), presentan dos curvas, a partir de la segunda se hacen más oscuros, extremo derecho con curvas menos pronunciadas, luego su longitud es mayor (Fig. 1c). Saco subepifálico presente, pliegue dorsal rectangular, corto, provisto con gran cantidad de finos dentículos. Esclerito largo, proyectado hasta el saco eyaculatorio. Plato endofálico subrectangular, redondo hacia la parte anterior con márgenes simples, margen interno con dos inserciones que se unen formando una proyección aguda, longitud de la apertura entre los brazos, corta; extremos de los brazos truncados (Fig. 1d), en vista lateral y axial declinado hacia la región anterior (Fig. 1e). Saco eyaculatorio largo y plegado longitudinalmente. Saco espermatóforico sencillo, presenta curvas desde la región anterior hasta la posterior centralmente.

Discusión

Los datos de esta especie extienden la distribución geográfica del género *Homeomastax* hasta zonas de la Orinoquía colombiana. Adicionalmente, la coloración de la especie es completamente diferente de toda la homogénea presentación que hasta la fecha muestran las especies de los grupos pertenecientes al género. Si bien se describe como una especie del género *Homeomastax*, las características del complejo fálico son los aspectos que hace de la especie un eslabón entre los géneros: *Erythromastax*, con el cual comparte la forma general de la placa endofálica, y *Homeomastax* con el que comparte el pliegue subepifálico con dentículos. De esta manera *H. eduardoi* es una especie problema al presentar caracteres tales como epifalo membranoso. En el futuro es posible establecer una nueva clasificación para el grupo aunque para ello es necesario continuar estudiando las regiones mencionadas en busca de ejemplares con características similares a *H. eduardoi*

Agradecimientos

Por sus observaciones, F. Becerra, L. Becerras, E. Florez, J. Pinzón, F. Fernández, C. Sarmiento, Instituto de Ciencias Naturales, a Enrique Castillo y el Instituto Humboldt por el préstamo de material. Esta contribución obtuvo financiación parcial del Proyecto Diversidad de Insectos de Colombia (NSF Grant DEB No. 0205982 a nombre de Michael Sharkey, Universidad de Kentucky).

Literatura citada

- DESCAMPS M. 1971. Les Eumastacidae de Colombie Revison des Paramastacinae y Eumastacinae (Acridomorpha, Eumastacoidea). *Caldasia* 11 (51): 99-192.
- DESCAMPS, M. 1973a. Revision des Eumastacoidea (Orthoptera) aux chelons des familles et des sous familles (genitalia, repartition, phylogenie). *Acrida* 2:161-298
- DESCAMPS, M. 1973b. Diagnoses et signalisations d'Eumastacoidea (Orth.). IV. Amerique. *Annales de la Societad Entomologique de France* 9(4):943-974.
- DESCAMPS, M. 1979. Eumastacoidea neotropicaux: diagnosis, signalisations, notes biologiques. *Annales de la Societad Entomologique de France* 9: 943-974.
- HEBARD, M. 1923. Studies in the Dermaptera and Orthoptera of Colombia. Third Paper. Orthopterous family Acrididae. *Transactions of the Entomological Society* 49:165-313.
- MARQUIS, R.J. 1991. Herbivore fauna of *Piper* (Piperaceae) in a Costa Rican wet forest: diversity, specificity and impact. In: plant-animal interaction: evolutionary ecology in tropical and temperate regions, ed. P.W. Price, T.M. Lewinsohn, G. Wilson Fernández, W.W. Benson, John Wiley. Pp. 179-208.
- ROWEL, C.; BENTOS-PEREIRA, A. 2001. Review of genus *Homeomastax* (Eumastacinae, Eumastacidae, Eumastacoidea, Orthoptera) with a new species. *Journal of Orthoptera Research*: 47-92.

Aspectos ecológicos de *Aglaoctenus lagotis* (Araneae: Lycosidae) con énfasis en la preferencia de hábitat. Corrientes, Argentina

Ecological aspects of *Aglaoctenus lagotis* (Araneae: Lycosidae) with emphasis in preference of habitat. Corrientes, Argentina

GONZALO D. RUBIO¹, ESTEBAN I. MEZA T.², GILBERTO ÁVALOS³

Resumen. Se analizaron algunos aspectos ecológicos de *Aglaoctenus lagotis* Holmberg, principalmente su presencia en las especies vegetales *Aechmea distichantha* Lem. y *Bromelia serra* Lem. (Bromeliaceae). El estudio se adelantó en la localidad de Laguna Brava, Provincia de Corrientes, Argentina. Se utilizó el método de muestreo por bandeado y registro (taxiado) a lo largo de dos transectos de 300 m cada uno. Se encontraron 162 especímenes de *A. lagotis* sobre un total de 650 bromelias examinadas. La prueba de comparación de dos proporciones e índice de electividad comprobó una notable preferencia de las arañas por los rosetones de *A. distichantha*, ubicados en el bosque y expuestos a baja intensidad lumínica. Se determinó que el 38,2% de la población de *A. distichantha* está habitada por *A. lagotis*, y el 4,3% de la población de *B. serra* se halló con el mismo tipo de relación. Es menester realizar estudios comparativos en diferentes localidades, a efectos de verificar la presencia de esta araña en otros géneros de bromeliáceas como *Vriesea*, *Billbergia* y *Pseudananas*.

Palabras clave: Arañas lobo. Bromeliaceae. Asociación. Ecología.

Summary Some ecological aspects of *Aglaoctenus lagotis* Holmberg such as its presence in the plant species *Aechmea distichantha* Lem. and *Bromelia serra* Lem. (Bromeliaceae) were studied. The study was carried out in the Laguna Brava locality, Corrientes province, Argentina. The banded and record method was utilized through two transects 300m long each. 162 individuals were recorded from 650 bromeliads observed. Both, the two proportions test and the choice test indicated a strong preference of the spiders for the individuals of *A. distichantha* located in the forest and under low sunlight exposition. 38,2% of the individuals of *A. distichantha* and 4,3% of individuals of *B. serra* were inhabited by *A. lagotis* respectively. It is necessary to conduct comparative studies in different localities in order to check the presence of this spider in other Bromeliad species such as *Vriesea*, *Billbergia* y *Pseudananas*.

Key words: Wolf spiders. Bromeliaceae. Association. Ecology.

Introducción

El orden Araneae está ampliamente distribuido en todos los ecosistemas terrestres, comprendiendo un grupo faunístico muy diverso (Turnbull 1973). Las arañas constructoras de telas requieren una serie de características para su establecimiento; la arquitectura vegetal es uno de los factores que influyen para la colonización, está directamente relacionada con la diversificación del hábitat y con el número de nichos potenciales (Gunnarsson 1990).

Aglaoctenus lagotis (= *Porrina lagotis*) es un licósido sudamericano que posee afinidad por los ambientes húmedos y a diferencia de la mayoría de los licósidos, elabora telas en forma de embudo que emergen del centro de bromeliáceas, las que constituyen un nicho apropiado para esta especie (Santos y Brescovit 2001). Se trata de una de las arañas dominantes del bosque y un elemento muy caracte-

rístico del ambiente chaqueño (Bucher 1974).

Las plantas de la familia Bromeliaceae, endémicas del Neotrópico, se caracterizan por poseer hojas simples dispuestas en forma de roseta, eventualmente con las vainas modificadas en un sifón (e.g. *Aechmea distichantha*) que permite la acumulación de agua y detritos orgánicos en las axilas foliares (Leme 1984). Así, esta acumulación de agua puede considerarse un "ambiente limnológico aislado", un microhábitat para incontables especies de animales (Picado 1913). En el sur de Brasil, Mestre *et al.* (2001) citan numerosas familias de Araneae asociadas a *Vriesea inflata* (Bromeliaceae).

Considerando estos antecedentes y teniendo en cuenta que en Corrientes se han investigado aspectos de la fauna asociada a Bromeliaceae, e.g. de culícidos (Torales *et al.* 1972); y de diversos taxa en su fitotelmata (Iriart *et al.* 2002), el

objetivo de este trabajo es conocer algunos aspectos ecológicos de *A. lagotis* y principalmente su presencia en las especies *Aechmea distichantha* y *Bromelia serra*, representantes de la familia que en esta localidad poseen la disposición y estructura foliar adecuada para el establecimiento de esta araña.

Materiales y Métodos

Área de estudio. Laguna Brava (27° 31' S, 58° 41' W) está ubicada en el Departamento Capital de la Provincia de Corrientes; en el Distrito Oriental Húmedo de la Provincia Fitogeográfica Chaqueña (Cabrera y Willink 1973) (Fig. 1). El clima es húmedo con precipitaciones de 1.250 mm anuales, la temperatura media anual es de 21,6°C. El paisaje se caracteriza por la presencia de un bosque degradado de quebracho colorado (*Schinopsis balansae* Engl.) y urunday (*Astronium balansae* Engl.) los cuales alcanzan los 20 m de altura con un estrato arbustivo muy

¹ Autor para correspondencia Becario de Pregrado, S.G.CyT. (UNNE), Cátedra de Artrópodos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste. Av. Libertad 5470. FaCENA-UNNE. C. P. (3400) – Corrientes, Argentina. Tef: 54 03783 457950 (Int:419). E-mail: aracno42@yahoo.com.ar

² Becario de Pregrado, S.G.CyT. (UNNE), Cátedra de Morfología Vegetal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste.

³ Lic. en Zoología, Cátedra de Artrópodos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste.



Figura 1. Área de estudio, provincia de Corrientes. Argentina. 2002.

denso sobre el que crecen numerosos epífitos. La entrada de luz es escasa, el microclima es muy húmedo y se observan charcos temporales. El estrato herbáceo está representado en su mayoría por *A. distichantha* y *B. serra*. Se observan también parches de pastizal en donde la incidencia de luz es directa.

Actividades de campo. El área estudiada comprende 90.000 m² en la cual se trazaron dos transectos de 300 m separados por 100 m de distancia. En cada transecto se empleó el método de bandeo y registro (taxiado), descrito por Jarvinen y Vaisanen (1975). Se fijó el ancho de banda de muestreo en 3 m a cada lado del observador. Se revisaron todas las bromeliáceas a lo largo de los transectos donde se llevaron a cabo las observaciones; en muestreos preliminares se comprobó la presencia de *A. lagotis* únicamente sobre bromeliáceas. Los muestreos abarcaron pastizales y bosques y se efectuaron durante los meses de septiembre y octubre de 2002.

Dos personas realizaron la toma de datos, donde se consignó: especie vegetal, presencia o ausencia de araña y/o tela, escapo floral, intensidad lumínica (I. L.) y tipo de ambiente (bosque/pastizal). La incidencia lumínica se estimó en tres intensidades de acuerdo con: sombra otorgada por el bosque (I. L.1); lugares donde las irradiaciones fluctúan con el transcurrir del día (e.g. margen del bosque) (I. L.2); pastizal, donde la incidencia de luz es directa y constante (I. L.3).

De las arañas halladas, dos ejemplares se conservaron en frascos de vidrio con alcohol al 70% en la colección [CARTRO-UNNE 0211-0212] de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE). De las muestras del material vegetal, dos ejemplares pertenecientes a

A. distichantha se depositaron como testigos en el herbario (CTES.) del Instituto Botánico del Nordeste (IBONE). *B. serra* no fue coleccionada por no encontrarse con estructuras reproductoras.

Actividades de laboratorio. Para la determinación sistemática de las arañas se utilizó la revisión del género *Aglaoctenus* de Sudamérica de Santos y Brescovit (2001).

En el análisis estadístico se utilizó la prueba de comparación de dos proporciones (Martín y Luna del Castillo 1990). Para establecer el grado de preferencia de *A. lagotis* sobre las especies de bromeliáceas se empleó el índice de electividad (Ei) de Ivlev (1961), cuyos valores oscilan entre -1 y 0 indicando disponibilidad y entre 0 y +1 como indicativos de preferencia (Kehr y Duré 2002):

$$E_i = (r_i - n_i) / (r_i + n_i)$$

Donde, E_i es el índice de electividad para la planta "i" (*A. distichantha* o *B. serra*); r_i el porcentaje de "i" habitadas, en el total de rosetones habitados y n_i el porcentaje de "i" en el ambiente (pastizal más bosque).

Resultados

Se hallaron 162 arañas distribuidas en 650 rosetones examinados, de los cuales 395 correspondieron a *A. distichantha* y 255 a *B. serra*. La presencia de la tela en la planta coincidió, en la mayoría de los casos, con el hallazgo de una araña sobre ella (Tabla 1). *A. lagotis* permanece al acecho de la presa en la parte horizontal de tejido denso ubicada al inicio del embudo característico de estas telas (Fig. 2).

El 93,2% de las arañas encontradas estuvieron asociadas *A. distichantha* y el 6,8% restante a *B. serra*. Los escapos florales de *A. distichantha* no impidieron la localización de *A. lagotis*, dado que ésta

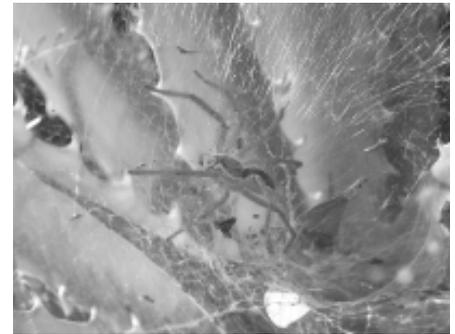


Figura 2. Ejemplar de *A. lagotis* posando en su tela sobre *A. distichantha*. Laguna Brava, Corrientes. 2002.

se estableció en las axilas de las hojas basales o de mediana altura del rosetón; en los momentos en que fue intimidada, se refugió (sumergiéndose) bajo el agua acumulada en el sifón de la planta. De la observación surge que *A. lagotis* se halló en el 24,9% del total de plantas examinadas y en el 38,2% de la población de *A. distichantha*. A diferencia, solo se detectó a esta araña en el 4,3% de *B. serra* (Fig. 3). La población de *A. lagotis* varió según la intensidad lumínica, así en *A. distichantha* el 95,4% de las arañas se encontró en el sotobosque (I. L.1), el 4,0% bajo I. L.2 y el 0,7% en I. L.3. En *B. serra* el 72,7% de las arañas se observó bajo I. L.1 y el 27,3% en I. L.2, no hubo registros en el pastizal (I. L.3). (Fig. 4).

Se observó predilección de *A. lagotis* por las bromeliáceas ubicadas en el sotobosque, lo cual tiene relación directa con la intensidad lumínica recibida. De las arañas refugiadas en *A. distichantha*, el 94,7% prefirió el bosque y el 5,3% el pastizal; en *B. serra* el 90,9% seleccionó el bosque y el 9,1% el pastizal (Fig. 5). Estadísticamente *A. lagotis* se halló en mayor proporción sobre *A. distichantha* que sobre *B. serra* ($P \gg 0,01$). Al aplicar el índice de electividad se comprobó que *A. lagotis* tiene preferencia por *A. distichantha* (0,2),

Tabla 1. Presencia de *A. lagotis* discriminada según especie de rosetón, hábitat e intensidad lumínica.

	Presencia en <i>A. distichantha</i>	Total de plantas	Presencia en <i>B. serra</i>	Total de plantas
<i>A. lagotis</i>	151	395	11	255
Intensidad lumínica 1	144	368	8	232
Intensidad lumínica 2	6	17	3	22
Intensidad lumínica 3	1	10	0	1
Con escapo	4	38	0	0
Sin escapo	147	357	11	255
Con tela	149	151	11	11
Sin tela	2	244	0	244
En bosque	143	367	10	235
En pastizal	8	28	1	20

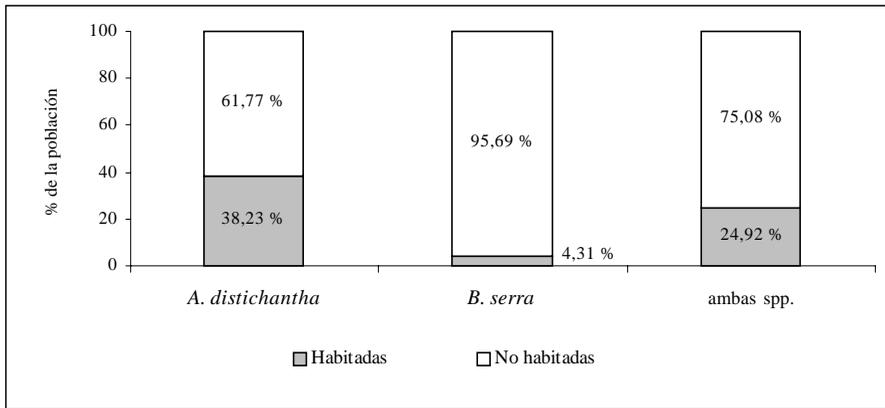


Figura 3. Población de bromeliáceas habitadas por *A. lagotis* en Laguna Brava, Corrientes. 2002.

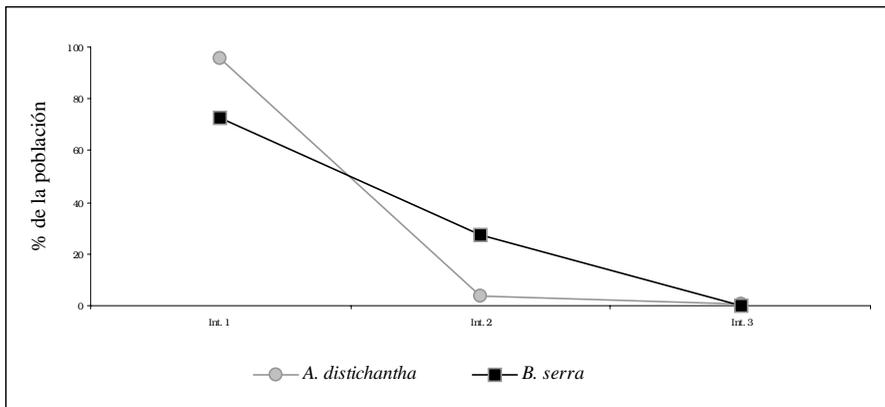


Figura 4. Variación de la población de *A. lagotis* en relación con la intensidad lumínica. Laguna Brava, Corrientes. 2002.

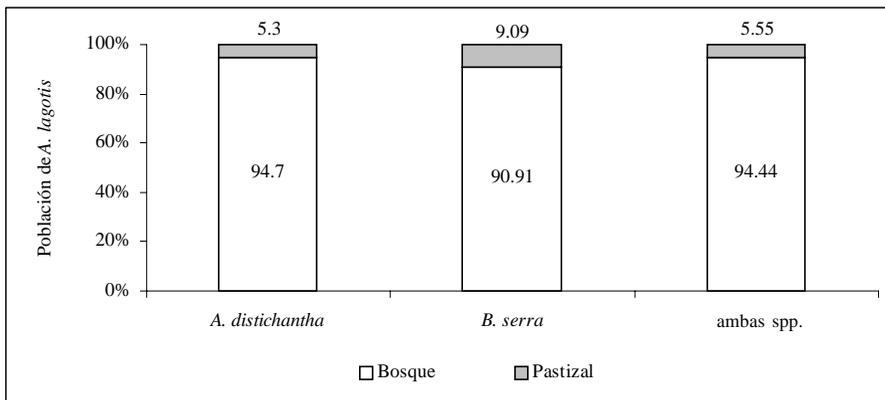


Figura 5. Localización de las bromeliáceas habitadas por *A. lagotis* en los ambientes estudiados. Laguna Brava, Corrientes. 2002.

mientras que en *B. serra* la relación de disponibilidad es $-0,7$.

Discusión y Conclusiones

En la presente investigación *A. lagotis* mostró una marcada predilección por los rosetones de *A. distichantha* y por ambientes con baja exposición al sol. Bucher (1974) menciona que *A. lagotis* construye su tela preferentemente sobre el suelo, en cuevas de roedores, pie de

árboles y también a mayor nivel en alambrados, bifurcaciones de ramas, troncos huecos, etc.; en el presente trabajo dicha araña se halló únicamente sobre bromeliáceas. La arquitectura vegetal de *A. distichantha* resultó un factor favorable para la colonización de la araña, lo cual confirma lo expresado por Gunnarsson (1990).

Otra causante de la relación araña/planta podría deberse a que *A. distichantha*, res-

pecto de *B. serra*, ofrece mayor protección por la disposición compacta de sus hojas. Esto permite además la acumulación de agua posibilitando el sumergimiento de la araña cuando es intimidada.

Debido a que diversas bromeliáceas poseen las vainas foliares semejantes a la de *Aechmea* sp., y considerando que Mestre *et al.* (2001) encontraron varias familias de Aranea en *V. inflata*, eventualmente *A. lagotis* podría hallarse también en esta especie de bromeliácea.

Se considera necesario incluir en el marco de muestreo de futuros estudios, a plantas epífitas, ya que en experimentos preliminares se halló a *A. lagotis* en un ejemplar de *A. distichantha* ubicado a 2 m de altura, y considerando que en la provincia de Tucumán se observó a 3 m en condiciones excepcionales (Bucher 1974). Sería interesante también, realizar estudios en otras localidades donde se registre la presencia de estos u otros representantes de Bromeliaceae, a efectos de verificar la presencia de *A. lagotis* en géneros como *Vriesea*, *Billbergia*, *Pseudananas* y otras especies de *Aechmea* y *Bromelia*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Eduardo Porcel por el asesoramiento estadístico, a José L. Fontana por la caracterización de los ambientes estudiados y muy especialmente a Eduardo Flórez por las críticas del manuscrito.

Literatura citada

- BUCHER, E. H. 1974. Observaciones ecológicas sobre los artrópodos del bosque chaqueño de Tucumán. Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Biología 1: 35-122.
- CABRERA, A. L.; WILLINK, A. 1973. Biogeografía de América Latina. Serie de Biología, Monografía N° 13. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Secretaría General de la OEA, Washington DC. 120 p.
- GUNNARSSON, B. 1990. Vegetation structure and the abundance and size distribution of spruce-living spiders. Journal of Animal Ecology 59: 743-752.
- IRIART, D. E.; CATALÁN, P.; TODARO, J. S.; PANSERI, A. F.; FRANCESCHINI, M. C. 2002. Aspectos ecológicos de la fauna asociada a *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) con especial énfasis en su fitotelmata. Resúmenes. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. p. 4. Chaco, Argentina.

- IVLEV, V. S. 1961. Experimental ecology of the feeding of fishes. Yale Univ. New Haven, Conn. U.S.A.
- JARVINEN, O.; VAISANEN, R. A. 1975. Estimating relative densities of breeding birds by the transect method. *Oikos* 26: 316-322.
- KEHR, A. I.; DURÉ, M. I. 2002. Glosario de términos ecológicos. *Moglia S. R. L. Corrientes, Argentina*. 160 p.
- LEME, E. M. C. 1984. Bromelias. *Ciencia Hoje. Brasil*. 3: 66-72.
- MARTÍN, A.; LUNA DEL CASTILLO, J. DE D. 1990. *Bioestadística para ciencias de la salud*. 3ª ed. Ediciones Norma. Madrid. 622 p.
- MESTRE, L. A. M.; ARANHA, J. M. R.; ESPER, M. L. P. 2001. Macroinvertebrate Fauna Associated to the Bromeliad *Vriesia inflata* of the Atlantic Forest (Paraná State, Southern Brazil). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44 (1): 69-94.
- PICADO, C. 1913. Les Broméliacées épiphytes considérées comme milieu biologique. *Bulletin Scientifique. France et Belgique*. 5: 215-360.
- SANTOS, A. J.; BRESCOVÍ, A. D. 2001. A revision of the South American spider genus *Aglaoctenus* Tullgren, 1905 (Araneae, Lycosidae, Sosippinae). *Andrias* 15: 75-90.
- TORALES, G. J.; HACK, W. H.; TURN, B. 1972. Criadero de culcicidos en bromeliaceas del NW de Corrientes. *Acta Zoológica Lilloana* 34: 293-308.
- TURNBULL, A. L. 1973. Ecology of the true spiders (Araneomorpha). *Annual Review of Entomology* 18: 305-348.

Recibido: 01-jun-04 • Aceptado: 05-may-05

Nota científica

Primer registro de la familia Heloridae (Hymenoptera: Proctotrupeoidea) para Colombia

First record of the family Heloridae (Hymenoptera: Proctotrupeoidea) for Colombia

JEFFREY SOSA-CALVO¹, DIEGO F. CAMPOS²

Resumen. Se registra por primera vez la familia Heloridae (Hymenoptera: Proctotrupeoidea) para Colombia, con base en un ejemplar de *Helorus brethesi*, coleccionado en un paisaje fragmentado en los Andes colombianos.

Palabras clave: Avispas. *Helorus brethesi*. Parasitoides.

Summary. The family Heloridae (Hymenoptera: Proctotrupeoidea) is recorded here for the first time from Colombia, based on a single specimen of *Helorus brethesi*, collected from a fragmented landscape in the Colombian Andes.

Key words: Wasps. *Helorus brethesi*. Parasitoids.

Introducción

Pertenciente a la superfamilia Proctotrupeoidea (Hymenoptera), Heloridae es una pequeña familia que contiene un sólo género (*Helorus*) y no más de ocho especies descritas (Townes 1977; Naumann 1983). La familia se encuentra distribuida por todo el mundo, aunque sus especies son raramente coleccionadas. Individuos de esta familia son solitarios, endoparásitos de larvas de Chrysopidae (Neuroptera), y usan el capullo creado por el hospedero para completar su ciclo (Clancy 1946). Aquí se presenta el primer registro de la familia Heloridae para

Colombia y para el norte de Sur América, conocida anteriormente de Argentina, Brazil y México (Townes 1977) y Costa Rica (Hanson y Gauld 1995)

Métodos

Se coleccionaron muestras de 17 localidades en el departamento del Quindío entre los 1100 y los 1800 m de altitud y entre los meses de octubre 1999 y febrero 2000 como parte del proyecto "Artrópodos de la franja cafetera del departamento del Quindío" del Instituto Alexander von Humboldt (IAvH). Las colecciones se realizaron en cuatro tipos de cobertu-

ra vegetal, siendo estas: café con sombra, café sin sombra, bosque, y guadua. Se siguió la metodología propuesta por el Grupo de Exploraciones y Monitoreos Ambientales (GEMA) del IAvH. Entre las técnicas de muestreo usadas se incluyen Winkler, Malaise, trampas de caída (*Pitfall*) y colecta manual. Las fotografías del espécimen se tomaron usando un microscopio estereoscopio Leica M420 y una cámara digital JVC KY-F70B conectada a un computador IBM Intellistation M Pro en el cual series de imágenes se acoplaron usando el programa Auto-Montage versión 3.04 (Synoptics Ltd.)

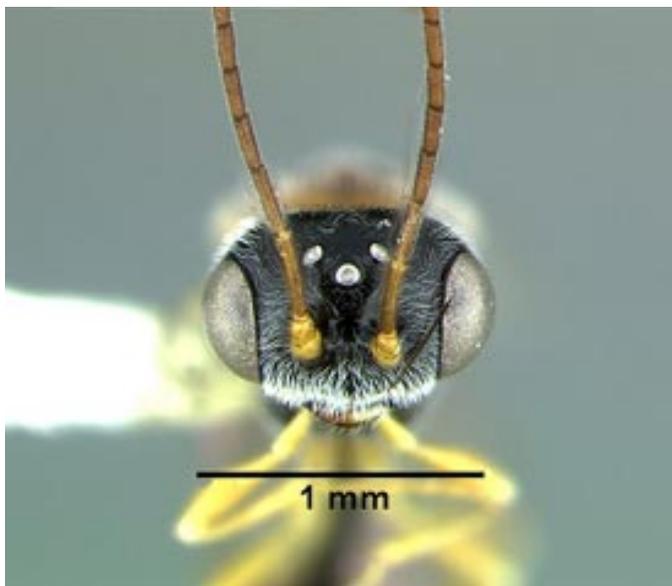


Figura 1. Vista frontal de *Helorus brethesi* Oglobin, 1928.



Figura 2. Vista lateral de *Helorus brethesi* Oglobin. Se puede apreciar el área más clara en la parte anterior del tórax y el I segmento metasomal alargado.

1 Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología y Educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. Dirección actual: Department of Entomology, University of Maryland, 4112 Plant Sciences Building, College Park, MD 20742, USA, y Department of Entomology, MRC 188, P.O. Box 37012, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC 20013-7012, USA. (Email: sossa.jeffrey@nmnh.si.edu)

2 Posgrado en Sistemática, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, E-mail: dfcamposm@unal.edu.co

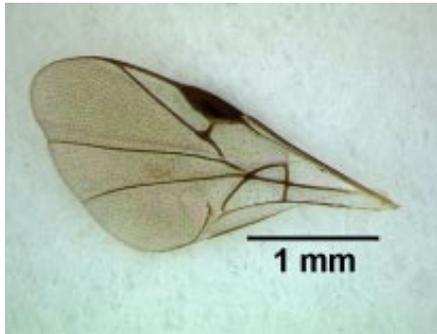


Figura 3. Ala anterior y posterior típica de un miembro de la familia Heloridae, en la cual se puede ver claramente la primera celda media triangular.

Resultados

Helorus brethesi Oglobin, 1928 (Figs. 1 y 2)

Material examinado: Hembra. COLOMBIA. Quindío Génova, Vda. El Cedral Finca Buenos Aires 4° 14' 06" N, 75° 46' 32" W 1600 m. Cafetal con sombrío, jama 27 Oct 1999, E. González & J. Sosa-Calvo, Leg. (Número de catálogo: IAvH 35233).

Discusión

Este es el primer registro de la familia Heloridae, del género *Helorus* Latreille 1802 y de la especie *H. brethesi* para Colombia. Con este hallazgo y la información obtenida de la literatura, parece que individuos de esta especie se encuentran en un rango altitudinal entre los 900 y 2500 m (Townes 1977; Hanson y Gauld 1995). Su hallazgo es igualmente valio-

so si se considera que el ejemplar fue colectado en un paisaje fragmentado por cultivos de café.

Helorus brethesi Oglobin, 1928 fue registrada por Townes (1977) para el Neotrópico. En su publicación Townes (1977) sugiere que la especie se encuentra distribuida desde el sur de México hasta el norte de Argentina y también en Brazil. Hanson y Gauld (1995) registraron la especie en Costa Rica a ~ 1200 m en un bosque húmedo tropical cerca de la frontera con Panamá. En la misma publicación registran la presencia de una posible nueva especie colectada a más de 2500 m.

Miembros de esta familia son usualmente robustos, negros metálicos, con una longitud no mayor a 8 mm. Las antenas son filiformes (15 segmentos) con sus escapos antenales cortos. El mesoscuto tiene una sutura bien desarrollada entre las tégulas (sutura transcutal). La venación en las alas es distintiva de la familia. Las alas anteriores con cinco celdas cerradas, de las cuales, la primer celda medial es triangular (Fig. 3). Las garras tarsales son pectinadas, el primer segmento metasomal es distintivamente alargado, formando algo parecido a un peciolo, los térgitos metasomales II al IV están fusionados como un sintergo. La especie *Helorus brethesi* se puede reconocer, además, por la coloración rojiza o cobriza en la parte anterior del tórax.

Agradecimientos

Agradecemos sinceramente a E. L. González por su ayuda en el campo y a F. Fernández por su ayuda durante este proyecto. A F. Fernández, P. Hanson y C. Sarmiento por correcciones y comentarios. JSC agradece igualmente a L. G. Baptiste y a C. A. Reina. Este trabajo fue posible gracias al apoyo de COLCIENCIAS, el Instituto "Alexander von Humboldt", y las becas NSF-DEB 0205982 a Dr. M. Sharkey y NSF- IRCEB 0110073 a Dr. T. Schultz.

Literatura citada

- CLANCY, D.W. 1946. The insect parasites of Chrysopidae (Neuroptera). Univ. Calif. Publs. Ent. 7:403-496.
- HANSON, P. E.; I. D. GAULD. 1995. The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford Science Publications and the Natural History Museum. London UK.
- NAUMANN, I. D. 1983. A new species of *Helorus* Latreille (Hymenoptera: Proctotrupeoidea: Heloridae) from New Guinea. Journal of the Australian Entomological Society. 22: 253-255.
- LATREILLE, P. A. 1802. Histoire naturelle, generale et particuliere des crustaces et des insectes. Vol. 3. F. Dufart, Paris. 467 pp.
- TOWNES, H. A. 1977. A revision of the Heloridae (Hymenoptera). Contributions of the American Entomological Institute 15: 12pp.

Recibido: 20-may-05 • Aceptado: 04-jun-05

Nota científica

Técnica para marcaje de abejas

A Bee marking technique

ELVERT DANNY VÉLEZ V. ¹

Resumen: Se describe una técnica sencilla para marcaje de abejas

Palabras clave: Apidae. Comportamiento. Forrageo

Summary: A simple technique for marking of bees is described

Key words: Apidae. Behavior. Foraging

Uno de los problemas metodológicos que un entomólogo debe afrontar a la hora de realizar estudios etológicos o ecológicos con insectos y en especial con insectos sociales es cómo diferenciar a simple vista un individuo de otro, o incluso un sexo de otro. En el mercado se consiguen placas de marcaje para abejas que son utilizadas especialmente en apicultura. Sin embargo, son fabricadas en países Europeos y los Estados Unidos lo que dificulta su consecución para investigaciones a nivel nacional o regional. Con la presente nota se pretende ayudar a resolver el problema del marcaje de abejas, dando una propuesta sencilla para la fabricación de placas de marcaje con materiales fáciles de conseguir y de bajo costo.

Los materiales requeridos son: 1. Sacabocados de zapatería. El diámetro depende del tamaño de la abeja que se quiere marcar (para abejas del tamaño de *Bombus Latreille*, 1802 es adecuado un diámetro de 3 mm); 2. Trozo de hojalata electro-lítica (calibre 0.21-0.16 mm): puede servir la tapa metálica de una caja de galletas o también la tapa plástica de un recipiente; 3. Papel de colores (evitar colores oscuros y papeles muy frágiles); 4. Martillo; 5. Papel adhesivo transparente; 6. Impresora láser; 7. Bloque de caucho o material flexible pero muy denso.

Coloque el trozo de metal o plástico sobre el bloque de caucho, sostenga el sacabocados firmemente sobre el trozo de metal o plástico y golpee el sacabocados con el martillo. Con esto hará la primera placa, las demás se realizan de la misma forma. Es importante que el bloque de caucho sea suficientemente denso para que amortigue el golpe sin doblar la lámina, pero no debe ser demasiado duro o el sacabocados perderá filo rápidamente. Tome una hoja de papel de colores de

tamaño carta e imprima de manera consecutiva los números que corresponden a cada placa. El tamaño de letra depende del diámetro de la placa (*Times New Roman* tamaño 7 en negrilla para placas de entre 2.5 y 3 mm de diámetro). La impresora láser hará que los números sean mucho más claros; sin embargo, si no cuenta con una impresora láser puede utilizar una impresora normal (en alta calidad de impresión) o un rapidógrafo de tinta indeleble.

Forre el papel de colores con los números impresos usando papel adhesivo transparente. Con el mismo sacabocados recorte los círculos de papel. Esto se puede hacer a mano, no necesita el martillo.

Pegue el círculo de papel a la placa y deje secar. El pegado del número a la placa y de ésta a la abeja se realiza con un adhesivo de polivinilo solvente al agua como el que se vende para actividades escolares (Fig. 1).

En el momento de pegar la placa a la abeja inmovilícela bien, ojalá con una cámara especial de marcaje y deje que el pegante seque completamente (cerca de 10 min) antes de soltar la abeja. Dependiendo del material, la placa puede resultar plana o curva. En el caso de ser curva conviene pegar la placa al insecto por la superficie cóncava que se acopla mejor a la forma un poco convexa del abdomen o el mesoscuto de la abeja. Use el mínimo pegante posi-



Figura 1. Macho de *Bombus atratus* Franklin, 1913 portando placa de marcaje. A la izquierda de él una placa lista para ser usada (Fotografía David Sánchez).

ble pues el exceso de pegante puede dañar alas y otras estructuras. Tenga en cuenta que los pegantes de olores fuertes alteran el comportamiento social de las abejas haciendo que aquellas abejas con placas pegadas sean atacadas por las abejas de su propio nido. Gran parte del olor del polivinilo se pierde con el secado.

Según Gary (1970) la mejor parte para pegar la placa en la abeja es el abdomen (sobre los primeros tergos) puesto que es allí donde se sitúa el buche melárico que es donde se transporta el néctar y por ende el mayor sobrepeso. Sin embargo, también se puede pegar en el mesoescuto entre las alas.

La técnica aquí propuesta se probó con abejas mieleras (*Apis mellifera* L., 1758) a

las cuales se les realizó seguimiento durante tres meses en colonia de observación. Durante este tiempo las placas no sufrieron mayor deterioro y eran legibles. El diámetro de las placas utilizadas en este experimento era aproximadamente de 2.5 mm y su peso promedio de 5 mg ($n = 20$) con lo que se acercan bastante a las características descritas por las placas comerciales. Roubik y Aluja (1983) realizaron estudios de rango de vuelo en abejas de los géneros *Melipona* y *Trigona* utilizando placas metálicas de 6 y 3 mg de peso. Con la técnica aquí descrita no se observó ataque por las abejas del nido hacia los individuos marcados si se dejaba secar bien el pegante.

El presente trabajo fue realizado dentro del proyecto "Cría y manejo de abejas

sin aguijón (Hymenoptera: Meliponinae) en Colombia II." y desarrollado en el laboratorio de investigaciones en abejas silvestres de la Universidad Nacional de Colombia (LABUN), año 2003.

Literatura Citada

- GARY, E. N. 1970. Magnetic retrieval of ferrous labels in capture-recapture system for honey bees and other insects. *Journal of Economic Entomology*. 64: 961-965.
- ROUBIK, D. W. & M. ALUJA. 1983. Flight Ranges of *Melipona* and *Trigona* in Tropical Forest. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 56(2): 217-222.

Recibido: 12-abr-05 • Aceptado: 15-jul-05

Reseñas de libros

<https://doi.org/10.25100/socolen.v31i2.9453>

EL NUEVO BORROR

Triplehorn, C.A. & N.F. Johnson. 2005. *Borrer and DeLong's Introduction to the Study of Insects*. Thomson Brooks/Cole, USA, 864 pp., Seventh Edition, ISBN 0-03-096835-6, US \$ 125.00

Sobre este nuevo libro de Triplehorn y Johnson, hay que comenzar diciendo que esta edición, la séptima, comprende un justo ajuste en el título. En la edición anterior sexta (1989), desaparece como autor Dwight M. DeLong (fallecido en 1984), movida que traería como consecuencia la desaparición de los dos nombres tradicionales, ante la posterior muerte de Donald Borror (en 1988). La solución "salomónica" es el título actual, *Borrer and DeLong's Introduction to the Study of Insects*, título que convierte automáticamente al libro y sus gestores en un clásico de los manuales entomológicos.

Los autores siguen una serie de cambios que ya se adoptaban en la edición de 1989, aunque los cambios entre estas últimas ediciones son menores que entre la de 1989 y anteriores. Los capítulos iniciales incluyen algunas nuevas imágenes y referencias. El tercer capítulo (Sistemática) incluye algo más de información sobre la escuela cladística, e incluso una figura (la 3.1) ilustrando los principios básicos de esta escuela de clasificación. El sexto capítulo (Hexapoda) presenta un *overview* de estos artrópodos, con una actualización en ideas sobre la filogenia del grupo, además de la filogenia de los órdenes de insectos según Wheeler *et al.* (2001). De hecho, el resto del libro se ordena más o menos de acuerdo a esta propuesta lo cual tiene varias consecuencias, como dejar a los dípteros en el último capítulo, posición que en ediciones anteriores ocupaban los Hymenoptera. Aunque la posición de los taxones en los cladogramas es relativa y puede interpretarse de más de una forma, se tendía a colocar Hymenoptera en la "extrema derecha" de los cladogramas de insectos (p.e. Kristensen 1991), lo cual parecía indicar, de una forma u otra, que este grupo era el más "avanzado" dentro de los insectos. Según los puntos de vista más recientes (p.e. Kukalova-Peck 1991), Hymenoptera parece ser un grupo basal dentro de Holometabola, mucho más antiguo que sus supuestos vecinos mecopteridos y anfiesmenópteros. En el extremo opuesto estos autores ubican por fuera de Insecta s.str. a Protura, Collembola y Diplura, colocándolos como Entognatha. En realidad, la posición de los hexápodos basales es bastante inestable, con diversas opiniones de los investigadores, según usen fósiles, morfología y/o moléculas (Kristensen 1991; Whiting 2003; Regier *et al.* 2004). Algunos resultados son tan contradictorios, que parece que estaremos muy lejos de llegar a un consenso. De hecho, un riesgo de que los autores basen la secuencia de presentación de los órdenes de insectos en una propuesta (en este caso Wheeler *et al.* 2001) los obligaría a continuos arreglos editoriales a medida que vayan fluctuando los métodos, herramientas y opiniones de los investigadores, más cambiantes que las modas parisinas.

Los autores insisten en el uso del nombre Microcoryphia en vez de Archaeognatha, siendo este último al parecer más útil y de mayor uso; también emplean Thysanura en vez de Zygentoma, lo cual confunde el uso de Thysanura en los sentidos amplio (como grupo parafilético) y estricto (excluyendo a los arqueognatos). Como novedad, se inserta un breve capítulo (el 11) dedicado a la reciente *vedette*, Mantophasmatodea, aunque la existencia de este grupo como orden válido es cuestionable. Los órdenes alrededor de las cucarachas se presentan separadamente, quizás por conservar la tradición, aunque numerosas evidencias apuntan a considerarlos a todos en un solo taxón, Dytioptera. Saludablemente se mantienen en un solo taxón a los homópteros y chinches verdaderas. Las claves para inmaduros y adultos presentan en algunos puntos dilemas que hacen ver que no es fácil la separación de los grandes grupos de insectos, como el uso de los fatídicos "Not exactly fitting the preceding description", "Free living ...", o "Aquatic, often with tracheal gills".

El grueso del libro, capítulos 7 a 43, presenta la ya acostumbrada sinopsis de los órdenes vivientes de insectos, que para los autores es de 31 (incluyendo Mantophasmatodea). Tanto las caracterizaciones como las claves comprenden y abarcan la entomofauna de América "al norte de México", lo cual constituye un gran limitante para los entomólogos que viven fuera del reino neártico. A pesar de la advertencia de los autores, generalmente se tiende a hacer un uso no crítico de estas claves, a pesar del gran riesgo de hacer identificaciones erróneas a nivel de

familias. Por ejemplo, las claves para Collembola incluyen 12 familias, número muy inferior a las casi 30 que se reconocen para la Región Neotropical.

En el caso de Hymenoptera, es bueno ver la exclusión del "Suborden Symphyta", nombre que alude a una agrupación artificial y en desuso (extrañamente los autores incluyen el suborden Apocrita, inclusión que crea un desbalance ante el no uso de "Symphyta"). El arreglo en superfamilias sigue más o menos lo aceptado actualmente, aunque hay importantes cambios en los grupos basales (Schulmeister *et al.* 2003; Vilhelmsen 2003). Se incluyen importantes cambios recientes, como la fusión de Anthophoridae con Apidae (Michener 2000), pero no se hacen cambios con los esfécidos, en donde se sigue actualmente la separación en por lo menos dos familias, Sphecidae y Crabronidae (Melo 1999; Amarante 2002).

Esta nueva edición cambia de editorial, de Saunders College Publishing a la nueva, Thomson Brooks/Cole, cambio que se ve reflejado en varias formas. La portada vistosa incluye una avispa en flor, y hay algunos retoques aquí y allá en el diseño de capítulos. Además de algunas buenas adiciones en ilustraciones, y de algunas que se han usado religiosamente desde las primeras ediciones, hay algunas muy pobres y que desdican de los autores y la editorial, como la figura 9.5 (Página 187). Dentro de las fotos se incluyen varias de regular resolución que aportan poco al texto acompañante. Son bienvenidas las fotos en "profundidad", aprovechando los nuevos sistemas de fotografía de insectos, como la foto de un macho y hembra de Mutillidae (Figura 28.76, página 548). Todas las claves se presentan en franjas alternas blanco-gris, quizás para facilitar la lectura y seguimiento de cada alternativa, quizás para minimizar la práctica de xeroxcopiado.

El cambio de editorial ha traído desafortunado incremento en el precio, pues este es de US \$ 125. Si a esto sumamos el precio de correo certificado, el libro puede llegar tranquilamente a los US \$ 200, lo cual lo hace inalcanzable para muchos estudiosos de los insectos en Latinoamérica. Esta razón, unida a la cobertura geográfica del libro, obliga una vez más a pensar en la creación de un auténtico libro introductorio para la rica fauna Neotropical.

Fernando Fernández, Profesor Asociado, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, ffernandezca@unal.edu.co

Literatura Citada

- AMARANTE S.T.P. 2002. A synonymic catalog of the Neotropical Crabronidae and Sphecidae (Hymenoptera: Apoidea). *Archivos de Zoología* 37(1):1-139.
- BORROR D.J., C.A. TRIPLEHORN y N.F. JOHNSON. 1989. *An Introduction to the study of Insects*. Saunders College Publishing.
- KUKALOVA-PECK J. 1991. Fossil history and the evolution of hexapod structures, pp. 141-179 en: I.D. Naumann, ed., *The insects of Australia*. Melbourne: Melbourne University Press.
- MELO G.A.R. 1999. Phylogenetic relationships and classification of ten major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. *Scientific Papers, Natural History Museum University of Kansas* 14:1-55.
- MICHENER C.D. 2000. *Bees of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- REGIER J.C., J.W. SCHULTZ y R.E. KAMBIC. 2004. Phylogeny of basal hexapod lineages and estimates of divergence times. *Annals of the Entomological Society of America* 97(3):411-419.
- SCHULMEISTER S., W.C. WHEELER y J.M. CARPENTER. 2003. Simultaneous analysis of the basal lineages of Hymenoptera (Insecta) using sensitivity analysis. *Cladistics* 18:455-484.
- VILHELMSSEN L. 2003. Toward a consensus: Latest results from simultaneous analysis of the basal hymenopteran lineages. *Entomologische Abhandlungen* 61(2):162-163.
- WHEELER W.C., M. WHITING, Q.D. WHEELER y J.M. CARPENTER. 2001. The Phylogeny of the extant hexapod orders. *Cladistics* 17:113-169.
- WHITING, M.F. 2003. Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. *Zoologica Scripta* 31:3-15.

LA NUEVA ENTOMOLOGÍA DE GULLAN Y CRANSTON

Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2005. *The Insects: An Outline of Entomology*. Blackwell Publishing, USA, 505 pp., Third Edition, ISBN 1-4051-1113-5 US \$75.00.

El segundo libro aquí reseñado corresponde a la tercera edición de la entomología de Gullan y Cranston. Este puede

considerarse como un libro complementario al Borrór. Mientras la mayor parte de los capítulos de Triplehorn y Johnson están orientados para ofrecer claves para todas las familias (y algunas subfamilias) de todos los órdenes de insectos presentes en la Región Neártica, seguidos de sinopsis de las familias, este libro abarca en sus primeros seis capítulos temas en anatomía, fisiología, reproducción y ciclos de vida. El séptimo capítulo comprende sistemática y filogenia, el octavo biogeografía y evolución, y los capítulos nueve a doce tratan de grupos particulares como los insectos del suelo (hojarasca, cavernas, carroñeros...), insectos acuáticos, plantas e insectos y comportamiento social. Posteriormente se incluyen los temas de depredación y parasitismo (Capítulo 13), defensa (Capítulo 14), entomología médica y veterinaria (Capítulo 15), plagas (Capítulo 16) y, finalmente, métodos de colección, curación e identificación. El primer capítulo hace una breve referencia al consumo de larvas de *Rhynchophorus* (Curculionidae) en Colombia y países vecinos, aunque no se menciona el consumo de reinas de *Atta* (Formicidae), hecho que supuestamente es reconocido internacionalmente para Colombia.

Los capítulos en morfofisiología están bien escritos y con ilustraciones en blanco y negro de alta calidad, las cuales refuerzan bien los conceptos y temas tocados en las secciones dentro de cada capítulo. En cada capítulo hay cuadros con información especial en tópicos selectos. En la sección de filogenia la Figura 7.2 (página 182) resume las ideas más recientes en relaciones genealógicas dentro de Hexapoda, colocando a Collembola y Protura como un grupo no monofilético, y excluyendo a Diplura de Insecta s. str. Mantophasmatodea se ubica como grupo hermano de Grylloblattodea. Con la excepción de la incierta ubicación de Strepsiptera, los hemipteroideos y holometábolos ocupan las relaciones que desde hace un tiempo se han propuesto (Kristensen 1991).

En los capítulos siguientes los autores desean abarcar grupos de insectos no por sus relaciones filogenéticas, sino por su lugar o forma de vida (desde insectos de hojarasca hasta insectos eusociales). Los últimos capítulos son de especial interés para los entomólogos prácticos pues relacionan los temas de los insectos como problema de salud o plaga.

Este libro hace un buen balance de los temas básicos en el estudio de la ento-

mología, y contiene cambios, puntos de vista y referencias actualizadas. Su precio (US \$75) lo hace más atractivo para el bolsillo del consumidor, aunque sigue estando lejos del alcance de muchos estudiantes.

Los lectores angloparlantes y los investigadores latinoamericanos con familiaridad y acceso a libros foráneos pueden disfrutar de manuales entomológicos que cubren casi todos los tópicos esenciales para el estudio de cualquiera aspecto en la biología de estos artrópodos. Sin embargo, seguimos careciendo de manuales o textos en español, que agreguen al valor del idioma nativo precios bajos y, sobre todo, enfoques biológicos y taxonómicos con nuestra fauna Neotropical. Algunas editoriales asumieron la tarea de traducir al español o portugués algunos de los libros escritos en otros idiomas, pero las versiones en español no incluían ningún tipo de adaptación a las faunas tropicales. Esperemos que este siglo XXI sea testigo de propuestas editoriales que enfrenten esta situación.

Fernando Fernández, Profesor Asociado, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, ffernandezca@unal.edu.co

Literatura Citada

- KRISTENSEN N. P. 1991. Phylogeny of extant Hexapods, pp. 125-140 en: I.D. Naumann, ed., *The insects of Australia*. Melbourne: Melbourne University Press.

CUIDADO, MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LAS COLECCIONES BIOLÓGICAS

John E. Simmons y Yaneth Muñoz-Saba (editores). 2005. *Cuidado, Manejo y Conservación de Las Colecciones Biológicas*. Universidad Nacional de Colombia. 288pp, ISBN 958-33-6969-1, \$10.000 (pesos colombianos)

Si bien para la mayoría del público en general y para algunos profesionales de las áreas de las ciencias de lo vivo, los museos de historia natural son centros de exhibición de fauna en poses históricas con fines de recreación, desde hace ya varios siglos es reconocido que estas instituciones prestan servicios invaluable en investigación básica, aspectos aplicados y educación. Dentro de los miles de ejemplos de estas funciones se puede citar el famoso caso de melanización industrial. En este sólido ejemplo de dinámica evolutiva de las

Fernando Fernández, Profesor Asociado, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, ffernandezca@unal.edu.co

Literatura Citada

- AMARANTE S.T.P. 2002. A synonymic catalog of the Neotropical Crabronidae and Sphecidae (Hymenoptera: Apoidea). *Archivos de Zoología* 37(1):1-139.
- BORROR D.J., C.A. TRIPLEHORN y N.F. JOHNSON. 1989. *An Introduction to the study of Insects*. Saunders College Publishing.
- KUKALOVA-PECK J. 1991. Fossil history and the evolution of hexapod structures, pp. 141-179 en: I.D. Naumann, ed., *The insects of Australia*. Melbourne: Melbourne University Press.
- MELO G.A.R. 1999. Phylogenetic relationships and classification of ten major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. *Scientific Papers, Natural History Museum University of Kansas* 14:1-55.
- MICHENER C.D. 2000. *Bees of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- REGIER J.C., J.W. SCHULTZ y R.E. KAMBIC. 2004. Phylogeny of basal hexapod lineages and estimates of divergence times. *Annals of the Entomological Society of America* 97(3):411-419.
- SCHULMEISTER S., W.C. WHEELER y J.M. CARPENTER. 2003. Simultaneous analysis of the basal lineages of Hymenoptera (Insecta) using sensitivity analysis. *Cladistics* 18:455-484.
- VILHELMSSEN L. 2003. Toward a consensus: Latest results from simultaneous analysis of the basal hymenopteran lineages. *Entomologische Abhandlungen* 61(2):162-163.
- WHEELER W.C., M. WHITING, Q.D. WHEELER y J.M. CARPENTER. 2001. The Phylogeny of the extant hexapod orders. *Cladistics* 17:113-169.
- WHITING, M.F. 2003. Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. *Zoologica Scripta* 31:3-15.

<https://doi.org/10.25100/socolen.v31i2.9454>

LA NUEVA ENTOMOLOGÍA DE GULLAN Y CRANSTON

Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2005. *The Insects: An Outline of Entomology*. Blackwell Publishing, USA, 505 pp., Third Edition, ISBN 1-4051-1113-5 US \$75.00.

El segundo libro aquí reseñado corresponde a la tercera edición de la entomología de Gullan y Cranston. Este puede

considerarse como un libro complementario al Borrór. Mientras la mayor parte de los capítulos de Triplehorn y Johnson están orientados para ofrecer claves para todas las familias (y algunas subfamilias) de todos los órdenes de insectos presentes en la Región Neártica, seguidos de sinopsis de las familias, este libro abarca en sus primeros seis capítulos temas en anatomía, fisiología, reproducción y ciclos de vida. El séptimo capítulo comprende sistemática y filogenia, el octavo biogeografía y evolución, y los capítulos nueve a doce tratan de grupos particulares como los insectos del suelo (hojarasca, cavernas, carroñeros...), insectos acuáticos, plantas e insectos y comportamiento social. Posteriormente se incluyen los temas de depredación y parasitismo (Capítulo 13), defensa (Capítulo 14), entomología médica y veterinaria (Capítulo 15), plagas (Capítulo 16) y, finalmente, métodos de colección, curación e identificación. El primer capítulo hace una breve referencia al consumo de larvas de *Rhynchophorus* (Curculionidae) en Colombia y países vecinos, aunque no se menciona el consumo de reinas de *Atta* (Formicidae), hecho que supuestamente es reconocido internacionalmente para Colombia.

Los capítulos en morfofisiología están bien escritos y con ilustraciones en blanco y negro de alta calidad, las cuales refuerzan bien los conceptos y temas tocados en las secciones dentro de cada capítulo. En cada capítulo hay cuadros con información especial en tópicos selectos. En la sección de filogenia la Figura 7.2 (página 182) resume las ideas más recientes en relaciones genealógicas dentro de Hexapoda, colocando a Collembola y Protura como un grupo no monofilético, y excluyendo a Diplura de Insecta s. str. Mantophasmatodea se ubica como grupo hermano de Grylloblattodea. Con la excepción de la incierta ubicación de Strepsiptera, los hemipteroideos y holometábolos ocupan las relaciones que desde hace un tiempo se han propuesto (Kristensen 1991).

En los capítulos siguientes los autores desean abarcar grupos de insectos no por sus relaciones filogenéticas, sino por su lugar o forma de vida (desde insectos de hojarasca hasta insectos eusociales). Los últimos capítulos son de especial interés para los entomólogos prácticos pues relacionan los temas de los insectos como problema de salud o plaga.

Este libro hace un buen balance de los temas básicos en el estudio de la ento-

mología, y contiene cambios, puntos de vista y referencias actualizadas. Su precio (US \$75) lo hace más atractivo para el bolsillo del consumidor, aunque sigue estando lejos del alcance de muchos estudiantes.

Los lectores angloparlantes y los investigadores latinoamericanos con familiaridad y acceso a libros foráneos pueden disfrutar de manuales entomológicos que cubren casi todos los tópicos esenciales para el estudio de cualquiera aspecto en la biología de estos artrópodos. Sin embargo, seguimos careciendo de manuales o textos en español, que agreguen al valor del idioma nativo precios bajos y, sobre todo, enfoques biológicos y taxonómicos con nuestra fauna Neotropical. Algunas editoriales asumieron la tarea de traducir al español o portugués algunos de los libros escritos en otros idiomas, pero las versiones en español no incluían ningún tipo de adaptación a las faunas tropicales. Esperemos que este siglo XXI sea testigo de propuestas editoriales que enfrenten esta situación.

Fernando Fernández, Profesor Asociado, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, ffernandezca@unal.edu.co

Literatura Citada

- KRISTENSEN N. P. 1991. Phylogeny of extant Hexapods, pp. 125-140 en: I.D. Naumann, ed., *The insects of Australia*. Melbourne: Melbourne University Press.

<https://doi.org/10.25100/socolen.v31i2.9455>

CUIDADO, MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LAS COLECCIONES BIOLÓGICAS

John E. Simmons y Yaneth Muñoz-Saba (editores). 2005. *Cuidado, Manejo y Conservación de Las Colecciones Biológicas*. Universidad Nacional de Colombia. 288pp, ISBN 958-33-6969-1, \$10.000 (pesos colombianos)

Si bien para la mayoría del público en general y para algunos profesionales de las áreas de las ciencias de lo vivo, los museos de historia natural son centros de exhibición de fauna en poses históricas con fines de recreación, desde hace ya varios siglos es reconocido que estas instituciones prestan servicios invaluable en investigación básica, aspectos aplicados y educación. Dentro de los miles de ejemplos de estas funciones se puede citar el famoso caso de melanización industrial. En este sólido ejemplo de dinámica evolutiva de las

especies generado en la Inglaterra de comienzos de siglo fue posible relacionar el cambio histórico en la composición de las poblaciones de la polilla *Biston betularia* con el recubrimiento de los troncos de los árboles con hollín producido por las fábricas (Futuyma, 1998). Fueron precisamente las colecciones históricas de esta polilla, depositadas en los museos de historia natural, las que permitieron develar este patrón y apoyar en su momento mucho de la teoría evolutiva. Cuando se reconoce que los museos de historia natural son una fuente invaluable de información biológica, se abren paso para sus curadores retos mucho más allá de la consideración estética. Preocupaciones centrales como la correcta preservación de los especímenes, un almacenamiento seguro y accesible, así como un ágil manejo de la información en ellos depositada, se convierten en el mayor propósito de estos centros de investigación. Vale notar también que la dimensión temporal cambia dramáticamente. Los curadores diseñan su trabajo para que las colecciones perduren cientos de años. Es la impresión que queda cuando se tiene en la mano un ejemplar tipo de una especie de insecto montado por Fabricius o por el mismo Linneo, cuantos años de esmerado cuidado por varias generaciones nos permiten consolidar la definición de lo que una especie en particular es y nos permiten refinar toda la información biológica sobre esa especie, información desarrollada por los investigadores a lo largo del tiempo que se concreta en especímenes testigo depositados en un museo.

Tamaño desafío en que se convierte un museo de historia natural conlleva el desarrollo de técnicas especializadas en el manejo y procesamiento de sus colecciones y a pesar de que existen Revistas especializadas para curadores de museos con información pertinente, estas no son de fácil acceso. Aparece para nosotros un documento de obligada consulta para cualquiera que tenga acceso a una colección biológica en particular y una entomológica en especial.

El libro *Cuidado, Manejo y Conservación De Las Colecciones Biológicas* es el primero de la serie “*Manuales para la Conservación*” apoyado por Conservación Internacional cuyo propósito es brindar propuestas desarrolladas por grupos de especialistas, sobre diferentes temáticas que fortalezcan los procesos de manejo, investigación, conocimiento, monitoreo y conservación de nuestros recursos naturales.

Esta publicación cuenta con contribuciones de especialistas en diversos campos como: John E. Simmons de la Universidad de Kansas, Cristian Samper del Instituto Smithsonian, Maureen Montenegro de la Unidad Administrativa del Sistema de Parques Nacionales Naturales de Colombia, Arturo Rodríguez y Fabio Quevedo auxiliares de Colecciones Biológicas, Jorge Hernández Camacho “el mono Hernández” (Q.E.P.D.) presidente de la Fundación Biocolombia, y Fernando Fernández y Yaneth Muñoz-Saba, profesores del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.

Los autores de este libro, a lo largo de sus 288 páginas, logran: 1 presentar las

bases conceptuales para establecer algunas de las normas del cuidado, manejo y conservación de las colecciones biológicas, 2 presentar información sobre el cuidado, manejo y conservación de las colecciones biológicas con énfasis en la conservación preventiva, 3 definir unos requerimientos mínimos para la protección de las colecciones a partir del ambiente de almacenamiento y, 4 compilar la literatura existente sobre el cuidado, manejo y conservación de las Colecciones Biológicas. Con secciones muy útiles, apoyadas por fotografías e ilustraciones pertinentes, como el capítulo con la oportuna lista de materiales adecuados e inadecuados para colecciones, así como un interesante capítulo sobre la historia de las colecciones biológicas, este libro se constituye en una fuente autorizada de incalculable valor para quienes trabajan en las áreas biológicas.

Esta publicación se puede adquirir en el Museo de Historia Natural – Instituto de Ciencias Naturales, A. A. 7495 Bogotá en el punto de venta de la Facultad de Ciencias de de la Universidad Nacional de Colombia y en Conservación Internacional, por un costo de \$10.000 pesos colombianos.

Carlos Sarmiento, Profesor Asistente, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, cesarmientom@unal.edu.co

Literatura citada

FUTUYMA, D. 1998. *Evolutionary biology*. Third edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland. 763pp.

REVISTA COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA

Volumen 31 No. 2 Julio-Diciembre 2005

Publicación oficial de la Sociedad Colombiana de Entomología

JUNTA DIRECTIVA SOCOLEN

2004 – 2006

Presidente
Miguel S. Serrano

Secretario
Fernando Cantor R.

Vocales Principales
Aura Cecilia Burgos

Vocales Suplentes
Guiomar Nates

Vicepresidente
Edison Torrado

Tesorero
Guadalupe Caicedo R.

Carlos E. Sarmiento M.
Eduardo Espitia

Darío Corredor
Giovanny Fagua

Coordinadora de Biblioteca Aura Cecilia Burgos

Revisor Fiscal de Socolen Ariel Palomino Ulloa

Editor

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

Editor asistente

Ángela R. Amarillo S.
Departamento de Ecología y Territorio
Pontificia Universidad Javeriana

Comité Editorial

Alex E. Bustillo P.
Centro Nacional de
Investigaciones de Café
"Pedro Uribe Mejía" (Cenicafé)

Daniel Rafael Miranda E.
Universidad Industrial
de Santander

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

Ingeborg Zenner de Polanía
Corporación Universitaria de Ciencias
Aplicadas y
Ambientales (UDCA)

Luko Hilje
CATIE, Costa Rica

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

Comité Científico

Alejandra Bravo
Universidad Nacional
Autónoma de México,
Instituto de Biotecnología

Fernando Fernández
Universidad
Nacional de Colombia, Instituto
de Ciencias Naturales

Martha Lucía Quiñones
Universidad de Antioquia,
Programa
de Estudio y Control de Enfer-
medades Tropicales (PECET)

Amanda Varela
Pontificia Universidad
Javeriana, Departamento
de Biología

Marta Wolff
Universidad de Antioquia,
Instituto de Biología

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

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

Fernando Montealegre Z.
University of Toronto,
candidato a Ph. D.

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

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

Sociedad Colombiana
de Entomología
A. A. 11366 Bogotá, D. C.
Teléfono 3472320 Fax 2126209
<http://www.socolen.org.co>

Se acepta canje
Ask for exchange
E-mail: publicaciones@socolen.org.co

Licencia Mingobierno
002274/81

Tiraje 500 ejemplares

**Edición digital
e impresión**
Editora Guadalupe Ltda.
E-mail: ediguada@yahoo.es
Teléfono 2690788 Bogotá

La Revista Colombiana de Entomología forma parte del Índice Nacional de Publicaciones Seriadadas Científicas y Tecnológicas Colombianas de Colciencias (Categoría B) y aparece reseñada en CAB INTERNATIONAL, en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas (Latindex), en Chemical Abstracts, y en BIOSIS: Zoological Record.

SOCOLEN no se responsabiliza de las ideas emitidas por los autores.

Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir los artículos o los resúmenes, sin la previa autorización escrita del editor.

La persona interesada en poseer un impreso de un artículo puede solicitarlo al autor cuya dirección aparece en el pie de página del mismo.

REVISTA COLOMBIANA
DE ENTOMOLOGIA



Portada

Ectatomma en nectario
extrafloral, Amazonas

Fotografía

Santiago Bustamante

2º puesto
concurso de fotografía
entomológica
"Luis Felipe Mosquera"
XXXI Congreso,
Bogotá, julio 2004

ÍNDICE GENERAL DEL VOLUMEN 31 (1-2) 2005

.....

- A**
- Abamectin 180
- Abejas 235
- Acanthoscelides obtectus* 118, 120, 121
- Acari 193, 222
- Acaros 16, 192, 208
- Acca selloviana* 171, 176
- Acetilcolinesterasas 109
- Ácido g-aminobutírico 108
- Acinetobacter* 183
- Acinetobacter bawmanii* 186
- Acinetobacter calcoaceticus* 186
- Acrididade 85, 228
- Acridomorpha 228
- Acromyrmex octopinosus* 99, 101
- Acromyrmex rugosus* 99, 101
- Aechmea* 231
- Aechmea distichantha* 229, 230, 231
- Aechmea lagotis* 229, 230
- Aedes (Stegomyia) albopictus* 199
- Aedes* 107
- Aedes aegypti* 75, 76, 77, 78, 107, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 136, 199, 200, 201, 203, 205, 206
- Aedes albopictus* 200, 201, 205
- Aedes sollicitans* 107
- Aedes tritaeniorhynchus* 107
- Aeolothripidae 207, 208, 209, 210
- Aelothrips* 209
- Aeneolamia* 103
- Aeolothrips susrcalifornianus* 210
- Aeshnidae 221
- África 199
- Aglaoctenus lagotis* 229, 230, 231
- Agricultura sostenible 64
- Agroecología 55, 59
- Agroecosistema 64, 89
- Agroquímicos 80
- Agua dulce 219
- Ahuyama 22
- Aldehído Oxidasa 111
- Aleocharinae 44, 45
- Alergenos 5
- Aleyrodidae 21, 28, 155, 160, 161, 169
- Alfalfa 21
- Algodón 21, 22, 24, 25, 161, 169
- Amastigotes 74
- Amazonas 98
- Amblyopinus colombiae* 46
- América 71, 75
- América central 212
- América del Sur 212
- América Latina 18 203
- Amilasa 123 125
- Amitus fuscipennis* 169
- Anagyrus saccharicola* 30
- Anaphothrips* 210
- Anaphothrips obscurus* 210
- Anaphothrips sudanensis* 210
- Anastrepha* 67, 70, 171
- Anastrepha distincta* 67
- Anastrepha fraterculus* 171, 172, 173, 174, 176
- Anastrepha inca* 67
- Anastrepha ludens* 67, 70, 175
- Anastrepha manizaliensis* 67, 69, 70
- Anastrepha minensis* 67
- Anastrepha new species* 67
- Anastrepha ornata* 173
- Anastrepha schultzi* 67, 68
- Anastrepha striata* 173
- Anastrepha suspensa* 176
- Anatomía fálica 227
- Ancyliidae 221
- Aneocamp투스 excisicollis* 44, 45
- Angleton 98
- Annelida 222, 224
- Anochetus annualtus* 34
- Anochetus emarginatus* 99
- Anochetus mayri* 99
- Anopheles* 107
- Anopheles albimanus* 77, 107, 110, 111, 114
- Anopheles arabiensis* 110
- Anopheles culicifacies* 110
- Anopheles darlingi* 107, 115
- Anopheles dirus* 110
- Anopheles funestus* 112, 113
- Anopheles gambiae* 78, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115
- Anopheles pseudopunctipennis* 107
- Anopheles rangeli* 107
- Anopheles stephensi* 109, 110, 112, 114, 115
- Anopheles subpictus* 110
- Anophelinos 107
- Anotylus* 44, 45
- Anthocoridae 30, 159
- Anthomyiidae 192, 193, 194
- Anthophoridae 237
- Anticarsia gemmantalis* 80, 133
- Antioquia 98, 139
- Anzoátegui 74
- Aphelinidae 159, 160
- Aphididae 114
- Apidae 235, 237
- Apionidae 148
- Apis mellifera* 236
- Apocellus* 45
- Apocrita 237
- Apterothrips* 210
- Apterothrips apteris* 210, 211
- Aptinothrips rufus* 210, 211
- Arachis hypogaea* 169
- Arachnida 222, 224
- Aranaeae 222, 229
- Araneida 151
- Arañas lobo 229
- Arbovirosis 199
- Archaeognatha 237
- Argentina 181, 187, 225, 229, 233
- Arizona 161
- Arorathrips* 210
- Arorathrips mexicanus* 210
- Arorathrips xanthius* 210, 211
- Arroz 81, 82, 83
- Arthrotrys robusta* 136, 138
- Arthropleona* 222
- Arthropoda 222
- Artogeia rapae* 132
- Artrópodos 43, 93, 233
- Arveja 22, 162
- Ascomycotina 137
- Asia 37, 199, 203
- Asociación 229
- Asopinae 151
- Aspergillus flavus* 126
- Aspergillus oryzae* 126
- Aspergillus parasiticus* 30
- Aspersión 2
- Asteraceae 227
- Astronium balansae* 229
- Atiini 99
- Atta* 216
- Atta cephalotes* 92, 103
- Atta columbica* 99, 101
- Atta mexicana* 216
- Aurantothrips* 210
- Aurantothrips orchidiaceus* 210
- Australia 30
- Avena 81, 82, 83
- Avispas 233
- Azteca 99
- B**
- Bacillus* 185, 186
- Bacillus thurigiensis* 13, 199, 200, 201
- Bacterias 2, 10, 183, 185, 191
- Bactrocera oleae* 115
- Baculoviridae 127
- Baculovirus 127, 128, 129, 131
- Baetidae 221, 222
- Baetiscidae 222
- Barrenador 146
- Batata 24, 25
- Beauveria bassiana* 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 85, 87, 88, 123, 124, 125, 126, 134, 135, 136, 137, 177, 178, 179, 180, 181, 182
- Beauveria tenella* 182
- Begomovirus 22, 25, 28
- Belonochus excelsus* 46
- Belonochus planiceps* 46
- Belostomatidae 221
- Bemisia* 27, 28
- Bemisia argentifolli* 21
- Bemisia tabaci* biotipo 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 155, 156, 161, 162, 169
- Berenjena 22, 25, 37, 161
- B-esterasa 75
- Bifentrin 26
- Billbergia* 229, 231
- Biocontrolador 80
- Biodiversidad 64, 89
- Bioensayos 75, 76, 79
- Bioindicación 97
- Bioindicadores 219
- Bioinsecticidas 132, 199
- Bioplaguicida 127, 128, 131
- Biotipo 21, 24 25, 26, 27
- Biston betularia* 238
- Blatella germanica* 6, 8, 108, 187
- Blattidae 5, 222
- Blattodea 5, 108
- Bledius* 45
- Blepharidatiini 99
- Blepharoceridae 221

- BMWP' modif 219
 Bogotá 190, 195, 196, 207, 209, 211
 Bojacá 211
Bolitobius 46
 Bolívar 98
 Bolivia 65
Bombus 235
Bombus atratus 235
Bonagota cranaodes 142, 143, 144, 146, 150
Borreria bogotensis 211
 Bosque seco 45, 47, 49
 Bosque Seco tropical 10, 43, 44, 50
 Bosque secundario 97
 Bosques 89
 Botón 55, 59
 Boyacá 59, 64, 139, 140, 142, 143, 146, 156, 172, 173
 Brachymyrmecini 99
Brachymyrmex 99, 101
 Brasil 10, 18, 75, 152, 186, 187, 199, 200, 209, 233
 Broca del café 1, 4, 51, 117, 137, 178
 Brócoli 21, 22
Bromelia 231
Bromelia serra 229, 230
 Bromeliaceae 211, 229
Brontocoris tabidus 154
 Bruchidae 121
 Buenaventura 183, 184, 185
 Bunyaviridae 208
 Buprestidae 153, 154
 Burilicales 44
Bursera simarua 98
- C**
 Cachipay 70
Cacoxenus perspicax 30
Cadra cautella 150
 Café 70, 89, 90
 Cafetales 89, 90, 94
 Calabaza 25
 Calamoceratidae 221
 Caldas 70
 Cali 183, 184, 185, 190, 195, 196
 California 161
 Callao 219
Calliphora 192, 193
Calliphora vicina 189, 191, 192, 193, 194, 195, 196
 Calliphoridae 189, 191, 192, 193, 194, 195, 196
Callosobruchus chinensis 120
Callosobruchus maculatus 118, 120, 121
 Calopterygidae 221
 Camboya 199
 Camponotini 99
Camponotus 99, 216
Camponotus atriceps 99, 101
Camponotus bugnioni 99, 101
Camponotus lindigi 99
 Canales de sodio 108
Candida 183
 Canibalismo 7,8, 153
 Caña 30, 35
 Caña de azúcar 29, 30, 49
 Captura 139
 Carabidae 193, 194, 222
 Caracolíes 44
 Carbamatos 22, 23, 26
 Carbofurán 26
 Carbosulfán 26
 Carboxil-esterasas 110
 Carcinophoridae 222
Cardiocondyla 216
 Cartago 183, 184, 185
Cassia obtusifolia 98
 Casuarina 13
 Cauca 30, 31
 Caucho 9
 Cebo 5, 6, 8
 Cecidomyiidae 34, 143
 Cedro negro 70
 Centroamérica 15, 127, 145
Cephalotes 99
Cephalotes atratus erectus 99, 101
Cephalotes christophenseni 99
Cephalotes columbicus 99
 Cephalotini 99
 Cerapachyinae 91, 97
Ceratitidis capitata 171, 176
 Ceratopogonidae 221
Ceratohripoides 210, 211
Ceratohripoides aff. *chilticus* 210
Ceratohripoides aff. *funestus* 210
Ceratohripoides aff. *silvestris* 210
Cercospora kikuchii 58
 Chagas 15, 18, 19
Charassothrips 210
Charassothrips incomparabilis 210
Charassothrips piperaffinis 210
Charassothrips urospathae 210
 Chilco 211
 Chile 186, 225
 Chilopoda 222, 224
 China 199
 Chinche predadora 151
 Chinchiná 118
 Chironomidae 192, 193, 194, 220, 221, 222, 223, 224
Chirothrips 210
Chirothrips manicatus 210
 Chloropidae 193, 194
Chloroprocta 191, 192, 193
 Chocó 98
Chrysantemum indicum 162
 Chrysomelidae 42, 178, 182, 221
 Chrysopidae 233, 234
 Cialotrina 26
 Cilantro 22, 161
 Cilea 50
 Cipermetrina 22, 26
Citotroga cerealella 148
 Citrocromos 111
 Cleridae 192, 193, 194
 Clorosis 22
Clostridium 183
Clostridium thermosulfurogenes 126
 Clusiaceae 211
 Clusiidae 192, 193, 194
 Coccidae 30
 Coccinellidae 30, 155, 156
 Coccoidea 35
Cochliomyia 191, 192, 193
Cochliomyia macellaria 193
 Coelópteros 44
 Coenagrionidae 221
- Col 22, 161
 Coleoptera 42, 43, 50, 111, 117, 119, 121, 126, 136, 148, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 178, 182, 190, 191, 192, 193, 195, 222
 Collembola 222, 237, 238
Colletotrichum acutatum 136
Colletotrichum fragariae 136, 137
Colletotrichum gloeosporioides 81, 88, 136, 137
 Colombia 1, 9, 15, 19, 22, 25, 28, 29, 30, 37, 43, 44, 49, 50, 51, 67, 70, 71, 98, 97, 107, 117, 120, 127, 133, 155, 160, 169, 173, 177, 178, 182, 183, 186, 197, 207, 208, 211, 227, 228, 233, 238
 Colorado potato beetle 42, 182
 Combinación 177
 Comejenes 9
Commelia longicaulis 98
 Competencia vectorial 71
 Comportamiento 235
 Compositae 211, 212
Compsomyiops 191, 192, 193
 Concentración letal 130
 Conidiación 15, 16, 17, 18
Conidiobolus obscurus 87
 Conidios 80, 81, 83, 86, 178, 179, 180, 181
 Conservación 89, 133
 Contaminación 219
Contarinia pisi 143, 144
 Control 1, 5, 16, 26, 37, 65, 107, 177, 199
 Control biológico 9,10, 15, 51, 52, 64, 127, 133, 134, 151, 157, 160, 199
Coproica 191, 192, 193
Coproporus 44, 46, 50
Coptotermes 10
Coptotermes corvignathus 10, 14
Coptotermes formosanus 14
Coptotermes lacteus 14
 Córdoba 22, 26, 97, 98
Cordyceps 30
 Corinto 30, 31
 Corixidae 221
Cornitermes cumulans 10, 13
 Corydalidae 221
 Costa Atlántica 13
 Costa Rica 90, 209, 218
 Cota 211
 Crabronidae 237
Crataeva tapia 215
Crematogaster 92, 99, 100, 101, 216
 Crematogastrini 99
 Crioconservación 132, 134, 135, 136, 137, 151
 Crisantemo 162
 Crucíferas 161
Cryptolaemus moutrozieri 30
 Cuarentena 171, 172, 173, 174, 175
 Cuba 37, 38, 76
 Cucaracha 5, 8, 187
 Cucaracha americana 5
Cucumis sativus 37
 Cucurbitaceae 161
 Cucurbitáceas 22
Culex 114,

- Culex pipiens* 110, 113, 114, 115, 109, 201, 206
Culex quinquefasciatus 77, 78, 110, 111, 113, 114, 182, 201
Culex tarsalis 110
Culex tritaeniorhynchus 110, 114
Culicidae 75, 107, 114, 136, 182, 193, 194, 199, 201, 203, 221
Cultivos ageroforestales 10
Cultivos monospóricos 123
Cundinamarca 65, 70, 139, 140, 156, 172, 173
Curculionidae 117, 193, 194, 221, 238
Curuba 59, 63, 64
Curva de crecimiento 195
Curva de sobrevivencia 155, 156, 158, 159
Cydia nigricana 146, 150
Cydia pomonella 143, 144, 146, 147, 148, 149, 150
Cylas brunneus 148
Cylas puncticollis 148
Cyphomandra betaceae 64
Cyphomyrmex hamulatus 99, 101
- D**
Dacetoniini 99
Dalia 22, 25
Dasiops 59
Dasiops brevicornis 59
Dasiops caustonae 59, 60, 61, 62, 64
Dasiops curubae 59, 60, 61, 62, 64
Dasiops dentatus 59
Dasiops frieseni 59
Dasiops gracilis 59, 60
Dasiops inedulis 59, 60, 62, 64
Dasiops longulu 59
Dasiops passiflori 59
Dasiops rugifrons 59
Dasiops rugulosus 59
Dasiops saltans 62, 65
Dasiops yepezi 59, 60
DDT 75, 107, 108, 109, 112, 114
Delphacidae 111, 191, 192
Delphaltus pusillus 155, 156, 158, 159, 160
Dengue 75, 199, 203, 204, 204
Dermaptera 222, 228
Deuteromycete 137
Diadoplois coccidivora 34
Diazinón 75
Dichantium aristatum 98
Diente de león 211
Dinámica de población 161
Diplura 237, 238
Diptera 19, 30, 34, 59, 65, 67, 70, 71, 74, 75, 107, 108, 111, 114, 136, 143, 154, 171, 176, 182, 189, 190, 191, 192, 193, 195, 199, 201, 203, 220, 222, 237
Diversidad 43, 48, 89, 93, 97, 215
Diversidad alfa 220
Dixidae 222, 223, 224
Dolichoderinae 91, 97, 99, 100, 101, 216
Dolichoderus 99
Dolichoderus bispinosus 99
Dolichopodidae 193, 194, 221, 222
Dormidera 98
Dorymyrmex 99, 216
Drosophila 109, 113, 114,
Drosophila melanogaster 108, 109, 110, 111, 112, 115
Drosophilidae 30, 192, 193, 194
Dryopidae 221
Dugesidae 221
Dyctiostelium discoideum 87
Dytiscidae 222
- E**
Echinothrips 210
Echinothrips caribbeanus 210
Eciton burcheli 92, 99
Eciton vagans 99
Ecitoninae 91, 97, 99, 100, 101
Ectatoma ruidum 99, 100, 101
Ectatoma tuberculatum 99
Ectatommini 99
Ecuador 22, 28127, 160
Egypt 13
Elateridae 192, 193, 194
Electroforesis 123
Elmidae 221
Empididae 221, 222
Encarsia formosa 169
Encefalitis 199
Encyrtidae 30, 34
Enemigos naturales 30
Enfermedad de Chagas 177, 178, 181, 182
Enterobacter 183
Enterobacter agglomerans 186
Enterobacter cloacae 186
Enterococcus 183
Enthognatha 237
Entomofauna cadavérica 189
Entomología 18, 189, 205, 238
Entomopatógenos 1, 31, 52, 56, 58, 133, 177, 178, 80
Entomophthora 126, 134
Enzimas 117, 123, 128
Ephemerelellidae 222
Ephemeroptera 220, 222
Ephesia cautella 150
Ephydriidae 192, 193, 194
Eresidae 151
Eretmocerus californicus 159, 160
Ericaceae 211
Erythromastax 227, 228
Erythrotrips 209, 210
Erythrotrips diabolus 210, 211
Escarabajo Colorado de la papa 42, 182
Escarabajo de la papa 180
Escarabajos 43
Escherichia agglomerans 186
Escherichia cloacaceae 186
Escherichia coli 186
Espeletia grandiflora 211, 212
Estados Unidos 21, 22, 199, 200, 209
Estafilínidos 43, 44, 49, 50
Esterasas 51, 78110,
Estrella de belén 211
Eucalipto 9, 10
Eucalyptus tereticornis 9, 13
Eugastus 45
Eumastacidae 227, 228
Eumastacoidea 228
Eumastacoppinae 227
Eupatorium stoechidifolium 211
Euphorbia pulcherrima 162
Euphorbia schlechendalii 135
Eurhizococcus columbianus 13
Europa 186
Europa Meridional 199
Euthyplocidae 221
Extracción de ADN 203, 204, 205
- F**
Fabaceae 211
Facatativá 211
Fannia 191, 192, 193
Fanniidae 192, 193, 194
Fauna cadavérica 193, 196, 197
Fauna colombiana 227
Feijoa 171, 172, 173, 174, 176
Feromona 139, 140, 145, 146, 147, 148, 149
Feromonas sexuales 139
Fiebre amarilla 199
Filipinas 199
Flacourtiaceae 227
Flebotomofauna 74
Florida 30, 200
Formicidae 90, 95, 96, 183, 215, 218, 222
Formicinae 91, 98, 99, 99, 100, 101, 216
Forrajeo 235
Fragmentación 43
Fragmentos de bosque seco 43
Frankliniella 42, 209, 210, 212, 213
Frankliniella auripes 210, 211
Frankliniella bertelsi 210
Frankliniella bruneri 210
Frankliniella caudiseta 209, 210
Frankliniella cf. lorena 210
Frankliniella cf. salviae 210
Frankliniella chamulae 210
Frankliniella colombiana 210
Frankliniella crawfordi 210
Frankliniella fallaciosa 209, 210, 211, 212
Frankliniella gardeniae 210
Frankliniella insularis 209, 210, 211, 212
Frankliniella minuta 210, 211
Frankliniella occidentalis 42, 208, 210, 212,
Frankliniella panamensis 209, 210, 211, 212, 213
Frankliniella pestinae 210, 211
Frankliniella trisetosa 210
Frankliniella tympanona 210
Frankliniella valdiviana 210
Frankliniella verbesinae 210
Fraterculus 67
Frijol 22, 25, 37, 155, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169
Frijol lima 22
Frijol soya 84
Fruit flies 67, 171, 172, 173, 174, 176
Frutales 49
Fumagina 168
Fusagasugá 70
Fusarium 14
Fusarium oxysporum 135, 136

- G**
Galleria mellonella 2, 4
Gallus gallus 16
 Garrapatas 107
Gaylussacia buxifolia 211
 Gelastocoridae 221
 Gelechiidae 127, 132, 139, 144, 145, 148, 149, 150
Geocorys punctipes 158
 Geranio 22, 161
 Girasol 25
 Glossosomatidae 221, 222
 Glufosinato de amonio 52, 54
 Glutation-S-transferasas 110
Gnamptogenys bisulca 92
Gnamptogenys 91
Gnamptogenys gr striatula 92
Gnamptogenys minuta 92
Gnamptogenys ry 92
 Goiás 18
 Gomphidae 221
Goniobasis 222
 Granulovirus 127, 130, 132
 Grilloblatodea 238
 Guadua 49
Guadua aungustifolia 44
 Guaduales 44
 Guajira 22, 25, 156
 Guásimo 98
Guasuma ulmifolia 98
 Güira de Melena 38
 Gusano cogollero del maíz 133
- H**
 Habichuela 22, 24, 25, 35, 37, 155, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169
 Haliplidae 221
 Haptomonas 73
 Hawái 60, 199
 Helecho 211
 Helicopsychidae 221
Helicoverpa virescens 134, 80
Heliothis armigera 121
Heliothis assulta 121
Heliothis virescens 115
Heliothrips 210
Heliothrips haemorrhoidalis 210
 Heloridae 233, 234
Helorus 234
Helorus brethesi 233
 Hemiptera 19, 108, 114, 120, 151, 152, 153, 154, 155, 158, 159, 161, 177, 182
 Hemíptero 101, 204
 Heptageniidae 222
 Heteroptera 19, 29, 154,
Heterorhabditis 4
Heterorhabditis megidis 2
 Heterothripidae 207, 209, 210
Heterothrips 207, 210, 212
Heterothrips aff. *bolivianus* 210
Heterothrips aff. *decoratus* 210
Heterothrips analis 209, 210
Heterothrips cf. *alvarezi* 210
Heterothrips sericatus 210
 Hidrolasas 110
Hirsutella 134
 Hirudinea 222
 Histeridae 192, 193, 194
- Holometabola 237
Holotrochus 45
Homeomastax 227, 228
Homeomastax eduardoi 228
 Homoptera 13, 21, 28, 29, 35, 111, 160, 169
 Homópteros 30, 237
 Hongo entomopatógeno 9, 10, 15, 17, 30, 56, 58, 123, 126, 133, 136, 178, 180, 181, 182
 Hongos 10, 16
 Hormiga fantasma 183, 184, 187
 Hormiga faraona 183
 Hormiga loca 29, 35, 183, 184
 Hormigas 29, 30, 43, 49, 50, 89, 90, 91, 92, 94, 95, 97, 98, 99, 103, 183, 185, 215, 216, 217
 Hormigas vagabundas 183
 Horpyrhynchidae 193
 Hospedantes 21
 Huila 22, 156, 227
 Hyalellidae 221
Hydatothrips 210
Hydatothrips cf. *trincinctus* 210
Hydatothrips cf. *volvano* 210
Hydatothrips sternalis 210, 211
Hydatothrips volcano 211
 Hydrobiosidae 221
 Hydrophilidae 222
 Hydropsychidae 221, 222
 Hydroptilidae 221, 222
 Hymenoptera 30, 34, 35, 90, 151, 159, 160, 183, 215, 222, 218, 233, 234, 236, 237
Hypericum juniperinum 211
 Hyphomycetes 13, 18, 19, 182
 Hypomycete 136
Hypothenemus 99, 91
Hypothenemus hampei 1, 4, 51, 53, 55, 57, 117, 118, 119, 120, 121, 124, 126, 136, 178, 182
- I**
 Idolothripinae 213
 Imidacloprid 6, 8, 26
 India 42, 199
 Indicador biológico 219
 Indicadores 43
 Indio encuero 98
 Indonesia 199
 Inductor de virulencia 79
 Infección experimental 71
 Infección intrahospitalaria 183
 Infecciones nosocomiales 183, 187
 Inmunodifusión 128, 130
 Insecta 207, 212, 213, 207
 Insecticida 27, 51, 75, 77, 107, 179, 200, 201
 Insecticidas químicos 178, 199
 Insecto blanco 180
 Insectos depredadores 159
 Insectos parasitoides 160
 Interrupción de cópula 145, 146, 147, 148, 149
 Intervalo *post mortem* (IPM) 189, 190, 193, 194, 195, 196
 Inventario 207
Iridomyrmex humilis 187
 Isla Isabel 217
- Isoptera 9, 13, 14
 Israel 27
- J**
 Japón 199
Juglans 67
Juglans neotropica 70
 Juveniles infectivos 1
- K**
 Kairomonas 147
 KDT₅₀ 75, 76, 77
 KDT₉₀ 76
Klebsiella 183
 Korea 37, 42
- L**
 La Habana 38, 42
 La Vega 173
Labidus coecus 92, 99
 Labranza 64
Laetia americana 44
Lampetis nigerrima 153
 Lampyridae 221
 Latinoamérica 15
 Leguminosa 161
 Leioididae 193, 194
Leishmania (Leishmania) amazonensis 71, 72, 73, 74
Leishmania (Viannia) brasiliensis 74
Leishmania 71, 74
Leishmania chagasi 71, 74
Leishmania major 74
Leishmania mexicana 71, 72, 73, 74
 Leishmaniasis 71, 74
 Lepidoptera 30, 79, 80, 87, 108, 111, 121, 127, 132, 133, 137, 138, 139, 142, 143, 144, 145, 144, 145, 146, 148, 147, 150, 151, 169
 Leptanilloidinae 98
Leptinotarsa decemlineata 178, 182
 Leptoceridae 221
Leptochirus 45
 Leptohiphidae 221
Leptolegnia chapmanii 136
 Leptophlebiidae 221
Leptothorax 216
 Lestidae 221
 Ley de Poder de Taylor 162
 Libellulidae 221
 Libélulas 43
 Lima 219, 220
Limpetis nigerrima 154
Linepithema 99
Linschosteus 17
Lispinus catena 45
Lithocharis 45
 Lonchaeidae 59, 65
Lucila 121
Lucilia 192, 193
Lucilia sericata 191, 192, 193, 196
 Luthrochidae 221
Lutzomyia 19
Lutzomyia diabolica 74
Lutzomyia evansi 71, 72, 73, 74
Lutzomyia longipalpis 74
Lutzomyia migonei 74
Lutzomyia panamensis 71, 74

- Lutzomyia shannoni* 74
Lutzomyia youngi 74
 Lycosidae 229
 Lygaeidae 153, 154, 158
- M**
- Maclenia rupestris* 211
 Macroinvertebrados 219
Macrotermes subhyalinus 13
 Madagascar 199
 Madera 9
 Magdalena 10
 Maíz 133, 134
 Malaria 107
 Malasia 78, 199
 Malatión 75
 Manejo de roya 4
 Mango 37
Manguijera indica 37
 Maní forrajero 22, 25
 Manizales 70
 Mantecales 44
 Mantidae 101
 Mantophasmatodea 237
 Manual 13
 Manzano 146
 Mar de Cortés 215, 216, 217
 Maracuyá 59, 63, 64
 Marcaje 235
 Margarodidae 13
 Mariposas 43
 Masynteinae 227
 Material genético 203
 Medellín 190, 192, 195, 197
 Medio de cultivo 79
 Medon 35
Melanoplus sanguinipes 85
 Melanothripidae 207, 208
 Melastomataceae 211
Melipona 235, 236
 Meliponinae 236
 Meloidogyne 64
Melolontha melolontha 182
 Melón 22, 24, 25, 45
 Merothripidae 207, 208
 Mesoveliidae 221
Messor 218
 Meta 80, 98, 134,
 Metamidofos 22, 25, 26
Metarhizium anisopliae 9, 10, 11, 12,
 13, 14, 18, 30, 51, 52, 56, 57, 81,
 82, 85, 123, 124, 126, 134, 136,
 137, 178
Metarhizium flavoviridae 10, 58, 126
 Métodos de muestreo 161
 Metomil 22, 26
 México 50, 90, 209, 215, 233
Microcephalothrips 210
Microcephalothrips abdominalis 210
Microcerotermes 9, 10, 11, 12, 13
Micrococcus 185
 Microcoryphia 237
 Microhimenópteros 16
 Micromycetes 208
 Millo 81, 82, 83
Mimosa pudica 98
 Minas de Gerais 152
 Mirmecofauna 89, 97, 215, 218
 Mollusca 224
- Monacrosporium thaumasium* 136, 138
 Monitoreo 37, 139
 Monocrotofos 26
Monomorium 216
Monomorium floricola 184
Monomorium pharaonis 99, 183, 184,
 186, 187
 Morserinae 227
 Mosca blanca 21, 26, 27, 155, 156,
 159, 160, 161, 162, 163, 164,
 169
 Mosca de la fruta 67, 171, 172, 173,
 174, 176
 Moscas blancas 21, 22, 23, 24
 Moscas de la fruta 59, 64, 65, 70
 Mosquitos 203
 Muerte secundaria 8
 Muestreo secuencial 37, 161, 162, 163,
 167
Mujil auratus 119, 120
Mus musculus 72
Musca domestica 108, 109, 110, 115,
 154
 Muscardina 181
 Muscidae 94, 154, 192, 193, 196, 221,
 222
Muscina 191, 192, 193
 Mycetophilidae 193, 194
 Myrmicinae 91, 98, 99, 216, 100
 Myrmicini 99
Myzus persicae 14, 108, 114
- N**
- Nacaeus* 45
 Nariño 139
Nasutitermes exitiosus 10
 Naucoridae 221
 Nectomonas 73
Neivamyrmex humilis 99
Neivamyrmex pilosus 99
 Nematodos 1, 2, 4, 10, 64
Neobisnius vigii 45
Neohydatothrips 210
Neohydatothrips basilaris 210, 211
Neohydatothrips cf. *rapoportii* 210
Neohydatothrips cf. *humberto* 210
Neohydatothrips cf. *mirandai* 210
Neohydatothrips gracilipes 210
Neohydatothrips signifer 210, 211
Neohydatothrips tibialis 210
Neohyppnus 45, 46
Neolindus pumicosus 45
 Neonicotinoides 26
 Neotrópico 229
Nesomyrmex 216, 218
 Neuroptera 30, 233, 234
Neurospora crassa 57, 88
Nezara viridula 154
Nilaparvata lugens 111, 115
 Noctuidae 79, 80, 87, 121, 133, 137,
 138
Nomamyrmex esenbecki 99
Nomuraea 137
Nomuraea rileyi 79, 80, 81, 82, 83, 84,
 85, 86, 87, 88, 133, 134, 135,
 136, 137, 138
 Norteamérica 186
 Noteridae 221
 Notonectidae 221
- Nueva especie 67
 Nuevo Colón 60
 Nuevos registros 207
Nylandeiria fulva 35
- O**
- Ochtheophilum* 45
Octostruma balzani 92
Octostruma cf. *stenocarpa* 92
 Odiniidae 193, 194
 Odontoceridae 221
 Odontomachini 99
Odontomachus chelifer 99, 100
Odontomachus erythrocephalus 92
Odontotermes brunneus 10, 13
Odontotermes 10
Odontotermes wallonensis 10
 Oligochaeta 221, 222, 224
 Oligoneuriidae 221
 Oomycete 136
Oproblates woodwardi 30
 Organofosforados 22, 23, 26, 110
Oris albidipennis 160
Orius laevigatus 159, 160
Ornitogalum 211
 Orthoptera 85, 222, 227, 228
 Osoriinae 44, 45
Osorius colombinus 45
Oxelytrum discicolle 191, 192, 193
 Oxyltelinae 44, 45
Ozophora boranowskii 153, 154
- P**
- Pachycondyla* 91
Pachycondyla impressa 99, 100
Pachycrepo-ideeus vindemmiae 64, 65
Paecilomyces 124
Paecilomyces fumosoroseus 10, 56, 57
Paecilomyces lilacinus 9, 10, 11, 12,
 13, 57
Paecylomyces farinosus 137
Paecylomyces fumosoroseus 136
 Paederinae 44, 45
 Paederomimus 45
Paederus 45
 Países bajos 27
Palaminus 45
 Palomillas 127
 Pan 6
 Panamá 59, 209, 233
 Panchaetothripinae 210
 Panela 35
 Papa 21, 22, 37, 38, 41, 129, 139, 145,
 146, 155
 Paramastacinae 227
 Parasitoides 80, 233
 Parásitos 71
 Parasitosis 15, 18
Paratechina longicornis 183, 184, 186,
 187
Paratrechina 99, 101, 216, 217
Paratrechina fulva 29, 35
Paratrechina steinheili 92
 Parepisactinae 227
 Parque Nacional Isla Isabel 215
Passiflora alata 59
Passiflora edulis 59, 62
Passiflora ligularis 59
Passiflora mollisma 59, 60, 62, 64

- Passiflora pinnatistipula* 59
Passiflora suberosa 59
 Passifloraceae 59, 65
 Pastizal 97
 Patogenicidad 51, 53, 55, 79, 80
 PCR 109
Pediculus capitalis 78
Pediculus humanus 78
Penicillium chrysogenum 123
Penicillium roquefortin 123
Penicillium 30
 Pentatomidae 151, 152, 153, 154,
 Pepino 22, 25, 37, 161
Periplaneta americana 5, 6, 8, 7
 Perlidae 221
 Perú 59, 75, 219, 220, 225
 Pest 117
 Phaeothripidae 207, 213
Phaseolus vulgaris 27, 37, 117, 118,
 120, 161
Pheidole 91, 99, 100, 101, 184, 187
 Pheidolini 99
 Philippines 13
Philonthus 45, 46
 Philopotamidae 221, 222
 Phlebotominae 71
Phlebotomus 71
Phlebotomus dubosqui 74
Phomopsis obscurans 136, 137
 Phoridae 191, 192, 193, 194,
Phthorimaea operculella 127, 129,
 130, 131, 132
 Phycitidae 150
 Physidae 222, 224
Phytelephas seemannii 50
Pieris brassicae 132
 Piestinae 45
Piestus 45
 Pimentón 22, 24, 25, 161,
 Pino romerón 211
Pinophilus 45
 Piojos 107
 Piperaceae 227
 Pipunculidae 193, 194
 Piretroides 22, 23, 26, 75, 77, 107, 109,
 110
 Pitaya 62, 63, 65
Pithium ultimum 57
 Platyhelminthes 222, 224
Platydracus caliginosus 45
Platydracus emeritus 46
Platydracus femoratus 45
 Plecoptera 220
 Pleidae 221
Plodia interpunctella 148, 150
Plurotus ostreatus 88
Plutella xylostella 108, 146, 150
 Pnerinae 100
 Poblaciones 37
Podisus 151, 153
Podisus maculiventris 153, 154, 160
Podisus nigrispinus 153, 154
Podisus rostralis 154
Podocarpus oleifolius 211
Pogonomyrmex mayri 99, 100
 Poliandría 151, 153
 Polilla de guisantes 146
 Polilla de la papa 132
 Polilla guatemalteca 127, 139, 145,
 146, 150
 Polillas 43
 Polycentropidae 221
 Polythoridae 221
 Ponerinae 91, 98, 99
Porrina lagotis 229
 Prenolepidini 99
 Proctotrupoidea 233, 234
 Producción masiva 79
 Promastigotes 74
 Proteasas (Proteases) 51, 53, 54, 118
 Protección vegetal 13
 Protoplastos 52, 53, 56
 Protura 237, 238
Psectothrips 210
Psectothrips delostomae 210
Psectothrips palmerae 210, 211
 Pseudomastacinae 227
 Psephenidae 221
Pseudananas 229, 231
 Pseudocheilidae 192, 193
 Pseudococcidae 35
Pseudomona aeruginosa 187
Pseudomonas 183
 Pseudomyemecinae 91, 98, 99, 101,
 100
Pseudomyrmex 99, 101
Pseudomyrmex oculatus 92
Pseudomyrmex tenuissimus 92
Pseudopslusia includens 133
 Pseudothelpusidae 221
 Psychodidae 19, 71, 74, 221, 222, 224
 Ptilodactylidae 221
Ptorimaea operculella 145, 148
 Puerto Gaitán 80
 Puerto Rico 75
 Pulgas 107
 Pulmonata 222
Pulvinaria 30, 31, 32, 33, 34, 35
Pulvinaria iceryi 35
Pulvinaria pos elongata 29, 30
 Pyralidae 147, 149, 150, 169, 221
Pyramica marginiventris 99
- Q**
 Quindío 233
- R**
 RAPD's 22, 27
 RAPD-PCR 21
 Receptor GABA 108
 Reduviidae 18, 19, 120, 177, 182
 Reforestadora 9, 10
 Regiones insulares 215
 Relaciones simbióticas 29
 Repollo 161
 Resistencia 21, 23, 25, 26, 27, 28, 75,
 76, 77, 78, 107, 108, 109, 110,
 111, 112, 139
 Resistencia genética 145
Reticulitermes flavipes 10, 13, 14
Reticulitermes speratus 14
Rhammatocerus schistocercoides 85,
 88
 Rhinotermitidae 13, 14
Rhipicephalus appendiculatus 121
Rhodnius ecuadoriensis 16, 17, 19,
 180, 182
Rhodnius pallescens 16, 17, 19, 177,
 178, 179, 180, 181
Rhodnius prolixus 15, 16, 17, 18, 19,
 120, 121, 177, 178, 179, 180,
 181, 182
Rhynchophorus 238
Ricinus communis 88, 134
 Río Cauca 43
 Río Rímac 223, 225
 Riqueza 43, 48, 49, 93, 94, 95, 97, 101
 Risaralda 44, 89, 90
 Ronetus 45
 Rubiaceae 211, 227
 Rubiaceas 98
Rugilis 45
 Rusia 178
- S**
 Sabana de Bogotá 207
Saccharicoccus sacchari 29, 30, 31,
 32, 33, 34, 35
 Saldidae 221
 Saltamontes payaso 227
 Salticidae 101
 San Andrés de sotavento 71, 74
 San Antero 97
 San Antonio de los Caballeros 30
 San Francisco 173
 San Onofre 16
 San Sebastián de Buena Vista 10
 Sandía 22
 Santa Sofía 60
 Santander 156
 Santiago de Cuba 203
 Sao Paulo 187, 199, 200
 Sarcophagidae 190, 192, 193, 194, 222
 Scarabaeidae 182, 193, 194, 221
 Scatopsidae 192, 194
Schinopsis balansae 229
Sciocharis 45
 Sciomyzidae 222
Scioporus 45
 Scirtidae 221
Scirtothrips 210
Scirtothrips cf. *bisbravae* 210
Scirtothrips enthyntus 210
 Scolytidae 4, 126, 136, 178
 Scolytinae 117
Scrobipalopsis solanivora 144
Scutothrips 210
Scutothrips byrsonimae 210
Scutothrips incaensis 210
 Selección sexual 151
Selenicereus magalunthus 62, 65, 176
Selenothrips rubrocinctus 210, 211
Selenothrips 210
 Selva lluviosa tropical 50
 Sepsidae 190, 191, 192, 193, 194
Sergentomyia shwetzi 74
Sericomyrmex 99, 101
 Sericothripinae 210
Serpula lacrymans 136
Serratia 183
Serratia marcescens 85
 Siempre viva 98
 Silphidae 191, 192, 193, 194, 195, 196
Simopelta 91
 Simuliidae 221
 Singapur 199

- Siphonuridae 222
Smittium culisetae 136
 Solanaceae 161, 211
Solanum tuberosum 37, 146, 150,
 Solenopsidini 99
Solenopsis 91, 99, 100, 216
Solenopsis geminata 184
 Sopó 211
 Soya 22, 24, 25, 81, 82, 83, 86, 87
 Specidae 237
 Sphaeroceridae 192, 193, 194,
Spodoptera frugiperda 79, 80, 83, 87,
 88, 133, 134, 137, 138
Spodoptera litura 88
 Sri Lanka 199
Stannoderus 45
 Staphylininae 44, 45, 46
 Staphylinidae 43, 44, 46, 50, 192, 193,
 194, 221, 222
Staphylococcus 183, 184, 185
Staphylococcus aureus 186
Stegodyphus lineatus 151, 153
Steinernema 2, 3, 4
Steinernema carpocapsae 2
Steinernema glaseri 2
Stenchaetothrips 210
Stenchaetothrips biformis 210
 Steninae 44, 46
Stenus 46
Stenus alacer 46
Stiliphacis 45
Stipa tenacissima 218
 Stratiomyidae 221, 222
Streptococcus 186
 Stresiptera 238
Strumigenys interfectiva 99
Strumigenys marginiventris 101
Styngetus nigriventris 46
 Sucesión de fauna cadavérica 196
 Sucesión de insectos 189
 Sucre 16, 22, 26, 178
 Sudamérica 15
 Suecia 139
 Sumapaz 169
Suniostrichus 45
Supputius cincticeps 151, 152, 153, 154
 Suramérica 139, 145
 Sutamarchán 59
 Symphyta 237
- T**
 Tabaco 22, 24, 25, 161
 Tabanidae 221
 Tabla de vida 156
Tachinomorphus 46
 Tachiporinae 44, 46
Tacsonia 60
 Tailandia 199
 Taiwan 37
Tapinoma bicarinatum 186, 187
Tapinoma melanocephalum 183, 184,
 186, 187, 216, 217
Taraxacum officinale 211
 Tasa de crecimiento reproductivo 156
 Tasa finita de crecimiento 157, 160
 Tasa intrínseca de crecimiento 155,
 157, 160
- Tatamá 90
 Taxonomía 67
Tecia solanivora 85, 127, 129, 130,
 132, 138, 139, 140, 141, 142,
 143, 144, 145, 146, 147, 148,
 149, 150
 Técnica RAPD 203, 204
 Técnicas moléculares 203
 Temefos 75, 76
Temnnothorax 218
 Temnomastacinae 227
Tenebrio 120
Tenebrio molitor 152, 154, 182
 Tenebrionidae 152, 154, 182
 Tephritidae 60, 67, 70, 171, 176
 Terbrantia 207, 212
 Termitas 9, 10, 12, 13
 Termitidae 9
 Termopsidae 14
Terveticicillate penicillia 126
 Tradonía 45
Tetramorium bicarinatum 184
Tetramorium simillimum 92
Thinoharis 45
 Thripidae 37, 42, 169, 207, 208, 209,
 210, 212, 213
 Thripinae 210
Thrips 210, 212, 213
Thrips australis 210
Thrips palmi 37, 38, 39, 41, 42, 162,
 169, 208, 212, 213
Thrips simplex 210
Thrips tabaci 208, 210
 Thysanoptera 37, 42, 169, 207, 209,
 212, 213
 Thysanura 237
 Tiametoxan 26
 Tibasosa 173
 Tiempo generacional 155, 158
Tillandsia biflora 211
 Tipulidae 221, 222
 Tolima 156
 Tomate 21, 22, 24, 25, 155, 161, 162
 Tomate de árbol 64
 Tortricidae 142, 143, 144, 146, 150
Tospovirus 208
Toxotrypana 70
Trachymyrmex 99, 101
 Trampas 139
 Trampas Mcphail 55, 59
 Transformación 51
 Transmisión indirecta 5
 Trematoda 222
Trialeurodes vaporariorum 14, 22, 23,
 24, 25, 26, 27, 28, 155, 156,
 160, 161, 162, 163, 164, 165,
 166, 167, 168, 169
Triatoma 15
Triatoma infestans 17, 18, 181, 182
Triatoma sordida 18
 Triatominae 18
 Triatominos (Triatomineos) 16, 107,
 178, 180, 181, 182
Tribolium 119, 120
Tribolium castaneum 118, 119, 120
Trichoderma harzianum 52, 56, 57
Trichoderma longibrachiatum 57
- Trichomycete 136
Trichoplusia ni 119, 121, 134
 Trichoptera 220, 222
 Tricomias 159
 Triflumurón 177, 178, 179, 180, 181,
 182
Trigona 235, 236
 Trinidad 186
Tripanosoma cruzi 178
 Tripanosomiasis 177
Triplarix americana 98
 Trips 207, 208
 Trópico 22
 Trujillo 74
Trypanosoma cruzi 15, 19
 Tubulífera 207
 Tuluá 183, 184, 185
 Tunel de viento 139, 140
 Tunja 190
- U**
 Úmbita 60
 Uva 24, 25
- V**
V. lecanii 124
 Valle 30, 31
 Valle del Cauca 21, 22, 23, 26, 30, 44,
 50, 34, 98, 161, 162, 169, 183,
 184
 Valles interandinos 22
 Vara santa 98
 Vectores 107, 203
 Venezuela 71, 74, 127, 134
Verticillium lecanii 14
 Vertebrados 111
 Viçosa 152
 Vietnam 199
Vigna unguiculata 120
 Virulencia 79, 80, 86
 Virus 10, 30, 128, 129
 Virus baciliforme de la caña 35
 Virus de la necrosis del cacahuete 208
 Virus del bronceado del tomate 208
 Virus del mosaico del maní 208
Vriesea 229, 231
Vriesea inflata 229
- W**
Wasmannia auropunctata 92, 99, 100
 Whiteflies 27
- X**
Xenaster 45
Xenopigus analis 44, 45
 Xiphocentronidae 221
- Y**
 Yemen 130
- Z**
Zabrotes subfasciatus 118, 120, 121
 Zapallo 22, 25, 161
Zapothrica salebrosa 64, 59
 Zona Andina 161
Zootermopsis angusticollis 10, 14
 Zygentoma 237

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES (ver más información en página electrónica www.socolen.org.co)

La Revista Colombiana de Entomología es el órgano oficial de divulgación científica de la Sociedad Colombiana de Entomología –SOCOLEN– y publica de artículos científicos, inéditos, basados en resultados de investigaciones en el campo de la entomología o afines. Según disponibilidad de espacio, la revista publica descripción de métodos, descripción de una especie, notas taxonómicas, notas cortas y reseñas de libros. La revista publica un trabajo de revisión por número. La aceptación de los trabajos para su publicación dependerá de la evaluación de pares académicos nacionales e internacionales. No hay costo a los autores por publicación en la Revista. Por cada artículo publicado se entregará al autor en forma gratuita una copia en pdf.

Los artículos se pueden enviar en papel (original y dos copias), a: Revista Colombiana de Entomología, A. A. 11366 Bogotá, Colombia. También se reciben trabajos en versión electrónica a la dirección publicaciones@socolen.org.co bajo el título “artículo para Revista”. El envío electrónico del trabajo agiliza sensiblemente su evaluación por lo que se sugiere fuertemente. Envíe su trabajo en documento Word o pdf con opción para inserción de comentarios. Indique el tipo de documento para tablas y figuras. El autor puede sugerir hasta tres potenciales evaluadores. Todo trabajo recibirá un código que el autor deberá usar para correspondencia con la Revista.

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

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

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

Estructura del artículo

La sección “Capítulos” no se aplica a los trabajos de revisión ni las notas científicas. Antes de enviar trabajos de revisión consulte al editor (publicaciones@socolen.org.co).

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

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

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

Summary: Debe ser una traducción fiel al inglés del resumen respetando la gramática de cada lenguaje. Antes de enviar el trabajo a la Revista, solicitar la revisión de esta sección a una persona cuya lengua nativa sea el inglés.

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

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

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

Figuras: Deben estar citadas en el texto. Fotografías, dibujos, gráficos y mapas deben presentarse en páginas separadas con su correspondiente leyenda en la parte inferior. Deben ser de alta definición. Figuras impresas deben venir muy bien elaboradas en tinta china y en papel pergamino. Las fotografías se aceptarán en blanco y negro y en papel brillante. Envíe los documentos impresos sólo cuando se acepte su trabajo. Si las figuras van en formato digital, envíelas como documentos TIFF o JPEG (presentes en la mayoría de programas editores gráficos). Prefiera enviar sus figuras con los siguientes anchos (58mm, 120mm, ó 183mm). Cuando tenga varias fotos o dibujos prefiera disponerlos en mosaico y numérelas con ordinales (1a, 1b, etc.). Ilustraciones no originales deben venir acompañadas de su crédito respectivo. Se publicarán figuras a color si los autores cubren el costo adicional.

Cita de especies: Nombres científicos de género y especie van en cursiva y siguiendo las nor-

mas de los códigos internacionales de nomenclatura. La primera vez que cite una especie, adicione el descriptor y el año (p. ej.: *Apis mellifera* L., 1752)

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

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

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

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

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

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

SAMUELSON, A.; EVENHUIS, N.; NISHIDA, G. 2001. Insect and spider collections of the world web site. <http://www.bishopmuseum.org/bishop/ento/codens-r-us.html>

Fecha última revisión: 27 marzo 2001. Fecha último acceso: [14 abril 2001]

ADPOSTAL