

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Y CONTROL DE PLAGAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA

Clara Inés Saldamando Benjumea



Biología evolutiva
y control de plagas de
importancia económica

Biología evolutiva y control de plagas de importancia económica

Clara Inés Saldamando Benjumea

Bióloga, MSc, PhD

Profesora Titular

Escuela de Biociencias

Facultad de Ciencias



Medellín, Colombia 2023

595.7

S15 Saldamando Benjumea, Clara Inés

Biología evolutiva y control de plagas de importancia económica / Clara Inés Saldamando Benjumea. -- Primera edición. -- Medellín, Colombia : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 2023.

1 recurso en línea (182 páginas) : ilustraciones

ISBN: 978-958-505-473-8

1. INSECTOS. 2. BIOLOGÍA EVOLUTIVA. 3. GENÉTICA DE POBLACIONES.
4. FILOGENIA. 5. CONTROL DE PLAGAS. 6. SPODOPTERA FRUGIPERDA. I. Título

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín

© Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Centro Editorial Facultad de Ciencias

© Ana María Vélez Arango, Clara Inés Saldamando Benjumea, Claudia Ximena Moreno Herrera, Daniela Cano Calle, Diego Fernando Villanueva Mejía, Edna Márquez Fernández, Haidy Salinas Hernández, Juan Diego Ríos Díez, Kelly Estrada Pihedrahíta, María Isabel Velásquez Vélez, Norelsy Cañas Hoyos, Tatiana Lobo Echeverri y Rafael Eduardo Arango Isaza.

Primera edición: diciembre 2023

ISBN digital: 978-958-505-473-8

Editora académica: Clara Inés Saldamando Benjumea

Coordinadora Editorial : María Eugenia Aristizábal Giraldo

Diseño y diagramación: Hernán Leal Rodríguez

Dibujo portada y contra portada: Eduardo Tejada García

Comité Editorial Facultad de Ciencias:

Fernando Orozco Sánchez, Escuela de Biociencias

Víctor Ignacio López Ríos, Escuela de Estadística

Carlos Mario Lopera Gómez, Vicedecano Académico

Alejandro Muñoz Durango, Escuela de Matemáticas

Francisco Javier Rodríguez Cortés, Escuela de Estadística

Luis Fernando Echeverri Delgado, Profesor Universidad de Antioquia

María Eugenia Aristizábal Giraldo, Comunicadora Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia, 2023

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Hecho en Medellín, Colombia.

Dedico este libro a mi padre, César Saldamando Durán, a mi madre Ruby Benjumea Valencia y a mi hija Susana Hurtado Saldamando.

Tabla de contenido

Índice de figuras	8
Índice de tablas	10
Prólogo	12
Agradecimientos	14
Introducción	16
Referencias.....	26
1.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) introducción general	30
1.2 <i>Spodoptera frugiperda</i> investigaciones sobre la genética del insecto realizadas en Colombia	33
1.3 Conclusiones generales de la genética de poblaciones y filogeografía de <i>S. frugiperda</i>	45
1.4 Referencias.....	48
2.1 Introducción a la morfometría geométrica.....	52
2.2 Análisis de la morfometría geométrica en los biotipos de <i>S. frugiperda</i>	53
2.3 Conclusiones generales sobre la morfometría geométrica alar en <i>S. frugiperda</i>	59
2.4 Referencias.....	63
3.1 <i>Tecia solanivora</i> introducción.....	66
3.2 Genética de poblaciones y filogeografía de <i>Tecia solanivora</i>	68
3.3 Conclusiones generales de <i>Tecia solanivora</i>	83
3.3 Referencias.....	85
4.1 Introducción general del aislamiento reproductivo.....	91
4.2 Evaluación del aislamiento reproductivo en <i>S. frugiperda</i> realizado en Colombia	96
4.3 Conclusiones sobre el aislamiento comportamental y postcigótico de <i>S. frugiperda</i>	105
4.4 Referencias.....	109
5.1 Introducción del aislamiento reproductivo químico de <i>S. frugiperda</i>	114
5.2 Investigación del aislamiento químico realizada en Colombia.....	116

5.3 Conclusiones generales del aislamiento químico de <i>S. frugiperda</i>	125
5.4 Referencias.....	129
6.1 Introducción general sobre el control de plagas	135
6.2 Análisis de la respuesta de resistencia de los biotipos de maíz y arroz de <i>S.</i> <i>frugiperda</i> a insecticidas y endotoxinas del <i>Bacillus thuringiensis</i>	140
6.3 Conclusiones generales del control de <i>S. frugiperda</i>	148
6.4 Referencias.....	152
7.1 Trips del aguacate introducción general	157
7.2 Análisis filogenético de las especies de trips del aguacate	159
7.3 Análisis de la genética de poblaciones de dos especies del género <i>Frankliniella</i>	161
7.4 Conclusiones generales de los trips del Aguacate.....	168
7.5 Referencias.....	170
8.1 Referencias.....	178
Índice temático.....	180

Índice de figuras

Figura 1.1 Amplificación de los productos de PCR-RFLP del gen mitocondrial <i>COI</i> (569 pb) y sus respectivas digestiones con la enzima de restricción <i>MspI</i> (497 pb). M: Marcador de Peso Molecular, líneas 1, 2, 5 y 6: biotipo de maíz (presentan digestión), líneas 3, 4, 7 y 8: biotipo de arroz (no presentan digestión), C-: Control Negativo, C+: Control Positivo (Tomado de la tesis de Maestría de Ana María Vélez-Arango).	35
Figura 1.2 Amplificación de los productos de PCR de la región FR del ADN nuclear. M: Marcador de Peso Molecular, líneas 1, 5 y 6: biotipo de arroz (fragmentos por encima de 500 pb), líneas 2, 3, 4, 7, 8 y 9: biotipo de maíz (fragmentos menores a 500 pb), C-: Control Negativo, C+: Control Positivo. (Tomado de la tesis de Maestría de Ana María Vélez-Arango).	35
Figura 1.3 Dendrograma basado en la distancia genética de Nei con el método de UPGMA para el marcador <i>COI</i> . (Tomado de la tesis de Maestría de Ana María Vélez Arango).	36
Figura 1.4 Dendrograma basado en la distancia genética de Nei con el método de UPGMA para el marcador <i>FR</i> . (Tomado de la tesis de Maestría de Ana María Vélez Arango).	37
Figura 1.5 Dendrograma basado distancias pareadas de F_{ST} y el algoritmo UPGMA para el marcador <i>COI</i> . (Tomado de la tesis de Maestría de Daniela Cano Calle).	38
Figura 1.6 Dendrograma basado en distancias pareadas de F_{ST} y el algoritmo UPGMA para el marcador <i>FR</i> . (Tomado de la tesis de Maestría de Daniela Cano Calle).	39
Figura 2.1 Ala izquierda de <i>S. frugiperda</i> con sus 15 puntos de referencia anatómicos. (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas-Hoyos).	54
Figura 2.2 a) Análisis discriminante realizado en las hembras de los biotipos de <i>S. frugiperda</i> . b) Análisis discriminante realizado en lo machos de los biotipos de <i>S. frugiperda</i> . Biotipo maíz = barras Negras, Biotipo arroz = barras blancas. (Tomado del trabajo de pregrado de Norelly Cañas-Hoyos).	55
Figura 2.3 a) Configuraciones consenso del tamaño del ala de los machos de <i>S. frugiperda</i> , b) Configuraciones consenso del tamaño del ala de las hembras de <i>S. frugiperda</i> . CSM = Corn strain males, RSM = Rice strain males, CSF = Corn strain females, RSF = Rice strain females. (Tomado del trabajo de pregrado de Norelly Cañas-Hoyos).	57
Figura 2.4 Comparación del tamaño centroide (CS) entre los biotipos de <i>S. frugiperda</i> . HA= hembra de arroz, HM= hembra de maíz, MA = macho de Arroz, MM = machos de maíz (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos).	58
Figura 2.5 Análisis discriminante realizado en los biotipos de maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> de poblaciones de campo. A) En hembras y B) En machos. Blanco = Biotipo de maíz, Negro = Biotipo de arroz (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas-Hoyos).	59

Figura. 3.1 Dendrograma UPGMA obtenido con los genes concatenados del <i>COI</i> y <i>CytB</i> y las distancias genéticas de F_{ST} pareados entre los departamentos muestreados del insecto <i>T. solanivora</i> . A = Antioquia, B = Boyacá, N = Nariño y NS = Norte de Santander) (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).....	73
Figura. 3.2 Dendrograma UPGMA obtenido con el gen <i>CytB</i> y las distancias genéticas de F_{ST} pareados entre los diferentes países muestreados del insecto <i>T. solanivora</i> . E = Ecuador, C = Colombia, IC = Islas Canarias, V = Venezuela, y G = Guatemala. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).....	73
Figura 3.3 Análisis de asignación Bayesiano de los genotipos de <i>T. solanivora</i> analizada con ocho marcadores de microsatélites en los departamentos e Antioquia, Boyacá, Nariño y Norte de Santander. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).	78
Figura 5.1 Cromatogramas de extractos de glándulas sexuales de hembras de los biotipos de maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> extraídas a las 3, 6 y 10 horas de oscuridad. Negro = 3 horas, Rosado = 6 Horas y Azul = 10 horas. 1. D-Limoneno, 2. (E,E)-2,4-Decadienal, 3. Hexadecanal, 4. 1-Dodecanol, 5. (Z)7-12:Ac, 6. (Z)9-14:Ac, 7. Metil estearato, 8. Heneicosano. Los picos no rotulados corresponden al solvente o compuestos indeterminados. (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos).	117
Figura 5.2 Cromatogramas de extracto de glándulas sexuales de hembras de los biotipos de maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> a) con y b) sin machos presentes. Negro = con machos, Rosado = sin machos. (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos).	118
Figura 5.3 Cromatogramas de los extractos de las glándulas de hembras de los biotipos de maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> que muestra todos los componentes encontrados en el insecto. Negro = Biotipo arroz, Rosado = Biotipo maíz. La lista aparece en la tabla 5.1. (Tomado de la tesis de Maestría Norelly Cañas Hoyos).	119
Figura 7.1 Especies de trips encontradas en árboles de aguacate antioqueño y su distribución por órgano de la planta (Tomado de la tesis de Doctorado de Daniela Cano).	160
Figura 7.2 Filogenia bayesiana obtenida con a) <i>COI</i> y b) secuencias <i>ITS</i> de trips de aguacate. Las secuencias utilizadas como referencias están con sus códigos de acceso del GenBank y Bold, respectivamente. Las especies de trips encontradas en este trabajo fueron: <i>F. gardeniae</i> , <i>F. gossypiana</i> , <i>F. panamensis</i> , <i>T. palmi</i> , <i>T. simplex</i> , <i>T. trehernei</i> , <i>Microcephalotrips abdominalis</i> y <i>S. hansonii</i> . Out-group = <i>L. perseae</i> para el árbol <i>COI</i> y <i>Leptothrips mali</i> para el árbol de <i>ITS</i> (Tomado de la tesis de Doctorado de Daniela Cano).....	165
Figura 7.3 Red de haplotipos para especímenes de <i>Frankliniella gardeniae</i> y <i>F. gossypiana</i> (Thysanoptera: Thripidae) para los diecinueve haplotipos encontrados usyo a) secuencias <i>COI</i> e <i>ITS</i> . En gris: <i>F. gardeniae</i> , en negro = <i>F. gossypiana</i> . Cada línea en la red representa un cambio mutacional único. (Tomado de la tesis de Doctorado de Daniela Cano).....	167

Índice de tablas

Tabla 1.1. Tablas de contingencia para los marcadores moleculares <i>COI</i> , <i>FR</i> y los dos marcadores en conjunto para determinar distribución diferencial de los biotipos de <i>S. frugiperda</i> y sus híbridos en los cultivos de maíz, algodón, sorgo y arroz. (Tomado de Tesis de Maestría de Ana María Vélez Arango).....	36
Tabla 1.2. Tabla de contingencia para los marcadores moleculares <i>COI</i> , <i>FR</i> y los dos marcadores en conjunto para determinar la distribución diferencial de los biotipos e híbridos de <i>S. frugiperda</i> en los diferentes cultivos (Tomado de la tesis de Maestría de Daniela Cano Calle).....	38
Tabla 3.1. Test de neutralidad Tajima-Nei estimado para <i>T. solanivora</i> en Colombia (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).....	72
Tabla 3.2. Análisis de la estructura poblacional de <i>Tecia solanivora</i> colectada en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Norte de Santander y Nariño analizada con la secuenciación de los genes citocromo oxidasa I y citocromo b. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Fernyo Villanueva Mejía).....	72
Tabla 3.3. Características de cada locus microsatellite en <i>T. solanivora</i> de Colombia, incluyendo el número de alelos totales (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), heterocigocidad esperada no sesgada (UHe) y el índice de fijación (F). Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía.	74
Tabla 3.4. Análisis del equilibrio de Hardy Weinberg para cada locus por cada población. Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía.....	75
Tabla 3.5. Análisis de Varianza Molecular realizado con individuos de <i>T. solanivora</i> de poblaciones de Colombia, para obtener los estimadores F_{ST} (a) y R_{ST} (b) (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).	77
Tabla 3.6. Valores de F_{ST} pareados para las poblaciones de <i>T. solanivora</i> muestradas en Colombia. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).	77
Tabla 3.7. Resultado con el software Bottleneck para determinar el efecto de cuellos de botella recientes en <i>T. solanivora</i> de Colombia. K_o = número de alelos observados, H_e = heterocigocidad esperada, H_{eq} = heterocigocidad esperada bajo modelo de coalescencia, SD = desviación estyiar, $Prob$ = Probabilidad, SMM = Modelo de mutación paso a paso. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).	79
Tabla 4.1. Aislamiento precigótico comportamental medido como tiempo de apareamiento de poblaciones de maíz y arroz de <i>Spodoptera frugiperda</i> . Tomado de la tesis de Pregrado de María Isabel Velásquez Vélez.....	96
Tabla 4.2. Aislamiento precigótico comportamental medido como tiempo de apareamiento de poblaciones de maíz y arroz de <i>Spodoptera frugiperda</i> Tomado de la tesis de Pregrado de María Isabel Velasquez Vélez.....	97
Tabla 4.3 Apareamientos entre los biotipos de maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> del departamento del Tolima (C= Biotipo maíz, R= Biotipo arroz). Tomado del informe de pasantía (PAE) de Kelly Estrada Piedrahíta.....	99

Tabla 4.4. Estimaciones del índice de aislamiento reproductivo (I) y de las propensiones de apareamiento de machos y hembras utilizó el método de la máxima verosimilitud (ML) en los biotipos de <i>S. frugiperda</i> del departamento del Tolima, Colombia. Estimadores de los parámetros obtenidos basados en la obtención del mejor modelo basado en el criterio Aikaike $AIC = 2 \times$ el mejor modelo que se encuentran en negrilla. Tomado de la pasantía (PAE) de Kelly Estrada Piedrahíta.....	102
Tabla 4.5. Características del aislamiento postcigótico evaluado en líneas de <i>S. frugiperda</i> de maíz y arroz mantenidas en condiciones de laboratorio (NA = no aplica).....	103
Tabla 4.6. Análisis estadístico del aislamiento postcigótico entre poblaciones de maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> . Tomado de la tesis de Pregrado de María Isabel Velásquez Vélez.....	104
Tabla 5.1 Compuestos detectados en los extractos de glándulas de las hembras de los biotipos de maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> mantenidas en una colonia 2009-2017. A = arroz y M = maíz (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos)....	121
Tabla 5.2. Compuestos detectados en los extractos de glándulas de hembras de los biotipos de maíz y arroz <i>S. frugiperda</i> biológicamente activos en otros lepidópteros (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos).....	123
Tabla 5.3. Compuestos compartido en las glándulas sexuales de hembras de los biotipos de maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos).....	125
Tabla 6.1. Efectos en el ciclo biológico del insecto a causa de los tratamientos con insecticidas. L = lambdacialotrina, M = metomil. (Tomado de la Maestría de Juan Diego Ríos Díez)	142
Tabla 6.2. Tabla de contingencia de viabilidad de huevos de los biotipos de <i>S. frugiperda</i> en presencia de los insecticidas evaluados. Sin = sin tratamiento, Con = con tratamiento. (Tomado de la Maestría de Juan Diego Ríos Díez).....	143
Tabla 6.3. Respuesta de la presión de selección de las líneas evaluadas de <i>S. frugiperda</i> en condiciones de laboratorio en presencia de los insecticidas lambdacialotrina y metomil.(Tomado de la de maestría de Diego Ríos Díez) (GV) colonia susceptible de Gainesville, Florida. <i>a</i> La concentración letal 50 está expresada en partes por millón (ppm). Probit Analysis Program (Raymond 1985). <i>b</i> Error Estándar. <i>c</i> Intervalo de confianza. <i>d</i> Pendiente de la curva. <i>e</i> Razón de resistencia, CL50 de las líneas tratadas / Lc_{50} de la colonia susceptible de Gainesville, Florida (GV). <i>f</i> Razón de resistencia, CL50 de las líneas tratadas / Lc_{50} de colonias Venezuela evaluadas en la P_0 y F_3 . <i>g</i> <i>r</i> , tasa de desarrollo de resistencia. (Tomado de la tesis de Maestría de Juan Diego Ríos -Díez)	146
Tabla 6.4. Respuesta de los biotipos de maíz y arroz de <i>S. frugiperda</i> expuestos a dos endotoxinas del Bt. (Tomado maestría de Diego Ríos Díez). ^a CL50 (en ppm). Análisis Probit (Raymond 1985). ^b S. E. ^c Intervalo de confianza. ^d Pendiente. ^e CL50 proporción de resistencia (Tomado del informe a MinCiencias proporcionado por Juan Diego Ríos-Díez).....	147
Tabla 7.1. AMOVA. Resultados de AMOVA obtenidos de comparaciones genéticas entre individuos de las especies <i>F. gardeniae</i> y <i>F. gossypiana</i> recolectadas de aguacate (Tomado de la tesis de Doctorado de Daniela Cano).	162

Prólogo

Recién llegado de mi Cataluña natal a la Universidad de Los Andes (Bogotá) en septiembre de 1993 para impartir diversos cursos de genética de poblaciones y técnicas multivariantes, no tardé en verme invitado a impartir el curso de Evolución a principios de 1994. Allí conocí a varios estudiantes que, posteriormente, tuvieron una destacable carrera científica en diferentes campos de las ciencias biológicas. Entre ellos, una joven estudiante de nombre Clara Inés Saldamando Benjumea. Efectivamente, Clara realizó sus estudios de pregrado en la Universidad de los Andes entre 1991 y 1996. Tomado dicho curso, lo de la evolución biológica le quedó sonando e, inmediatamente, después de acabar su carrera, inició la maestría en su misma “Alma Mater” (1996 - 1998). Esto la llevó a realizar una investigación centrada en la importancia relativa del flujo genético y selección natural en una zona de hibridación de la mariposa *Heliconius cydno* (Lepidoptera, Nymphalidae). Esto reafirmó su interés por los insectos y, especialmente, por la evolución y la genética de poblaciones.

Recuerdo que, en una nublada tarde bogotana de 1998, ella pasó a saludarme en mi oficina del laboratorio de Genética de poblaciones molecular-Biología evolutiva de la Pontificia Universidad Javeriana, donde llevaba años laborando después de mi paso por la Universidad de los Andes. Clara estaba interesada en realizar un doctorado que expandiera sus conocimientos en el campo de la genética y de la evolución. Le comenté varias opciones y, entre ellas, surgió el grupo de investigación del Dr. Roger Butlin en la Universidad de Leeds en Gran Bretaña. Ni corta, ni perezosa, Clara puso en marcha su deseo de aprender más y doctorarse. Y, efectivamente, así lo hizo, y la conversación que mantuvimos no cayó en saco vacío. Realizó su doctorado (2000 - 2004), precisamente con el Dr. Butlin en la Universidad de Leeds trabajando con aislamiento reproductivo entre dos especies de saltamontes (*Chorthippus brunneus* y *Chorthippus jacobsi*) en una zona de hibridación, precisamente en Cantabria, relativamente cerca del lugar de origen del apellido paterno. Fue un trabajo relevante. Al menos, cuatro publicaciones, en revistas internacionalmente reconocidas como el Journal of Evolutionary Biology, Biological Journal of the Linnean Society (la revista descendiente de aquella en que Darwin y Wallace publicaron su revolucionario trabajo en referencia a la selección natural como mecanismo primigenio de la evolución biológica), y PLoS One, publicaron sus importantes descubrimientos.

Finalizado el doctorado, regresó a Colombia y trabajó durante un año en Corpoica (actual Agrosavia, 2004 - 2005) en el área de Entomología en el departamento de Tolima. Aquí se interesó principalmente por los insectos que se constituyen como plagas y afectan a los cultivos agrícolas. Posteriormente, en 2005, ingresó la Universidad Nacional de Colombia, sede en Medellín, donde actualmente es profesora titular desde 2014. En dicha institución elaboró las importantes investigaciones que recoge el libro que tiene el lector en sus manos (Biología Evolutiva y control de plagas de importancia económica). Una especie de polilla *Spodoptera*

frugiperda (Lepidoptera, Noctuidae), que afecta principalmente a las plantaciones de maíz, se convirtió en la especie objeto de estudio más persistente, pero no el único, para Clara. Esto es visible en el libro, que es pionero en Colombia en los conocimientos generados en este país con la utilización de diferentes aspectos evolutivos en insectos que afectan a cultivos agrícolas de interés económico, ya que de las siete investigaciones que presenta el libro en forma de capítulos, cinco tienen a *S. frugiperda* como protagonista. En esos cinco capítulos, Clara, sus colegas y estudiantes investigan y analizan aspectos tan relevantes como la genética de poblaciones y filogeografía (capítulo 1), la morfometría geométrica de las alas (capítulo 2), los mecanismos de aislamiento post y pre-cigóticos (etológicos y químicos) (capítulos 4 y 5), y el control químico y biológico (capítulo 6) de la citada polilla.

Pero no es el único insecto plaga que ha interesado investigativamente a Clara. También *Tecia solanivora* (Lepidoptera, Gelechiidae), la polilla guatemalteca que es plaga de los cultivos de papas-patatas, es objeto de estudio genético poblacional y filogeográfico en este libro (capítulo 3), al igual que diversos géneros como *Frankliniella*, *Microcephalothrips*, *Scirtothrips*, y *Thrips* (Thysanoptera, Thripidae) plagas para los aguacates que son analizados filogenéticamente (capítulo 7).

Por lo tanto, el presente libro es una herramienta fundamental para comprender la biología evolutiva de diferentes especies de insectos que son plagas importantes en Colombia y muestra el excelente nivel investigativo de Clara y sus colegas en la Universidad Nacional de Colombia sede en Medellín. Disfrute el lector de las citadas investigaciones.

Prof. Manuel Ruiz-García. PhD

Bogotá DC, 22 de octubre de 2023

Agradecimientos

Este libro se escribió con el propósito de compartir las diversas investigaciones realizadas por la profesora Clara Inés Saldamando Benjumea, de la escuela de Biociencias, de la Facultad de Ciencias, sede Medellín. Estos trabajos se llevaron a cabo por un buen número de estudiantes de postgrado en la maestría en Ciencias-Entomología, Bosques y Conservación, y especialmente Biotecnología. Además, del doctorado en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Entre los estudiantes se encuentran: Ana María Vélez Arango (Maestría en Entomología), Haidy Salinas Hernández MSc (Maestría en Ciencias-Entomología), Juan Diego Ríos Díez (Maestría en Ciencias-Entomología), María Isabel Velásquez Vélez (Pregrado en Ingeniería Agronómica), Kelly Estrada Piedrahíta (Pregrado en Ingeniería Biológica), Norelly Cañas Hoyos MSc (Maestría en Bosques y Conservación) y Daniela Cano Calle (Maestría en Ciencias-Biotecnología) quienes han estudiado y publicado con la profesora mencionada, sobre la polilla *Spodoptera frugiperda*. Diego Fernando Villanueva Mejía (Doctorado en Biotecnología) realizó su tesis de doctorado con la polilla *Tecia solanivora* y Daniela Cano Calle (Doctorado en Biotecnología) quien trabajo la microbiota asociada a los trips del aguacate y su filogenia. Junto con estos estudiantes y los profesores: Rafael Eduardo Arango Isaza, Edna Judith Márquez Fernández, Tatiana Lobo Echeverri y Claudia Ximena Moreno Herrera se lograron obtener todos los resultados de estas tesis.

14

Para las tesis de investigación de maestría de: Ana María Vélez Arango, Haidy Salinas Hernández, Juan Diego Ríos Díez y Daniela Cano Calle, y las tesis de pregrado de María Isabel Velásquez se obtuvo financiación de los siguientes proyectos cuyo investigador principal y autor de los mismos fue la profesora Saldamando, entre ellos se encuentran: “Caracterización molecular y estructura genética de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) en cultivos de maíz, arroz y algodón del Valle Cálido Alto del Magdalena (Colombia)”, y fue financiado de 2006 a 2008 por la Universidad Nacional de Colombia, el segundo se tituló “Haplotype identification of *Spodoptera frugiperda* strains from Tolima for the study the migratory behavior of the species” y fue financiado de 2009 a 2011, por la Universidad Nacional de Colombia, y el tercero “Identificación molecular de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) en cultivos de rotación (maíz, arroz y algodón) en los departamentos de Córdoba, Valle del Cauca y Meta, para una mejora de su estrategia de control” y fue financiado de 2008 a 2012 por Colciencias hoy en día llamado MinCiencias.

Posteriormente, la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos fue parcialmente financiada por el proyecto: “Estudio de la biología evolutiva de tres plagas importantes en Colombia: *Spodoptera frugiperda* (Plaga polífaga relevante en maíz), *Neoleucinodes elegantalis* (plaga oligófaga de Solanáceas) y *Tecia solanivora* (plaga monófaga de la papa)” durante los años 2013-2015, de la Universidad Nacional de Colombia y el análisis de los compuestos volátiles que hace

parte de su tesis fue financiado por el proyecto: “Análisis de la composición de feromonas sexuales de los biotipos de maíz y arroz de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) y su control con especies vegetales de la familia Meliaceae” financiado entre los años 2016 y 2017 por la Universidad Nacional de Colombia a la profesora Tatiana Lobo Echeverri como investigadora principal y a la profesora Saldamando como coinvestigadora.

Respecto a la tesis de Diego Fernando Villanueva Mejía, su financiación parcial provino también del proyecto “Estudio de la biología evolutiva de tres plagas importantes en Colombia: *Spodoptera frugiperda* (Plaga polífaga relevante en maíz), *Neoleucinodes elegantalis* (plaga oligófaga de Solanáceas) y *Tecia solanivora* (plaga monófaga de la papa)” durante los años 2013-2015. Y de un proyecto del Banco de la República denominado: “Estructura Genética Poblacional de la Polilla Guatemalteca (*Tecia solanivora*) en Colombia, estudios a nivel nuclear y mitocondrial: Evaluación de su poder invasivo”, financiado de 2012 a 2014.

Finalmente, la tesis doctoral de Daniela Cano Calle, se enfocó el análisis de la microbiota asociada a los trips (Thysanoptera, Terebrantia) del aguacate del departamento de Antioquia y la filogenia de dichos trips, fue financiada por un proyecto del Banco de la República obtenido en 2017-2018, titulado “Caracterización molecular de trips (Thysanoptera: Thripidae) procedentes de cultivos comerciales de aguacate (*Persea americana* Mill.) del oriente antioqueño y estudio de la diversidad microbiana asociada” cuyos investigadores fueron la profesora Claudia Moreno Herrera y el profesor Rafael Arango Isaza y por un proyecto de MinCiencias titulado “Bioprospección de la microbiota asociada a insectos plaga de cultivos de interés agrícola en Colombia: *Spodoptera frugiperda* (biotipos maíz y arroz) y trips del aguacate para el desarrollo de alternativas de manejo de su control, financiado desde 2018 hasta 2023 a los profesores Clara Inés Saldamando Benjumea, Claudia Moreno Herrera, Gloria Cadavid Restrepo y Rafael Arango Isaza.

A todos los que participaron de estas investigaciones, entes financiadores, profesores y sobre todo, los estudiantes de la Universidad Nacional de Colombia, muchas gracias!!

Introducción

Una plaga es una especie que puede ser representada por diversos grupos de organismos que incluyen a los insectos, nemátodos, termitas, caracoles, entre otros (Ha *et al.*, 2014). En el campo de la agronomía, las plagas representan principalmente a los insectos que atacan cultivos en los que generan grandes pérdidas económicas, las cuales son medidas en términos relacionados con la disminución de producción por el daño generado en sus frutos, hojas u otros tejidos y a su vez por el uso excesivo de agroquímicos. Por otro lado, en la parte clínica, las plagas son reconocidas como vectores de enfermedades humanas (Ha *et al.*, 2014; Galea, 2010). Las plagas en general, han sido manejadas con el uso de controles químicos y biológicos y dado el impacto de los primeros sobre las poblaciones de insectos benéficos y en humanos, el uso de controladores biológicos, ha alcanzado un mayor realce en las últimas décadas, como un método de reemplazo a los insecticidas de alto impacto. Por estas razones, el manejo integrado de plagas (MIP) ha promovido las formas de agricultura sostenible en el campo, reforzando la reducción del uso de insecticidas, generó grandes implicaciones socio económicas, ambientales y sanitarias en las poblaciones humanas ya que los efectos de los controles químicos son más severos sobre toda la fauna en general, por lo que el MIP enfrenta un gran reto que involucra la producción de cultivos de manera masiva con el menor impacto ambiental posible (Deguine *et al.*, 2021).

Las investigaciones relacionadas con el MIP, hasta el momento, solo han demostrado una reducción muy modesta del uso de los insecticidas desde los años 70 y se han enfocado en la realización de estudios basados en la agroecología de un cultivo, por lo que se tiene en cuenta como principio, identificar las plagas y enfermedades más relevantes de un cultivo que producen pérdidas económicas, posteriormente, se enfocan en las plagas secundarias, en las prácticas de protección (químicas y biológicas), en el agroecosistema (sistema modificado por los humanos para la producción de un alimento), la finca de producción, la ecología del paisaje y el sistema de alimentación (Deguine *et al.*, 2021). Dentro de este contexto, la agricultura, se puede definir como la ecología aplicada, en la producción de un cultivo, en la que el ser humano manipula poblaciones de especies vegetales, comunidades y ecosistemas a sus necesidades, por lo que la mayoría de problemas que implican tienen relación con estos niveles de organización de los individuos de una o varias especies en la naturaleza (Weiner, 2003). No obstante, el manejo de una plaga (MIP), no solamente debería tener en cuenta la evaluación de insecticidas químicos y biológicos para el control de sus poblaciones, el estudio de su entorno ecológico, la identificación de sus enemigos naturales y parasitoides y su posterior evaluación como sus biocontroladores, o simplemente la clasificación taxonómica de una plaga; sino que para el MIP de un insecto, también es importante tener conocimiento de su biología evolutiva,

por lo que existe la necesidad de avanzar en otros campos de la investigación para la mejora del MIP, incluyendo trabajos relacionados con la genética de las plantas y su coevolución con el insecto, la genética de las plagas y su variabilidad genética (hoy en día con el uso de estudios genómicos), el proceso de especiación de una plaga y su relación con el medio ambiente, la evolución de la barreras de aislamiento reproductivo de una plaga, la evaluación de métodos de restricción del flujo genético de sus poblaciones y por lo tanto de los genes que confieren resistencia a controles químicos y biológicos, la evolución de la respuesta de los insectos a controles químicos y biológicos, la genética de resistencia de las plagas ante insecticidas químicos y biológicos, entre otros. Todos estos estudios podrían contribuir de una manera más eficiente con la mejora de producción de un cultivo y el manejo de sus plagas (Weiner, 2017; Ríos-Díez y Saldamando, 2011; Ríos-Díez *et al.*, 2012; Saldamando, 2010, 2016).

La aplicación de la biología evolutiva y por ende la genética de poblaciones (microevolución) y sistemática filogenética (macroevolución) puede realizarse en especies que requieran un manejo en la naturaleza, entre ellas, las especies amenazadas, las especies endémicas, las especies con bajas tasas reproductivas y también las especies que son consideradas plagas y enfermedades de cultivos (Freely, 2005; Saldamando, 2010, 2016, Vélez-Arango *et al.*, 2008; Cano-Calle *et al.*, 2015; Villanueva -Mejía *et al.*, 2015 a y b; Cano-Calle *et al.*, 2021).

Dentro de las características más relevantes de las plagas (especies de insectos, nemátodos, y caracoles) y las enfermedades (especies de hongos, bacterias y virus) se encuentran: a) tienen una buena capacidad de dispersión, o de invasión, puesto que muchas de ellas tienden a reproducirse rápidamente, b) presentan cierto grado de especialización sobre su planta hospedera (monofagia, oligofagia, polifagia), c) son difíciles de controlar en campo por su rápida respuesta de resistencia a controles químicos particularmente, d) representan en muchos casos especies crípticas, por lo que el estudio de su manejo integrado debe ser evaluado desde diferentes perspectivas (Saldamando 2010, Saldamando, 2016; Vélez-Arango *et al.*, 2008; Cano-Calle *et al.*, 2015; Villanueva -Mejía *et al.*, 2015 a y b; Cano-Calle *et al.*, 2021). Esto significa que las medidas empleadas para el control de una plaga deben ser utilizadas con una gran cautela, ya que no solamente los insectos que atacan cultivos pueden adaptarse rápidamente al efecto de una selección artificial generada por un insecticida biológico o químico, sino que también su uso puede afectar insectos benéficos, como por ejemplo las abejas (Sethuraman *et al.*, 2020).

Con el fin de encontrar un equilibrio entre la producción de un cultivo, que representa una oferta alimenticia constante para una plaga, y su manejo, se requieren trabajos de investigación holísticos que incluyan preguntas relacionadas con la especie, además de las preguntas relacionadas con su entorno, a nivel ecológico, o fisiológico a nivel de la respuesta de un insecto ante un control sea químico o biológico o ambos. Una de las preguntas más relevantes para tener un conocimiento básico de una plaga es determinar si **¿el investigador trabaja con**

una o más especies? Es decir, tener un conocimiento básico de la sistemática y evolución del grupo con el que se está trabajando. Esto se debe a que muchas especies que atacan un cultivo son crípticas, por lo que su morfología y genética pueden ser muy similares, para ello el investigador debe emplear la sistemática filogenética con el uso de caracteres morfológicos y/o moleculares para resolver las relaciones ancestro-descendientes de un grupo (Freely, 2005; Futuyma, 2005). Debido a que la identificación de las especies y por ende su delimitación hace parte de la sistemática filogenética, un aspecto relevante que el investigador se puede preguntar es **¿cómo fue su proceso de especiación?**, es decir **¿qué tipo de especiación tuvo?** Dentro del contexto de la especiación, es importante tener en cuenta que, para la escuela de la **genética de poblaciones**, una especie está constituida por un grupo de poblaciones cuyos individuos se reproducen entre sí y no con otros, por lo que se basa en el **concepto biológico de especie** (Futuyma, 2005; Coyne y Orr 1989). Mientras que, para la escuela de la **sistemática filogenética**, una especie está constituida por su linaje ancestral y todos sus descendientes, por lo que una especie, representa un grupo **monofilético** (Futuyma, 2005). La **especiación** es un proceso por medio del cual, a partir de una especie ancestral surgen dos o más especies descendientes (Freely 2005; Futuyma 2005). La especiación ha sido clasificada principalmente en dos tipos: **alopátrica** y **simpátrica**. Sin embargo, también existen teorías que explican la especiación peripátrica y parapátrica (Futuyma, 2005; Freely, 2005) que no son explicadas en este libro. En la especiación **alopátrica**, el surgimiento de una barrera geográfica separa las poblaciones de una misma especie, y con el tiempo ellas evolucionan barreras de aislamiento reproductivo generó nuevas especies. Por otro lado, en la especiación **simpátrica**, la evolución de las barreras reproductivas no requiere una barrera geográfica, por lo que el aislamiento entre las poblaciones de una misma especie se da *in situ* (Freely, 2005, Futuyma, 2005). Estos dos tipos de especiación pueden ocurrir en plagas y enfermedades y su evolución es un factor determinante para la mejora de su manejo. Por ello, los estudios sobre la genética de poblaciones de un insecto y la sistemática filogenética, son fundamentales en el MIP, ya que permiten tener un conocimiento básico de una especie antes de emplear una técnica de control para su manejo. Por ejemplo, con el uso de la genética de poblaciones y hoy en día la genómica de poblaciones, se puede evaluar la respuesta de resistencia de un insecto hacia un insecticida, tanto biológico como químico, ya que estas ramas de la genética evalúan, el potencial genético de una plaga, y por lo tanto comparaciones de la genética o genómica de poblaciones de un insecto en diferentes periodos de tiempo establecen cómo han sido los cambios de los alelos o de sus SNPs (single nucleotide polymorphisms) de sus poblaciones y en muchos casos de estos trabajos se logran identificar los genes relacionados con la resistencia por medio del análisis de la asociación del carácter fenotípico (individuos resistentes y susceptibles) con un marcador molecular o hasta con los análisis genómicos por medio de los análisis de anotación de los genes (de un genoma), la determinación exacta de los genes de resistencia en uno o varios cromosomas de un genoma (Sethuraman *et al.*, 2020).

Dentro de las preguntas de investigación que se produce en un estudio de biología evolutiva al enfrentarse con una especie se encuentra las siguientes:

¿Qué tanta variabilidad genética presenta la especie que estoy estudiando?

El análisis de la variabilidad genética de una plaga, es muy importante puesto que nos proporciona información del acervo genético de ésta, ante una presión de selección natural o artificial. Se esperaría que una especie o población con una alta diversidad genética (número de alelos/locus, número de heterocigotos/locus, número de sitios segregantes o SNPs (single nucleotide polymorphisms)/secuencia, número de haplotipos/secuencias) pueda enfrentar con mayor facilidad una presión selectiva que una especie o población con una baja diversidad o altamente endogámica (Freely, 2005; Saldamando, 2010; Saldamando, 2016). Por lo que, la caracterización genética y molecular de una especie con marcadores moleculares, produce información sobre esta diversidad, y también puede proveer información sobre el nivel de endogamia en una población, el tipo de selección natural que afecta una población (direccional, disruptiva, estabilizadora), el número efectivo de la población, y también, puede ayudar a establecer si una población ha pasado por un cuello de botella, o si la población se encuentra en expansión reciente, en contracción o si su tamaño permanece constante, además provee información de su comportamiento migratorio, entre otras características (Nei y Kumar, 2000; Hedrick, 2005, Freely, 2005). Gracias a este tipo de estudios, el investigador puede establecer si la población del insecto que analiza tiene un potencial genético para responder a la presión artificial establecida por un insecticida sea biológico o químico, puede determinar si el tamaño de la población del insecto tiene un acervo genético amplio que permita su rápida adaptación o no, puede determinar las rutas migratorias de las plagas al comparar las secuencias de genes mitocondriales o de la mitocondria completa, entre poblaciones y determinar la población originaria y la fundada, entre otros aspectos que pueden ser importantes para el MIP (Freely, 2005; Saldamando, 2016; Sethuraman *et al.*, 2020).

Otra pregunta que se puede realizar es la siguiente:

¿Qué tanta conexión o contacto, en otras palabras, flujo genético existe en las poblaciones de una misma especie?

El flujo genético entre los individuos de diferentes poblaciones también es relevante, dado que permite el intercambio de genes entre las mismas, manteniendo una misma integridad genética (homogeneidad genética) de una especie, pero en caso de que el flujo disminuya, hay posibilidades de divergencia genética y con el paso del tiempo, de especiación, en caso de que evolucionen barreras del aislamiento reproductivo entre las poblaciones de una misma especie (Futuyma, 2005; Hedrick, 2005). Este flujo genético, puede ser evaluado en plagas o enfermedades agrícolas entre hospederos, entre zonas de producción, entre diferentes hábitats, entre

poblaciones con diferentes métodos de manejo en campo, entre otras. Por lo que podría generar información sobre el movimiento de genes que confieren resistencia a un control químico o biológico entre poblaciones de una misma especie (Ríos-Díez y Saldamando, 2011; Ríos -Díez *et al.*, 2012; Saldamando, 2010; Saldamando, 2016). Existen estudios en los que los investigadores han logrado establecer la asociación entre los genes que confieren resistencia a insecticidas con marcadores moleculares como los microsatélites o con secuencias de ADN, por lo que los investigadores conocen la genética de la resistencia de una plaga, como consecuencia de los estudios basados en la genética de sus poblaciones, muchos ejemplos se han dado con moscas del género *Drosophila* sp. (Freely, 2005; Sethuraman *et al.*, 2020).

Al responder estas dos primeras preguntas, un investigador podría determinar si las poblaciones de la especie que se encuentra estudiando, presentan una alta o baja variabilidad genética, por lo que dicha información permite determinar si pueden responder rápidamente o no a un control químico y/o biológico y también permite conocer si las poblaciones se están adaptando a diferentes condiciones ecológicas de los cultivos o hábitats donde fueron sus especímenes fueron colectados y por lo tanto difieren genéticamente por efectos de selección natural direccional que se encarga de favorecer un único genotipo (i. e. AA), disruptiva que favorece los dos fenotipos extremos de una población (i. e. AA y aa) o estabilizadora que favorece los genotipos intermedios (i. e. Aa) (Freely, 2005). También permiten determinar si las poblaciones de una misma especie transfieren los genes que les confiere resistencia a controles químicos o biológicos y qué tan rápido responden a la presión de selección artificial que éstos generan en sus poblaciones o si una población ha pasado por un efecto de deriva genética (Saldamando 2010; Saldamando, 2016). Este tipo de análisis se puede llevar a cabo, por ejemplo, al comparar las frecuencias de los genotipos heterocigotos en las poblaciones de los insectos, ya que selección disruptiva favorece los genotipos homocigotos de una población (i. e. AA, aa), la selección estabilizadora los genotipos heterocigotos (i. e. Aa) y la direccional solo un tipo de homocigotos (i. e. AA) (Freely, 2005). En el caso de que se realicen análisis genómicos de poblaciones, se pueden comparar los genomas de una especie desconocida con genoma de referencia en lo que se les han anotado los genes que confieren resistencia a insecticidas y también realizar análisis de transcriptoma puesto que éste se basa en el análisis de ARN que se expresa, así que son más precisos (Yainna *et al.*, 2022; Sethuraman *et al.*, 2020).

Las preguntas mencionadas con anterioridad, relacionadas con la evolución de los insectos que hacen parte de este libro, se han realizado con algunas especies consideradas plagas en Colombia, que han sido parte de las investigaciones llevadas a cabo el grupo de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB y su línea de investigación Ecología y Evolución de Insectos, creada desde el año 2005 por la profesora Clara Inés Saldamando Benjumea, entre ellas se encuentran: el gusano cogollero o fall armyworm (FAW) *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) (Vélez-Arango *et al.*, 2008; Saldamando y Vélez-Arango, 2010; Salinas-Hernández y Saldamando, 2011;

Calle-Cano *et al.*, 2015), el perforador del fruto o *Neoleucinodes elegantalis* (Crambidae) (Díaz -Montilla *et al.*, 2013, 2017), la polilla guatemalteca de la papa o *Tecia solanivora* (Gelechiidae) (Villanueva *et al.*, 2015 a, b) y las especies de trips del cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill) antioqueño (Calle -Cano *et al.*, 2021). Todas estas especies mencionadas fueron evaluadas teniendo en cuenta análisis de la genética de sus poblaciones y presentaron estructura genética identificada con marcadores moleculares, en el caso de *S. frugiperda*, se encontró que la especie divergió en dos biotipos asociados principalmente al maíz y al arroz (Vélez-Arango *et al.*, 2008; Saldamando y Vélez-Arango, 2010; Salinas-Hernández y Saldamando, 2011; Calle-Cano *et al.*, 2015), en *N. elegantalis*, también se encontró que la especie se diferenció en cuatro razas dependiendo del tamaño del fruto del hospedero de donde provienen (Díaz -Montilla *et al.*, 2013, 2017), con *T. solanivora* se encontró que la especie se diferencia genéticamente entre distintas zonas de Colombia, siendo las más diferenciadas las más distantes geográficamente (Villanueva *et al.*, 2015 a, b). Adicionalmente, con el uso de la sistemática filogenética, particularmente la sistemática molecular, se realizaron estudios filogenéticos de los trips (Thysanoptera, Tenebrantia) del aguacate, y se encontró que siete especies atacan a dicho cultivo y presentan diferencias morfológicas muy sutiles (Calle -Cano *et al.*, 2021).

La información obtenida sobre la mayoría de estas especies se encuentra incluida en los próximos capítulos de este libro, con el fin de entender la relevancia de llevar a cabo estudios genético poblacionales, y en sistemática filogenética en plagas de diferentes cultivos de importancia económica en el país, y la manera como fueron analizadas; para ello se recopiló información de las tesis de diferentes estudiantes de la Universidad para de tener una base literaria para el libro.

Por otro lado, ya que el uso de herramientas moleculares para la identificación de poblaciones que se encuentran genéticamente diferenciadas puede ser costoso y complejo, otra pregunta de investigación realizada con *S. frugiperda* fue determinar **¿si la morfometría geométrica podría ser útil en la diferenciación de los biotipos de maíz y arroz del insecto?** Trabajos relacionados con esta herramienta fueron publicados por Cañas-Hoyos *et al.* (2014), Cañas-Hoyos *et al.* (2016). La morfometría geométrica emplea fotografías de estructuras morfológicas de un organismo, particularmente estructuras planas, en las que, con el uso de variables geométricas, se estudian la forma y el tamaño de un carácter morfológico, por ejemplo: el ala, la genitalia, entre otras, con el uso de estadística multivariada y un análisis de procrusters (que se enfoca únicamente en la variación biológica de un carácter morfológico). Esta técnica, permite distinguir poblaciones de insectos (naturales o de laboratorio) que en muchos casos pueden ser crípticos (difíciles de diferenciar), como lo pueden ser los biotipos, razas o especies de un mismo género de insectos y puede ser una herramienta muy útil para distinguir poblaciones de plagas, que puedan requerir diferentes estrategias de manejo (Cañas-Hoyos *et al.*, 2016).

Posterior a estas preguntas de investigación, se pueden realizar otros cuestionamientos, dependiendo de la especie, por ejemplo, en el caso de que las poblaciones de la especie presenten un

bajo flujo genético, es decir presenta una estructura poblacional, sus poblaciones diferenciadas genéticamente podrían evolucionar barreras de aislamiento reproductivo que eviten el intercambio de genes entre ellas (Hartl y Clark 1997; Hedrick, 2005). Esto implicaría otra pregunta de investigación:

¿Las poblaciones qué estudio presentan barreras de aislamiento reproductivo?

Las barreras de aislamiento reproductivo se dividen en dos grupos: precigóticas y postcigóticas (Coyne y Orr, 1989). Las barreras precigóticas evitan el cruzamiento entre individuos de diferentes poblaciones, que pertenecen a distintas especies, por lo que evitan la formación de un cigoto entre ellas se incluyen los aislamientos precigóticos de tipo: comportamental, químico, temporal, ecológico, mecánico y gamético. Las barreras postcigóticas ocurren después del cruzamiento entre individuos de diferentes especies, pero actúan sobre el cigoto e incluyen características como: esterilidad híbrida, inviabilidad híbrida y bajo fitness híbrido (Futuyma, 2005).

La existencia de barreras de aislamiento reproductivo se evalúa, para determinar, ¿cuáles de ellas existen entre las poblaciones de una misma especie y cómo ocurren? Por lo que las preguntas de investigación relacionadas con las mismas son:

¿Los individuos de las poblaciones que presentaron estructura genética presentan barreras de aislamiento reproductivo **precigótico**? **¿Cuáles son?**

Para responder estas preguntas, es necesario lograr mantener poblaciones de las especies estudiadas en colonias o crías en condiciones de laboratorio, ya que solo la barrera de aislamiento ecológica puede ser estudiada en el campo, los demás tipos de aislamiento, se pueden analizar más fácilmente cuyo, la colonia de un insecto, se encuentra en condiciones de laboratorio (Velásquez-Vélez *et al.*, 2011). El mantenimiento de una colonia requiere adecuar unos cuartos de cría, con unas condiciones ambientales aptas para el desarrollo del insecto, y esto no siempre es posible para todas las especies de plagas, ya que muchas de ellas requieren unas condiciones específicas y especiales para su mantenimiento. No obstante, en los trabajos de investigación del grupo de investigación de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB, se logró realizar estudios de aislamiento reproductivo en *S. frugiperda*. Para ello, se emplearon larvas colectadas en la naturaleza para el mantenimiento de un pie de cría, que se mantuvo desde el año 2009 hasta el 2017. Los estudios de aislamiento reproductivo realizados en *S. frugiperda* fueron importantes puesto que permitieron explicar las causas del bajo flujo genético de las poblaciones de esta plaga en la naturaleza, por el bajo apareamiento existente entre las hembras del biotipo de maíz con los machos del biotipo de arroz y por el bajo fitness de sus generaciones híbridas (Velásquez-Vélez *et al.*, 2011; Saldamando *et al.*, 2014) y también sirvieron para encontrar alternativas de manejo o monitoreo de las poblaciones de este ya que una investigación basada en el análisis del aislamiento precigótico químico entre los biotipos de *S. frugiperda* realizada por Cañas-Hoyos *et al.* (2017) demostró que los biotipos de este insecto producen 21 compuestos

volátiles siendo 8 de ellos producidos únicamente por el biotipo de maíz y 11 por el biotipo de arroz y ambos son compartidos, por lo que este tipos de compuestos podrían ser empleados para elaborar trampas de captura de machos en la naturaleza.

Como se ha mencionado anteriormente, en el caso de *S. frugiperda*, se encontró que sus poblaciones presentaron **un flujo genético reducido** dependiendo del hospedero, que presentaron barreras de aislamiento reproductivo y que sus **biotipos de maíz y arroz** resisten diferencialmente a insecticidas de carácter biológico y químico por lo que en varios estudios realizados en la Línea de Investigación de Ecología y Evolución de Insectos (del grupo de investigación de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB), se demostró que las poblaciones de esta polilla, divergieron en poblaciones denominadas biotipos o razas y que estas poblaciones, se encuentran asociadas a diferentes plantas hospederas. Estos hallazgos se lograron plasmar en los siguientes artículos: Vélez-Arango *et al.* (2008), Saldamando y Vélez-Arango (2010), Salinas-Hernández y Saldamando (2011), Calle-Cano *et al.* (2015), y serán descritos en **el primer capítulo** de este libro. Uno de los aspectos más importantes de estos trabajos es que se demostró que el biotipo de maíz se encuentra asociado principalmente a los cultivos de maíz, algodón, sorgo y caña de azúcar y el biotipo de arroz en cultivos de arroz y pastos. Además, se demostró que este tipo de distribución en diferentes hospederos, se ha encontrado en otros países del mundo, por lo que las bases de las investigaciones realizadas con este insecto son concordantes con otros autores (Cano-Calle *et al.*, 2015; Vélez-Arango *et al.*, 2008).

La diferenciación morfológica de los biotipos de *S. frugiperda*, también se logró demostrar con las investigaciones de morfometría geométrica del ala en dos trabajos realizados por Cañas-Hoyos *et al.* (2014, 2016) en los que los autores comprobaron que el estudio de la forma y el tamaño del ala de machos y hembras del insecto colectados en campo y en laboratorio proveen información relevante que permiten distinguirlos con análisis discriminantes y canónicos. Los trabajos sobre la morfometría geométrica de este insecto se presentan en **el segundo capítulo** del libro.

Por otro lado, en el caso de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora*, una plaga cuyas larvas devoran las papas en almacenamiento o en cultivos naturales, y por lo tanto genera grandes daños en cultivos de papa en el país, se realizó un estudio de la **genética de poblaciones del insecto y de su filogeografía** y se comprobó que el insecto presenta una estructura genética, dado que las poblaciones del insecto del departamento de Norte de Santander se encuentran diferenciadas genéticamente las poblaciones de los departamentos de Antioquia, Boyacá y Nariño. El departamento de Norte de Santander fue la primera localidad de Colombia donde el insecto se reportó y encontró por lo que su genética de poblaciones es diferente al resto del país (Villanueva-Mejía *et al.*, 2015 a, b). Además, se compararon las secuencias mitocondriales de este insecto, con bases de datos genéticos del Genbank para poder corroborar su patrón migratorio y a su vez demostrar que, la especie no ha pasado por un cuello de botella en el país

(Villanueva-Mejía *et al.*, 2015 a). La genética de poblaciones de este insecto ha sido pobremente estudiada en Colombia y en el mundo, dado que este insecto es de gran relevancia económica en países de Centro y Sur América, donde el apoyo económico a la investigación básica es muy bajo, por ello, pocas investigaciones se han realizado al respecto con este insecto. Los resultados de los estudios hechos con *T. solanivora* se muestran en el **tercer capítulo** de este libro.

Respecto a los estudios de **aislamiento reproductivo**, en el caso de *S. frugiperda* el mantenimiento del pie de cría del insecto, como se explicó con anterioridad, solo implicó el uso de una dieta a base de frijol para la alimentación de sus larvas y de agua con azúcar para sus adultos, por ello varias investigaciones relacionadas con este tema se llevaron a cabo durante un largo periodo de tiempo (2009–2017), involucró trabajos sobre: el aislamiento postcigótico entre los biotipos de maíz y arroz (Velásquez-Vélez *et al.*, 2011), aislamiento temporal (Velásquez-Vélez *et al.*, 2011, Saldamando *et al.*, 2014), aislamiento comportamental (Saldamando *et al.*, 2014) y **aislamiento químico** (Cañas-Hoyos *et al.*, 2017). Estas investigaciones se verán descritas, en los **capítulos cuatro y cinco** de este libro.

Posterior a estos análisis del aislamiento reproductivo en *S. frugiperda*, se logró continuar con preguntas relacionadas con la interacción del insecto y sus métodos de control, particularmente la interacción de sus biotipos con controles químicos y biológicos. Para ello se evaluaron las respuestas de tolerancia de las larvas de este insecto cuyo fueron expuestas a insecticidas químicos y biológicos en condiciones de laboratorio por medio de análisis de pruebas Probit en las que se calculó la CL50 (concentración letal media) y otras concentraciones en las generaciones parentales, F₁, F₂ y F₃ que fueron mantenidas en una colonia en el laboratorio desde 2008 hasta 2017, en la que se mantenían separadas las crías de los dos biotipos de maíz y arroz y se obtuvieron sus generaciones filiales intrapoblacionales para este tipo de experimentos. Las preguntas generadas fueron las siguientes:

¿Si las poblaciones de una misma especie, presentan un bajo flujo genético, es posible que respondan diferencialmente a métodos de controles químicos y/o biológicos?

Con *S. frugiperda*, se evaluó si existían **diferencias en la respuesta de tolerancia** de los biotipos de maíz y arroz a **insecticidas** (Ríos-Díez y Saldamando, 2011), y a su vez si existían diferencias en esta respuesta en los biotipos de maíz y arroz a **endotoxinas del *Bacillus thuringiensis*** con la exposición de sus larvas a estos compuestos (Ríos-Díez *et al.*, 2012). Estos dos estudios se pudieron llevar a cabo dada la facilidad del mantenimiento del pie de cría del insecto en condiciones de laboratorio y se explican en el **sexto capítulo** del libro.

Finalmente, la última pregunta de investigación que se responde en este libro es la siguiente: **¿Es posible que nos encontremos con especies crípticas en un cultivo y no con una especie que exhiba diferentes polimorfismos?**

Respecto a este tema, un estudio filogenético fue realizado en la tesis de doctorado de la estudiante Daniela Cano Calle, que se enfocó en estudiar **las especies de trips** encontradas en el cultivo de aguacate antioqueño. Estos insectos, hacen parte del orden Thysanoptera, suborden Tenebrantia, y se caracterizan por ser especies crípticas, en este caso, la pregunta de investigación fue de carácter macroevolutivo, puesto que se contaban con especímenes de un pequeño tamaño propio del grupo, que presentaban una gran similitud morfológica, pero diferencias marcadas en su patrón de coloración corporal. Para llevar a cabo esta investigación, se realizaron colectas de adultos, en cultivos de aguacate, que fueron llevados al laboratorio con el fin de separarlos por morfotipos y diferenciarlos con la ayuda de un taxónomo experto. Más adelante, se realizó una secuenciación parcial del gen mitocondrial *COI* y una secuenciación de la región *ITS* para llevar a cabo una filogenia (para cada marcador molecular) y el reconocimiento de siete especies asociadas al cultivo de aguacate en un trabajo que publicó Calle-Cano *et al.*, (2021). Varias investigaciones sobre la filogenia y biología evolutiva de los trips se han realizado en el mundo, puesto que estos insectos atacan una gran cantidad de cultivos en países de América y Asia, por lo que para la realización del trabajo producido por Cano-Calle *et al.*, (2021) se tenía buena referencia bibliográfica. Los resultados de este estudio, se explicarán en el **séptimo capítulo** del libro.

Todos estos trabajos de investigación hacen parte de este libro que tiene como propósito mostrar diferentes herramientas de la genética de poblaciones, biología molecular, morfometría geométrica, biología evolutiva y sistemática con el fin de tener un conocimiento más profundo del proceso de especiación y de adaptación de plagas de importancia económica en el país. Además, de realizar investigaciones relacionadas con el manejo del insecto y la determinación de las concentraciones que pueden producir resistencia en las larvas de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio.

Es importante mencionar que la mayoría de las investigaciones, que aparecen en este libro, se concentraron en el análisis de la genética de las poblaciones de las plagas mencionadas, posteriormente los análisis de aislamiento reproductivo, seguido del análisis de resistencia a controles químicos y biológicos y la filogenia. La mayoría de trabajos mostrados se han enfocado en *S. frugiperda*, puesto que con esta polilla se ha venido trabajado desde el año 2005 hasta el 2017, en diversas tesis de Maestría de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, mientras que el trabajo realizado con *T. solanivora* y los trips del aguacate fueron basados en dos tesis de doctorado de la misma universidad, más recientemente ya que con *T. solanivora* se trabajó desde 2011 hasta 2015 y con los trips desde 2017 hasta 2022.

Referencias

- Cano-Calle, D., Arango-Isaza, R. E., Saldamando-Benjumea, C. I. (2015). Molecular Identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains in Colombia by using a PCR-RFLP of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI) y a PCR of the gene FR (for rice). *Annals Entomological Society of America*, 108, 172–180.
- Cano-Calle, D., Saldamando-Benjumea, C. I., Moreno-Herrera, C. y Arango-Isaza, R. E. (2021). Morphological y molecular analysis of thrips (Thysanoptera: Thripidae) diversity on avocado y dyelion: New species records for Colombia y limitations for molecular differentiation of two species. *Revista Colombiana de Entomología*, 47, 1-13.
- Cañas-Hoyos, N., Lobo-Echeverri T. y Saldamando-Benjumea C. I. (2017). Chemical Composition of Female Sexual Glycs of *Spodoptera frugiperda* Corn y Rice Strains from Tolima, Colombia. *Southwestern Entomologist*, 42, 375-394.
- Cañas-Hoyos, N., Lobo-Echeverri T. y Saldamando-Benjumea C. I. (2017). Chemical Composition of Female Sexual Glycs of *Spodoptera frugiperda* Corn y Rice Strains from Tolima, Colombia. *Southwestern Entomologist*, 42, 375-394.
- Coyne J. A. y Orr H. A. (1989). Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution*, 43, 362-381.
- Deguine, J. P., Aubertot, J. N., Flor, R. J., Lescourret F., Wyckhuys, K. A. G y Ratnadass, A. (2021). Integrated pest management: good intentions, hard realities. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41, 1-38.
- Díaz-Montilla, A. E., Suárez-Barón, H. G., Gallego-Sánchez, G., Saldamando-Benjumea, C. I., y Tohme, J. (2013). Geographic differentiation of Colombian *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera: Crambidae) haplotypes: evidence for Solanaceae host plant association y Holdridge life zones for genetic differentiation. *Annals Entomological Society of America*, 106, 586-597.
- Díaz-Montilla, A. E., Gallego-Sánchez, G., Suárez-Barón, H., Cano-Calle, D., Arango-Isaza, R. E., Viera, W. y Saldamando-Benjumea, C. I. (2017). *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) Population Structure y Isolation by Distance in Central y South America Revealed with Cytochrome Oxidase I (COI) Gene. *Southwestern Entomologist*, 2, 753-768.
- Freely, J. (2005). *Molecular ecology* (2aEd.). Editorial West Sussex, Jonh Wiley y Sons, Engly, 388p.
- Futuyma, D. J. (2005). *Evolution*. Editorial. Sinauer Associates. Sunderly MA.
- Galea, V. (2010). *Learning guide: Principles of integrated plant protection*. The University of Queensly: QLD.
- Ha, T. M. (2014). A Review on the Development of Integrated Pest Management y Its Integration in Modern Agriculture. *Asian Journal of Agriculture y Food Sciences*, 2, 335-340.
- Hartl, D.L. y Clark, G.C. (1997). *Principles of Population Genetics*. Editorial Sinauer Associates, Sunderly.

- Hedrick, P. H. (2005). *Genetics of populations* (3a Ed.). Editorial Jones y Bartlett, Sudbury Massachusetts 720p.
- Nei, M. y Kumar S. (2000). *Molecular evolution y phylogenetics*. Editorial Oxford University Press, New York
- Ríos-Díez, J. D. y Saldamando, C. I. (2011). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from Central Colombia to two insecticides, methomyl y lambda-cyhalothrin: A study of the genetic basis of resistance. *Journal of Economic Entomology*, 104, 1698-1705.
- Ríos-Díez, J. D, Siegfried, B. y Saldamando-Benjumea, C. I. (2012). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains from Central Colombia to Cry1Ac y Cry1Ab. *Southwestern Entomologist*, 37, 281-293.
- Saldamando, C. I. (2010). La posible especiación simpátrica o alosimpátrica de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Boletín del Museo de Entomología Francisco Luis Gallego*, 2, 9-26.
- Saldamando, C. I y Vélez-Arango, A. M. (2010). Host plant association y genetic differentiation of corn y rice Strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. *Neotropical Entomology*, 39, 921-929.
- Saldamando-Benjumea, C. I., Estrada-Piedrahíta, K., Velásquez-Vélez, M. I. y Bailey R. I. (2014). Assortative mating y lack of temporality between corn y rice strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) from Central Colombia. *Journal of Insect Behavior*, 27, 555–566.
- Saldamando, C. I. (2016). Biología Evolutiva de Tres Insectos de Importancia Económica de Colombia: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera, Crambidae), *Tecia solanivora* (Lepidoptera, Gelechiidae). *Boletín del Museo de Entomología Francisco Luis Gallego*, 8, 6-28
- Salinas-Hernández, H., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2011). Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains from Colombia. *Neotropical Entomology*, 40, 421-430.
- Sethuraman, A., Janzen, F. J., Weisrock, D. W., y Obrycki, J. J. (2020). Insights from Population Genomics to Enhance y Sustain Biological Control of Insect Pests. *Insects*. 22, 11(8)-462.
- Velásquez-Vélez, M. I, Saldamando-Benjumea, C. I. y Ríos-Díez J. D. (2011). Reproductive Isolation between Two Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Collected in Corn y Rice Fields from Central Colombia. *Annals of the Entomological Society*
- Vélez-Arango, A. M., Arango, R. E., Villanueva, D., Aguilera, E. y Saldamando, C. I. (2008). Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*, 34, 145-150.
- Villanueva-Mejía, D. F., Ramírez-Ríos, V., Arango-Isaza, R. E., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2015 a). Phylogeography of *Tecia solanivora* from Colombia Based on Cytochrome Oxidase I y Cytochrome b Mitochondrial Genes. *Southwestern Entomologist*, 40, 775–788.

- Villanueva-Mejía, D. F., Ramírez-Ríos, V., Arango-Isaza, R. E., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2015 b). Microsatellite Analysis Reveals Population Structure y Population Expansion of *Tecia solanivora* in *Solanum tuberosum* in Colombia. *Southwestern Entomologist*, 40, 37-52.
- Yainna, S., Tay, W.T., Dury, K. *et al.* (2022). The evolutionary process of invasion in the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Scientific Reports*, 12, 21063
- Weiner, J. (2003). Ecology – the science of agriculture in the 21st century. *The Journal of Agricultural Science*, 141, 371-377.
- Weiner, J. (2017). Applying plant ecological knowledge to increase agricultural sustainability. Mini-Review: Ecological Solutions to Global Food Security. *Journal of Ecology*, 105, 865-870

CAPÍTULO 1. GENÉTICA DE POBLACIONES Y FILOGEOGRAFÍA DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Autores: Daniela Cano Calle¹, Clara Inés Saldamando Benjumea¹, Rafael Eduardo Arango Isaza¹, Ana María Vélez Arango², y Haidy Salinas Hernández¹.

1. Biotecnología Vegetal Grupo UNALMED-CIB, Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos 16-223, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, dacanoca@unal.edu.co (<https://orcid.org/0000-0002-6399-0190>), cisaldam@unal.edu.co(<https://orcid.org/0000-0001-9368-8200>)y rearango@unal.edu.co (<https://orcid.org/0000-0002-7276-6035>)
2. Profesora Asociada, Universidad de Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos

1.1 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) introducción general

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), también llamado FAW (fall army worm) a nivel mundial y gusano cogollero en Colombia, es un insecto holometábolo y a su vez un insecto tropical endémico del hemisferio occidental. La especie, tiene un rango de distribución, en el hemisferio occidental, desde Argentina hasta Estados Unidos y Canadá (Pashley *et al.*, 2004; Busato *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Nagoshi y Meagher, 2003, 2004; Cano-Calle *et al.*, 2015). *S. frugiperda* es considerada una plaga primaria de los cultivos de maíz y secundaria en el algodón, el arroz y algunas hortalizas en Brasil, Colombia y Estados Unidos (Pashley, 1986; Busato *et al.*, 2004; Calle-Cano *et al.*, 2015). Fue reportada por primera vez en África en 2016 y en dos años expandió su rango de distribución en la mayoría de los países de la zona del Sahara de este continente, entre ellos Ghana, Sur África, Nigeria, Benin y Togo (Goergen *et al.*, 2016; Cock *et al.*, 2017; Nayyar *et al.*, 2021). La invasión de *S. frugiperda* a el hemisferio oriental, se sugiere que ocurrió por movimiento de material vegetal contaminado (con huevos o larvas) de híbridos entre los dos biotipos, desde los Estados Unidos al continente africano ya que sus poblaciones fueron comparadas con secuencias del insecto de diversos países del mundo, encontradas en el Genbank y Bold y (Cock *et al.*, 2017). No obstante, recientes investigaciones ponen en duda el origen de *S. frugiperda* en el Hemisferio Oriental, argumentando que la invasión la generó poblaciones del biotipo de maíz (Yainna *et al.*, 2022; Fiteni *et al.*, 2022). Entre los años de 2018 y 2019, *S. frugiperda* fue reportada en India y rápidamente se propagó a países del Pacífico asiático incluyendo a Corea, Japón y Australia en menos de un año (Nayyar *et al.*, 2021). La capacidad de migración del insecto, no solo se debe a la capacidad de dispersión de los adultos, sino también a su polifagia, permitiendo una rápida adaptabilidad a nuevos hábitats (Nayyar *et al.*, 2021).

Estudios relacionados con la fisiología y la genética de los biotipos de *S. frugiperda* fueron llevados a cabo en Estados Unidos, puesto que, al coleccionar larvas del insecto de cultivos de maíz y arroz, y al mantenerlas en una colonia en condiciones de laboratorio, Pashley (1986) noto que su ciclo de vida era diferente, al igual que su comportamiento de alimentación dependiendo del hospedero, por ello empleo los marcadores bioquímicos de aloenzimas y encontró que el biotipo (maíz) presentaba las esterasas B, C y D, mientras que el biotipo (arroz) presentaba las esterasas E y F. Posterior a la identificación bioquímica con aloenzimas, realizada por esta autora, otros marcadores fueron utilizados para caracterizar las poblaciones de los biotipos del insecto, molecularmente. Entre ellos se encuentran: una PCR-RFLP con la enzima *MspI* que genera cortes en el gen del citocromo oxidasa I (*COI*) produciendo dos fragmentos digeridos de 497 pb y 72 pb en el biotipo maíz y ninguna digestión en el biotipo arroz (Levy *et al.*, 2002; Vélez-Arango *et al.*, 2008). Adicionalmente, pueden ser diferenciados con una PCR de una región

en tándem del ADN nuclear denominada FR (“for rice strain”, biotipo arroz) que produce amplificaciones de peso molecular mayores a 500 pb en el biotipo arroz y de 0 a 3 bandas por debajo a las 500 pb en el biotipo maíz (Nagoshi y Meagher, 2003 a, 2004). Otro marcador más utilizado hoy en día, para la identificación de los biotipos, está basado en la secuenciación del gen *TPI* (Triosa fosfato isomerasa) que es un gen ligado al cromosoma Z por lo que se detecta más fácilmente en hembras (Nagoshi y Meagher 2004; Yannina *et al.*, 2022). Este gen produce unas amplificaciones en el biotipo de maíz diferentes a las amplificaciones en el biotipo de arroz, y adicionalmente puede ser secuenciado. Por ello, se ha usado en combinación con los marcadores de PCR RFLP del gen *COI* y las amplificaciones del gen *FR* (Nagoshi y Meagher, 2004) para la identificación molecular de los biotipos del insecto. Este último trabajo se basó en la estandarización de unos microsatélites en *S. frugiperda* de poblaciones de los Estados Unidos, que incluyeron a Texas, Mississippi y también a Puerto Rico y Brasil puesto que estos marcadores, presentan una alta variabilidad genética y permiten estudiar la migración actual del insecto.

Respecto a los estudios de filogeografía realizados con genes mitocondriales (*COI*, *COII*, *ND1*) y nucleares (*ITS-1*) en poblaciones del insecto de los Estados Unidos y Brasil (Lewter *et al.*, 2006; Nagoshi *et al.*, 2006; Nagoshi *et al.*, 2007 a y b; Nagoshi y Meagher, 2008; Nagoshi *et al.*, 2008). Lewter *et al.*, (2006), encontraron con el uso un fragmento de 608 pb de los genes mitocondriales *COI* tRNA-leu *COII*, empleado que 71 individuos de *S. frugiperda* colectados en los estados de Arkansas, Florida, en Los Ángeles y Mississippi (Estados Unidos) se diferenciaron en siete haplotipos, tres de ellos pertenecientes al biotipo de maíz (C1, C2 y C3) y cuatro al de arroz (R1, R2, R3 y R4). Lewter *et al.* (2006), además encontraron que las poblaciones de biotipos de Arkansas y Florida estaban estructuradas genéticamente ($F_{ST} = 0.493$, $p < 0.001$) por lo que sus poblaciones no alcanzan a estar en contacto en los periodos de inmigración del insecto durante el invierno. Nagoshi *et al.* (2007 a) posteriormente, secuenciaron el gen mitocondrial *COI* a partir de muestras de larvas y adultos colectadas en Brasil Texas y Florida. Ellos utilizaron 73 individuos para realizar un análisis filogeográfico y encontraron que la distribución de los haplotipos no muestra especificidad hacia las plantas hospederas (maíz, sorgo, algodón y pastos), como tampoco por las estaciones en las que fueron muestreados, por lo que este bajo número de individuos no permitió establecer la asociación a las plantas hospederas de maíz y arroz en las que se encuentran sus biotipos.

Posteriormente, estudios de secuenciación de poblaciones de *S. frugiperda* se han realizado en otros continentes, incluyendo países del África, Asia y Australia (Goergen *et al.*, 2016; Cock *et al.*, 2017; Nagoshi *et al.*, 2019; Acharya *et al.*, 2021) demostró que hoy en día la secuenciación del gen *COI* y de un nuevo gen identificado por Nagoshi *et al.* (2010) ligado al cromosoma sexual X, el gen *TPI* son los más adecuados para la identificación de los biotipos de *S. frugiperda* en el mundo, esto dado que permiten realizar rastreos de movimientos de poblaciones entre

diferentes países al emplear las bases de datos existentes en el Genbank (Yainna *et al.*, 2021). Hoy en día, se conoce que, esta plaga ya se encuentra distribuida en el mundo entero por lo que la necesidad de encontrar una estrategia de manejo cada día es más urgente. Dentro de los trabajos más recientes realizados en el insecto, se encuentran un estudio sobre la evolución y proceso de adaptación de los biotipos de *S. frugiperda* a sus hospederos con el uso de la genómica de sus poblaciones (Fineti *et al.*, 2022), con ello, los investigadores encontraron que la mayoría de genes que explican la asociación de los biotipos a los cultivos de maíz y arroz, se encuentran en el cromosoma sexual Z, además ellos aseguran que la evolución del aislamiento reproductivo del insecto se encuentra explicada por la existencia de tres genes que se encuentran en los cromosomas 12, 24 y 29 (cromosoma sexual). Finteni *et al.* (2022) adicionalmente concluyeron que la asociación de los biotipos de maíz y arroz a estos hospederos explica su gran diferenciación genética, por lo que la adaptación a éstos, es la base de su proceso de especiación. Estas conclusiones se obtuvieron de un análisis de componentes principales (PCA) basado en la comparación de genomas de *S. frugiperda* (de poblaciones del hemisferio occidental y oriental). Otro trabajo reciente realizado por Yainna *et al.* (2022) demostró que el origen de *S. frugiperda* en el hemisferio oriental pudo haber sido múltiple (y por individuos del biotipo de maíz), por lo que la especie pudo encontrarse en el África antes de 2016, no obstante, el insecto no tenía altas densidades poblaciones, antes del año 2016, los autores concluyeron que, con el tiempo, las poblaciones del insecto se incrementaron rápidamente en este continente. Para ello, estos autores realizaron comparaciones de genomas de *S. frugiperda* de poblaciones del hemisferio occidental (México, Guyana Francesa, Estados Unidos, Guadalupe, Brasil) y del hemisferio oriental (Benin, Ugya, India, China, Malawi) y encontraron que el genoma del biotipo de maíz es el más frecuente y que se subdivide en dos grupos mitocondriales, uno de ellos se asocia al genoma de una población de México, además observaron que los genomas de ambos biotipos se distribuyen de manera simpátrica en todo el mundo, por lo que soporta la teoría de especiación simpátrica en la especie. Adicionalmente, en el año 2017 se produjo, la primera publicación de las secuencias genómicas de los biotipos de maíz y arroz de este insecto con las que se logró determinar su tiempo de divergencia de 2 millones de años (Gouin *et al.*, 2017), demostró que los análisis genómicos están produciendo una información más rápida y certera de la evolución de este insecto.

La primera identificación molecular de los biotipos de *S. frugiperda* realizado en Colombia en poblaciones del insecto del departamento del Tolima y un análisis de asociación a sus plantas hospederas se llevo a cabo desde el año 2005. Para la realización de esta investigación, se empleó una PCR-RFLP del gen mitocondrial de la Citocromo Oxidasa I (*COI*) y una PCR de la región en tándem *FR* (For Rice) evidenciando que el biotipo de maíz se encuentra con mayor frecuencia en los cultivos de maíz, seguido de algodón y sorgo y que el biotipo de arroz, se encuentra con mayor frecuencia en arroz, seguido de maíz, algodón y sorgo (Vélez-Arango *et al.*, 2008). En este trabajo, igualmente se comprobó que hay una diferenciación poblacional

significativa, indicó que presentan un bajo flujo genético entre los cultivos de maíz, sorgo y algodón con respecto a los cultivos de arroz ($\Phi_{PT} = 0.41$, $p < 0.001$ para *COI*, $\Phi_{PT} = 0.19$, $p < 0.001$ para *FR*), posiblemente por diferencias en el comportamiento de oviposición de las hembras dependiendo del hospedero (Saldamando y Vélez-Arango, 2010).

En un segundo trabajo, se llevo a cabo un análisis de la filogeografía de *S. frugiperda*, con el uso de la secuenciación parcial del gen mitocondrial de la Citocromo Oxidasa I (*COI*) con el uso de 102 larvas colectadas en cultivos de maíz, algodón, sorgo, y arroz en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta y Tolima. Salinas-Hernández y Saldamando (2011) encontraron que, los individuos secuenciados se distribuyen en 43 haplotipos, siendo los haplotipos 1 y 4 los más frecuentes y colectados en cultivos de maíz, algodón y sorgo, por lo que representaron al biotipo de maíz de esta polilla. Por otro lado, se encontró que hay diferenciación genética entre las poblaciones de este insecto de Colombia y Estados Unidos puesto que un análisis de varianza molecular AMOVA, calculó un valor de $F_{ST} = 0.7681$ con $p < 0.0001$.

En el tercer estudio sobre la identificación de biotipos de este insecto fue realizado por Cano-Calle *et al.* (2015). En esta investigación, los autores ampliaron el trabajo realizado por Vélez-Arango *et al.* (2008) puesto que incluyeron muestras del insecto en los departamentos donde genera más pérdidas económicas (Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca). Cano-Calle *et al.* (2015) utilizaron los mismos marcadores estandarizados previamente por Vélez-Arango *et al.* (2008) y analizaron 348 larvas colectadas en los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca, en cultivos de maíz, algodón, sorgo, caña de azúcar y arroz. En este estudio se encontró que los biotipos, presentaron una diferenciación genética significativa ($\Phi_{PT} = 0.376$, $gI = 13,370$, $p < 0.001$, para el gen *COI*, $\Phi_{PT} = 0.50$, $gI = 13,354$, $p < 0.001$, para el gen *FR*), por lo que el flujo genético entre éstos es bajo. Las dos poblaciones de estos biotipos se encontraron en todos los departamentos muestreados, no obstante, el biotipo de maíz se encontró asociado al maíz, algodón sorgo y caña de azúcar, mientras que el biotipo de arroz al arroz y pastos demostró que la asociación al hospedero se presenta de manera ubiquita.

1.2 *Spodoptera frugiperda* investigaciones sobre la genética del insecto realizadas en Colombia

Como se mencionó con anterioridad, *S. frugiperda* es una especie polífaga, por lo que su capacidad de dispersión es muy amplia debido a que se alimenta de una gran cantidad de hospederos, alrededor de 350 especies de plantas, (Montezano *et al.*, 2018). En Colombia, la mayoría de las investigaciones realizadas en este insecto han sido enfocadas en estudios relacionados con la mejora de su control. Sin embargo, estudios llevados a cabo desde el año 2005, en la línea

de investigación “Ecología y Evolución de Insectos” del grupo Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB, se enfocaron en estudiar su genética de poblaciones y en general la evolución de la especie, dados los hallazgos encontrados en los Estados Unidos por Pashley Prowell desde 1986.

Para la ejecución de las investigaciones, se llevo a cabo un estudio sobre la identificación molecular de los biotopos de maíz y arroz de *S. frugiperda*, desde el año 2005 hasta el 2007, en el departamento del Tolima. En este departamento, se realizaron colectas al azar de larvas de diferentes estadios, en los cultivos de maíz (*Zea mays L.*), algodón (*Gossypium hirsutum*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum spp.*), sorgo dulce (*Sorghum bicolor (L.) Moench*) y en algunos casos pasto mulato (*Brachiaria hibrida cv. Mulato II*). Posteriormente, en otra investigación realizada desde 2008 hasta 2012, se colectaron de nuevo larvas, en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca, en los mismos cultivos mencionados con anterioridad, pero en Antioquia solo se muestreo en cultivos de maíz y en el Valle del Cauca se incluyó el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Las larvas fueron escogidas dado que su capacidad de dispersión es baja comparada con sus adultos, por lo que en análisis de asociación a su planta hospedera tendría más veracidad, por ello, los muestreos se produjeron en los tejidos vegetales de hojas y cogollos, dependiendo del cultivo (Vélez-Arango *et al.*, 2008; Saldamando y Vélez-Arango, 2010).

Para la tesis de Maestría de Ana María Vélez-Arango, se emplearon las larvas colectadas, durante los años 2006 y 2007, y se llevo a cabo la primera investigación sobre la genética de *S. frugiperda*, en el departamento del Tolima. Para ello, se muestrearon diversas fincas en las que se producían cultivos de maíz, algodón, sorgo y arroz y a partir de las mismas se realizaron análisis moleculares. Esta tesis origino dos artículos: Vélez-Arango *et al.* (2008) y Saldamando y Vélez -Arango (2010). Adicionalmente, para el desarrollo de esta tesis, las larvas de este insecto fueron enviadas al laboratorio de biología molecular y previo al análisis genético fueron identificadas con el uso de claves taxonómicas, usando diferentes caracteres morfológicos diagnóstico de *S. frugiperda* (Todd y Poole 1980). En el trabajo de Vélez-Arango *et al.* (2008), se estandarizó la metodología de extracción del ADN de las larvas del insecto, siguiendo un protocolo de CTAB. Estos autores, además demostraron la utilidad del uso de la combinación de los marcadores de PCR-RFLP del gen del citocromo oxidasa I, *COI* y la PCR del gen nuclear *FR* (For Rice) para la identificación de los biotipos de esta especie. Los resultados del análisis molecular obtenidos fueron comparados con los trabajos de Nagoshi y Meagher (2003, 2004). También comprobaron que la PCR RFLP del gen mitocondrial *COI* produjo digestiones de ADN de un fragmento de 569 pb en dos fragmentos de 497 pb y 72 pb generados con la enzima de restricción *MspI* identificando individuos pertenecientes al biotipo de maíz exclusivamente (figura 1.1), y corroborando los resultados de Levy *et al.* (2002), Nagoshi y Meagher (2003 a) al producir los mismos productos de amplificación y digestión. Por otro lado, los cebadores *FRa-FR2* de la región en tandem *FR* del ADN nuclear produjeron una escalera de

bandas electroforéticas por encima de los 500 pb en muestras larvales que fueron identificadas como biotipo de arroz (figura 1.2).

Figura 1.1 Amplificación de los productos de PCR-RFLP del gen mitocondrial *COI* (569 pb) y sus respectivas digestiones con la enzima de restricción *MspI* (497 pb). M: Marcador de Peso Molecular, líneas 1, 2, 5 y 6: biotipo de maíz (presentan digestión), líneas 3, 4, 7 y 8: biotipo de arroz (no presentan digestión), C-: Control Negativo, C+: Control Positivo (Tomado de la tesis de Maestría de Ana María Vélez-Arango).

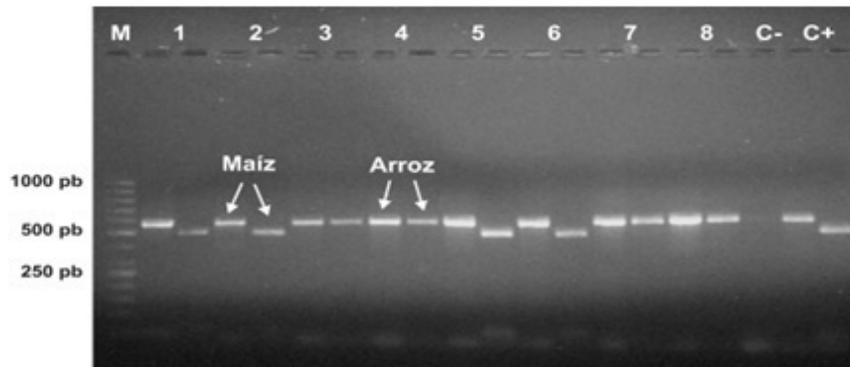
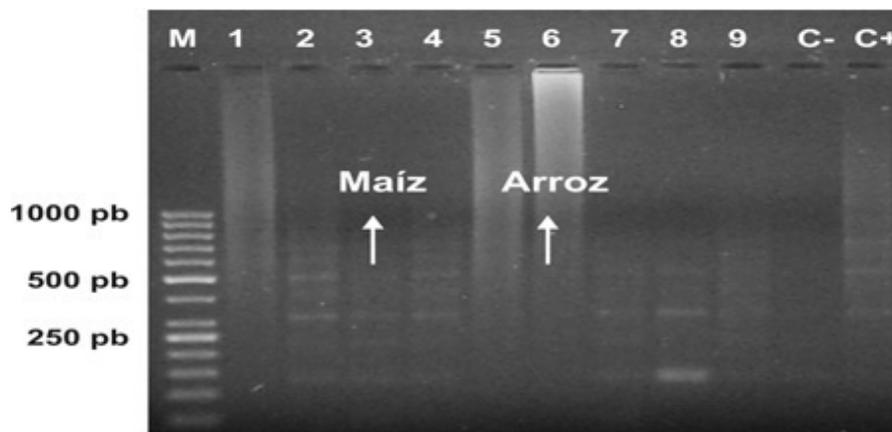


Figura 1.2 Amplificación de los productos de PCR de la región FR del ADN nuclear. M: Marcador de Peso Molecular, líneas 1, 5 y 6: biotipo de arroz (fragmentos por encima de 500 pb), líneas 2, 3, 4, 7, 8 y 9: biotipo de maíz (fragmentos menores a 500 pb), C-: Control Negativo, C+: Control Positivo. (Tomado de la tesis de Maestría de Ana María Vélez-Arango).



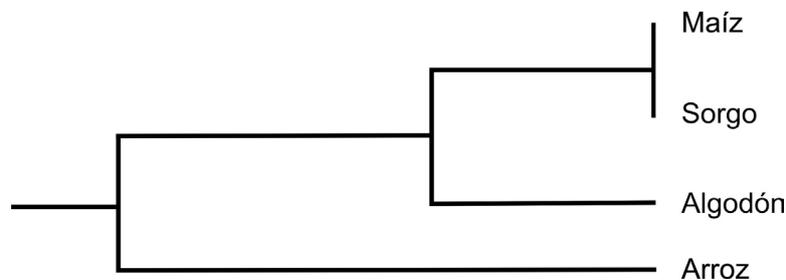
Vélez-Arango *et al.* (2008) además encontraron una asociación de los biotipos de *S. frugiperda* por cultivo, ya que el biotipo de maíz se encontró principalmente en los cultivos de maíz, algodón y al sorgo y el biotipo de arroz, en el cultivo de arroz (Tabla 1.1). Para demostrar esta distribución de biotipos por hospedero, se realizó una prueba de independencia o tabla de contingencia (prueba chi cuadrado) que se emplea cuyo los datos analizados a evaluar se encuentran diferenciados en categorías, y en este caso, las categorías eran constituidas por los biotipos del insecto y por cada cultivo donde fueron colectados (Vélez-Arango *et al.*, 2008; Saldamando y Vélez-Arango, 2010). Esta prueba fue estadísticamente significativa, según los resultados obtenidos en la tabla de contingencia, por lo que el biotipo de maíz muestra asociación a tres

cultivos y el de arroz a un cultivo principalmente. Además, se logró identificar individuos híbridos entre los biotipos, indicó que ambos se cruzan en la naturaleza, especialmente los cruces ocurren entre las hembras del biotipo de arroz con machos del biotipo de maíz, dados los valores de los híbridos clasificados como +/+.

Tabla 1.1. Tablas de contingencia para los marcadores moleculares *COI*, *FR* y los dos marcadores en conjunto para determinar distribución diferencial de los biotipos de *S. frugiperda* y sus híbridos en los cultivos de maíz, algodón, sorgo y arroz. (Tomado de Tesis de Maestría de Ana María Vélez Arango).

Biotipo por Marcador	Cultivo				Total	χ^2	GI
	Maíz	Algodón	Sorgo	Arroz			
Marcador COI							
Maíz	80	57	31	11	179	63.5*	3
Arroz	22	10	6	36	74		
Marcador FRa							
Maíz	64	55	31	16	166	34.61*	3
Arroz	38	12	6	31	87		
Marcadores COI + FRa							
Maíz	60	48	28	7	143	76.64*	9
Arroz	17	3	3	26	49		
Híbrido ++	21	9	3	4	37		
Híbrido —	4	7	3	10	24		

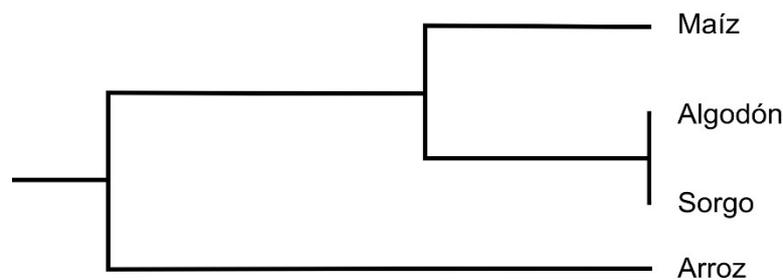
Figura 1.3 Dendrograma basado en la distancia genética de Nei con el método de UPGMA para el marcador *COI*. (Tomado de la tesis de Maestría de Ana María Vélez Arango).



Esta misma asociación de los biotipos por planta hospedera, se logró observar en un análisis adicional para demostrar la distribución de los biotipos por cultivo, producido por los dendrogramas UPGMA con distancias de Nei, (figura 1.3, 1.4). Ya que el biotipo de maíz se encontró agrupado en los cultivos de maíz, algodón y sorgo y el biotipo de arroz agrupado dentro del cultivo de arroz. Sin embargo, las topologías de ambos dendrogramas son diferentes, debido a que en el primero (del marcador *COI*) se asocian más cercanamente las larvas colectadas en maíz y sorgo y después algodón y en el segundo (del marcador *FR*), las larvas colectadas en algodón y sorgo y después en maíz.

Los dendrogramas que aparecen en las publicaciones de Vélez -Arango *et al.* (2008) y Saldamando y Vélez-Arango, (2010) se basaron en los resultados de la tesis de Ana María Vélez en la cual se emplearon las distancias genéticas de Nei para cada marcador molecular (en este caso *COI* y *FR*) y entre poblaciones pareadas. Estas distancias de Nei pueden ser utilizadas en marcadores moleculares binomiales, como los empleados por estos autores y también en caracteres multinomiales como lo son los marcadores de microsatélites (Hedrick 2005; Peakall y Smouse, 2006). Las distancias posteriormente, se utilizaron para generar unos dendrogramas de distancias UPGMA basados en las distancias aritméticas ponderadas entre poblaciones (Nei y Kumar, 2000). Estos árboles reflejan la cercanía genética entre las poblaciones evaluadas y en los análisis realizados con los biotipos de *S. frugiperda* es claro que el biotipo de maíz se encuentra distribuido en los cultivos de maíz, algodón y sorgo, mientras que el biotipo de arroz, en cultivos de arroz.

Figura 1.4 Dendrograma basado en la distancia genética de Nei con el método de UPGMA para el marcador *FR*. (Tomado de la tesis de Maestría de Ana María Vélez Arango).



Adicionalmente, un trabajo posterior, basado en la tesis de Maestría de Daniela Cano Calle, se llevo a cabo un estudio sobre la identificación de los biotipos de *S. frugiperda* en otros departamentos de Colombia, con el fin de evaluar si ambos tenían una distribución ubicuita en el país y en los mismos cultivos como lo encontrado en el departamento del Tolima. Esta tesis origino el artículo de Cano-Calle *et al.* (2015) en el que se emplearon aproximadamente 238 larvas del insecto colectadas en cultivos de maíz, algodón, sorgo, caña de azúcar y arroz originarias de los departamentos de Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca (que fueron colectadas durante los años 2008 al 2011) para los análisis moleculares. Ellos realizaron una extracción de ADN con el método CTAB larvas del insecto, basados en el protocolo de Vélez-Arango *et al.* (2018). Posteriormente, emplearon los marcadores moleculares PCR -RFLP del gen del citocromo oxidasa I (*COI*) y del gen *SacI* y una PCR del gen *FR* molecular basados en los trabajos previos de Vélez-Arango *et al.* (2008). Además, utilizaron el marcador *SacI* en casos donde la amplificación del gen *FR* no se pudo realizar, por lo que lograron identificar los biotipos con un método adicional al empleado por Vélez-Arango *et al.* (2008). Con el fin de realizar una prueba estadística para demostrar la asociación a la planta hospedera para cada biotipo, Cano -Calle *et al.* (2015) también realizaron una tabla de contingencia, la cual generó resultados significativos,

en cuanto a la distribución de los biotipos de maíz y arroz por cultivo, corroborando el trabajo previo realizado en el departamento del Tolima. Además, evidenciaron que el biotipo de maíz también se alimenta de los cultivos de caña de azúcar del departamento del Valle del Cauca, lo cual es un resultado novedoso puesto que fue el primer reporte de asociación de este biotipo en este cultivo (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Tabla de contingencia para los marcadores moleculares *COI*, *FR* y los dos marcadores en conjunto para determinar la distribución diferencial de los biotipos e híbridos de *S. frugiperda* en los diferentes cultivos (Tomado de la tesis de Maestría de Daniela Cano Calle).

Marcador COI	Maíz	Arroz	Sorgo dulce	Pasto	Algodón	Sorgo	Caña	P
Maíz	91	22	24	7	16	56	19	<0.0001
Arroz	14	29	0	28	11	4	2	
Marcador Fr-a/SacI								
Maíz	123	21	24	7	17	54	21	<0.0001
Arroz	6	30	0	27	10	6	0	
Marcadores en conjunto								
Maíz	117	20	24	7	17	54	19	<0.0001
Arroz	6	21	0	27	9	3	0	
Híbrido (++)	1	6	0	0	0	3	0	
Híbrido (—)	7	4	0	0	1	0	2	

Figura 1.5 Dendrograma basado distancias pareadas de F_{ST} y el algoritmo UPGMA para el marcador COI. (Tomado de la tesis de Maestría de Daniela Cano Calle).

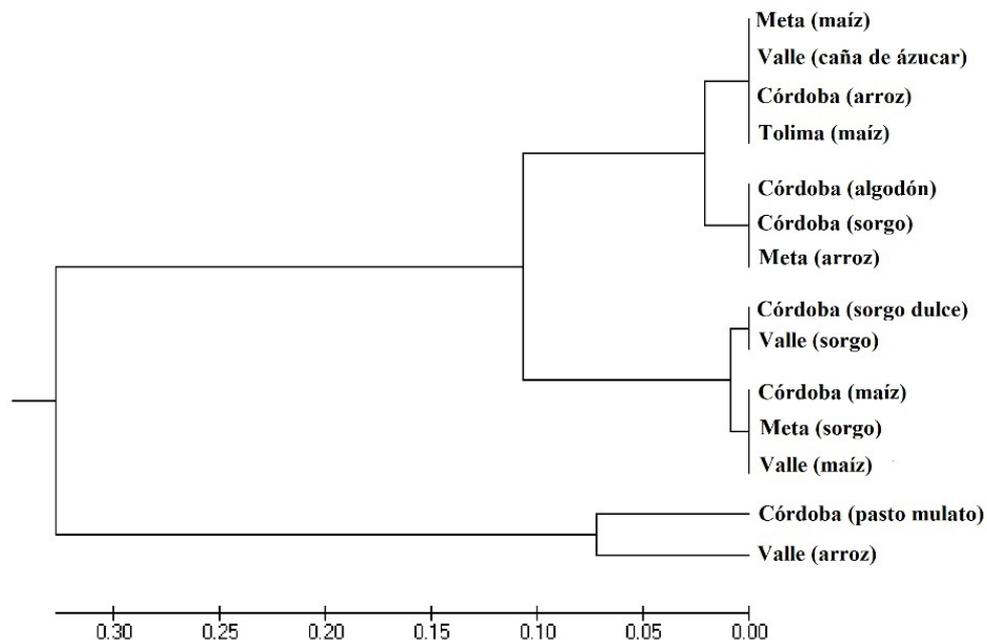
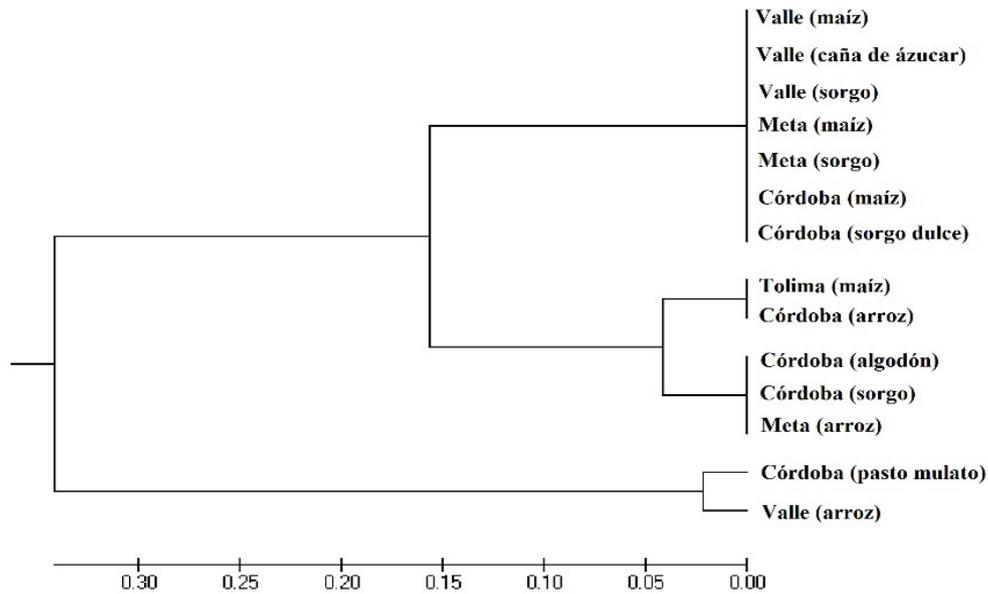


Figura 1.6 Dendrograma basado en distancias pareadas de F_{ST} y el algoritmo UPGMA para el marcador FR. (Tomado de la tesis de Maestría de Daniela Cano Calle).



Adicionalmente, Cano-Calle *et al.* (2015) también estimaron unos dendrogramas UPGMA y la distancia de F_{ST} con los dos marcadores moleculares mencionados y corroboraron los resultados de Vélez-Arango *et al.* (2008) (figura 1.6, 1.7) puesto que mostraron claramente la asociación de cada biotipo a los hospederos y los departamentos muestreados, por lo que, en Colombia, el biotipo de maíz se encuentra más abundantemente en cultivos de maíz, algodón, sorgo y caña de azúcar y el biotipo de arroz, principalmente en arroz y pastos. En el estudio realizado por Cano -Calle *et al.* (2015), se emplearon los valores de distancias de F_{ST} pareadas como reemplazo del uso de las distancias de Nei debido a que mostraron con mayor claridad las diferenciaciones genéticas halladas en las poblaciones de *S. frugiperda* en los diversos cultivos muestreados en Colombia.

En las tesis de Ana María Vélez y Daniela Cano, se realizaron estimaciones de análisis de varianza molecular (AMOVA) para los dos marcadores moleculares evaluados, y para este tipo de pruebas AMOVA, se requiere estimar la variación genética al interior de una población, entre poblaciones y en la población total (Peakall y Smouse, 2006). Sin embargo, debido al carácter binario de los marcadores *COI* y *FR* para cada biotipo, no fue posible estimar la variabilidad genética dentro de las poblaciones de los biotipos, debido a que solo muestran bandas de digestión o amplificación de presencia y/o ausencia por biotipo. Por ello, la prueba AMOVA y sus resultados se mostrarán con mayor énfasis en este libro, en el trabajo de tesis de Haidy Salinas Hernández, quien analizó secuencias del gen *COI* en muestras de *S. frugiperda*.

En general y desde el punto de vista agronómico, los resultados obtenidos sobre la asociación de los biotipos de *S. frugiperda* a los cultivos analizados en estas dos tesis de Maestría, puede

deberse a que, en Colombia, la producción de cultivos de maíz, algodón, arroz y sorgo implica una rotación que se realiza en cada semestre para evitar la sincronía entre el ciclo de vida de las plagas (en particular *S. frugiperda* y *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera, Gellechidae)) y sus hospederos. En el primer semestre del año, en Colombia, se producen los cultivos de maíz, sorgo y arroz en los departamentos del Tolima y Valle del Cauca y algodón en Córdoba y Meta. En el segundo semestre, el algodón se siembra en el Tolima y Valle del Cauca y los otros cultivos se producen en Córdoba y Meta, a excepción del algodón en el Tolima (Vélez-Arango *et al.*, 2008). En el Valle del Cauca, el cultivo de caña de azúcar es sembrado en ambos semestres del año ya que es el principal cultivo producido en este departamento de Colombia y por ello, se cree que el biotipo de maíz se encontró asociado a esta planta hospedera principalmente, debido a la ausencia de los otros cultivos en esta zona del país (Cano-Calle *et al.*, 2015). La rotación de cultivos, por ende, genera la necesidad de dispersión de los biotipos de *S. frugiperda* en los cultivos en los que fueron identificados dados los cambios en su oferta alimenticia. No obstante, el insecto es polífago, por lo que más plantas hospederas pueden ser una nueva alternativa de alimentación y oviposición de las hembras de sus poblaciones.

Por otro lado, alternativamente a los estudios sobre la identificación de los biotipos de *S. frugiperda* en Colombia, un artículo realizado por Salinas-Hernández y Saldamando (2011), se basó en un análisis filogeográfico de la especie por medio de una secuenciación parcial del gen del citocromo oxidasa I, *COI*. Un análisis de filogeografía se enfoca en evaluar la diferenciación genética de las poblaciones naturales de una especie y determinar si un evento geográfico influyó en dicha diferenciación y para ello se evidencian eventos geológicos y relaciones de ancestría entre los miembros de las poblaciones de una especie (Freely, 2005). Este tipo de análisis generalmente emplean secuencias parciales de genes mitocondriales en insectos y genes nucleares en plantas dada su herencia materna, por lo que el efecto de la recombinación genética no influye en su variación genética y permite realizar un estudio detallado de los patrones migratorios de las poblaciones y sus orígenes de manera matrilineal (Freely, 2005; Hedrick, 2004). Con la filogeografía se puede determinar la variación genética de una población con el uso de estimadores como el número de haplotipos (h), la diversidad haplotípica (H_d), el número de sitios segregantes (S), el polimorfismo nucleotídico (π), la diversidad nucleotídica (Θ), el tamaño efectivo de una población (N_e), y a su vez determinar si una población sufrió de contracción, expansión reciente después de un efecto de cuello de botella o si su tamaño permanece constante con el test de Tajima (Nei y Kummar 2000; Freely 2005). Todos los estimadores mencionados, reflejan diferentes maneras de evaluar la variabilidad genética de una población teniendo en cuenta los cambios mutacionales de los cuatro nucleótidos (A, T, C, G), en un sitio polimórfico, los cambios de los sitios segregantes (S) que tienen relación con los cambios mutacionales relacionados con el promedio de cambios nucleotídico por secuencia (k), la identificación de un haplotipo (h) que se refiere a una secuencia única compartida por varios individuos de una misma población, los polimorfismos, diversidad nucleotídica y

el tamaño efectivo de la población que son dos estimadores relacionados entre sí, al tener en cuenta la proporción de cambios nucleótidos en la secuencia y en la muestra poblacional (Nei y Kumar, 2000). Todos estos estimadores, como la teoría básica de la filogeografía, se basan en el principio evolutivo de coalescencia, la cual permite realizar un análisis histórico de la evolución de una población al determinar las relaciones de sus individuos con el ancestro común más reciente (MRCA) a través de un rastreo de los alelos que comparten en común los ancestros y descendientes y por ello el uso de las secuencias de herencia materna o paterna son fundamentales (Freely, 2005). Adicionalmente, un análisis filogeográfico puede incluir evaluaciones de la diferenciación genética entre las poblaciones (AMOVA) cuyos individuos fueron secuenciados con uno o varios genes mitocondriales, ya que con una secuenciación se tiene en cuenta la variación en cuatro nucleótidos (A, T, C, G), es decir se asume un gen con cuatro alelos para cada posición nucleotídica de la secuencia, dentro, entre y en la población total (Excoffier *et al.*, 1992).

Para la realización del análisis filogeográfico, Salinas-Hernández y Saldamando (2011), utilizaron 102 larvas de *S. frugiperda* fueron colectadas en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Meta, Tolima y Valle del Cauca de cultivos de maíz, algodón, arroz y sorgo entre los años 2008 y 2011. Ellas usaron la misma metodología de extracción de ADN generada por Vélez-Arango *et al.* (2008) y compararon las secuencias de este insecto con 9 secuencias almacenadas en el Genbank pertenecientes a los Estados Unidos. En sus resultados lograron diferenciar 43 haplotipos, de los cuales el haplotipo 1, fue el más abundante y represento al biotipo de maíz puesto que estas larvas fueron colectadas en maíz, algodón y sorgo Por otro lado, al realizar un análisis de varianza molecular (AMOVA) para comparar las secuencias de Colombia vs Estados Unidos, se encontró que, las poblaciones de ambos países eran genéticamente diferentes y significativas, por lo que están estructuradas y no hay flujo genético entre ellas puesto que su valor de $F_{ST} = 0.7681$ ($p < 0.0001$) (Salinas-Hernández y Saldamando Benjumea, 2011)

Los estimadores de diversidad genética del insecto obtenidos por Salinas -Hernández (2011) muestran que el número de haplotipos encontrados para *S. frugiperda* es alto ya que se obtuvieron 43 haplotipos en 102 muestras de secuencias del gen *COI*. Igualmente, los estimadores de diversidad haplotípica, sitios segregantes y diversidad y polimorfismo nucleotídicos fueron altos, demostró la rápida variación genética del gen *COI* en esta polilla.

Respecto a los cambios en la densidad de las poblaciones de *S. frugiperda* según las secuencias analizadas, los resultados de la prueba de neutralidad de Tajima-Nei mostraron que las poblaciones del insecto del departamento de Antioquia se encuentran en un proceso de expansión reciente ya que su valor del test de Tajima D, fue negativo (-1.7) y significativo ($p < 0.0001$). Mientras que las demás poblaciones de los otros departamentos permanecieron con tamaños

efectivos constantes (Nei y Kumar, 2000). Este tipo de análisis se basan en la estimación del parámetro D , el cual relaciona las variables del polimorfismo nucleotídico (Θ) y la diversidad nucleotídica (π), de tal manera que si $D < 0$, las poblaciones evaluadas se encuentran en un proceso de expansión reciente después de un posible cuello de botella, si $D > 0$, se encuentran bajo contracción reciente y $D = 0$, de tamaño constante (Nei y Kumar, 2000). Puesto que el valor de D en Antioquia es negativo y significativo, se puede suponer que las poblaciones de *S. frugiperda* de este departamento de Colombia, se encuentran en un proceso de expansión reciente (Salinas-Hernández y Saldamando, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, los marcadores moleculares utilizados en el trabajo de Vélez-Arango *et al.* (2008), Saldamando y Vélez-Arango (2010) y Cano-Calle *et al.* (2015) son más útiles para la identificación de los biotipos que para el análisis genético de una población, ya que no proporcionan información sobre la variación genética dentro de cada biotipo y en un análisis de varianza se requiere evaluar la variación total, entre y dentro de sus poblaciones (Freely, 2005). Sin embargo, estos marcadores fueron los más indicados para la identificación de los biotipos de *S. frugiperda* y la asociación a la planta hospedera que eran comúnmente utilizados entre los años 2002 a 2010. Otros marcadores como la secuenciación del gen mitocondrial *COI* (Salinas-Hernández y Saldamando -Benjumea, 2011) también se han empleado en poblaciones colombianas de *S. frugiperda* y fueron útiles para los estudios de genética poblacional, pero no permitieron la diferenciación de los biotipos ni la realización de análisis de asociación a plantas hospederas ya que solamente se secuenció un fragmento de casi 600 bp que corresponde a casi la mitad del tamaño total del gen mitocondrial *COI* (aproximadamente 1200 bp) (Nagoshi *et al.*, 2020).

En México, Rosas *et al.* (2016) utilizaron únicamente la técnica de PCR -RFLP del gen *COI* en muestras de *S. frugiperda* colectadas en cultivos de maíz de siete regiones geográficamente separadas en el país y lograron determinar que el 95% de las muestras pertenecían al biotipo de maíz y el 5% al biotipo de arroz. Estos resultados demuestran que este marcador molecular fue lo suficientemente útil para identificar los biotipos del insecto en este país, como lo que ocurrió en Colombia. Adicionalmente, Juárez *et al.* (2012) también utilizaron secuenciación parcial del gen *COI* y encontraron haplotipos de maíz y arroz, pero no encontraron la asociación de estos biotipos a ninguna planta hospedera donde se hicieron las colectas en países como Argentina, Brasil y Paraguay y en los cultivos de maíz, arroz, alfalfa y sorgo y pastos. No obstante, ellos no utilizaron un elevado número de muestras por cultivo (la genotipificación por cultivo fue de 9 a 15 individuos), por lo que este bajo muestreo impide realizar análisis estadístico que compruebe la asociación a planta hospedera y a su vez también realizaron un análisis parcial del gen *COI*. Por el contrario, tanto Vélez -Arango *et al.* (2008) como Cano-Calle *et al.* (2015) realizaron tablas de contingencia que sugieren una distribución diferencial de los dos biotipos de *S. frugiperda* en las siete plantas hospederas, con el biotipo de maíz presente principalmente

en maíz, sorgo, sorgo dulce, la caña de azúcar y el algodón, el arroz y el biotipo de arroz predominante en arroz y pastos y en menor proporción en los otros cultivos. Resultados similares fueron reportados por Prowell *et al.* (2004) en países como Estados Unidos, Honduras, Puerto Rico, Guyana Francesa, y algunas islas del Caribe, Busato *et al.* (2004) en Brasil, y Nagoshi *et al.* (2012) en Argentina. Prowell *et al.* (2004), y Nagoshi *et al.* (2012) utilizaron un amplio tamaño de la muestra para analizar la asociación a la planta hospedera en *S. frugiperda* en los biotipos de maíz y arroz a pesar de que todos ellos utilizaron diferentes marcadores moleculares. Un aspecto importante a tener en cuenta además del marcador molecular escogido para un estudio, es el tamaño de la muestra y el estadio del individuo de *S. frugiperda* para ser analizado, dado a que todos estos aspectos podrían afectar el resultado obtenido para determinar la asociación a planta hospedera. En los estudios hechos en Colombia por Vélez-Arango *et al.* (2008), Saldamando y Vélez-Arango (2010), Salinas-Hernández y Saldamando-Benjumea (2011) y Cano-Calle *et al.* (2015), todas las muestras de *S. frugiperda* consistieron en individuos en estadio larval ya que los adultos presentan una mayor habilidad de dispersión y existe una posibilidad considerable de que exista cambios de huésped debido a que en el país, los cultivos estudiados se siembran al lado unos de otros, y por lo tanto, todos ellos representan poblaciones simpátricas para el insecto.

En el caso de la secuenciación del gen *COI*, estudios posteriores demostraron que una amplificación completa o de mayor tamaño del fragmento permite identificar correctamente a los biotipos de este insecto (Nagoshi *et al.*, 2020) puesto que desde el año 2016, Goergen *et al.* (2016) evaluaron muestras larvales del insecto colectadas en Benin Nigeria, Sao Tome y Principe y Togo, encontró que la especie *S. frugiperda* se reporta por primera vez en este continente, al comparar sus secuencias con las bases de datos del insecto almacenadas en el Genbank. Más adelante, Cock *et al.* (2017) identificaron a *S. frugiperda* en Ghana y a su vez, encontraron que el patrón migratorio del insecto al África se debió a vuelos internacionales de Atlanta (Estados Unidos) al Oeste Africano (Nigeria) con material vegetal contaminado de huevos, pupas o adultos del insecto y también de vuelos internacionales de Brasil a Togo. Estos trabajos de secuenciación del ADN muestran la relevancia de la filogeografía, ya que permite realizar un rastreo del origen de la muestra al compararla con bases de datos, particularmente porque los genes mitocondriales presentan herencia materna. Por ejemplo, Nagoshi *et al.*, (2019) ampliaron el trabajo de Goergen *et al.* (2016) al incluir muestras larvales de otros países africanos como Burundi, Congo, Kenia y Tanzania y realizar secuenciaciones parciales del gen mitocondrial *COI* y del gen *TPI* (Triosafosfato Isomerasa), estos dos marcadores hoy en día representan los mejores marcadores diagnóstico para identificar los biotipos de *S. frugiperda*.

Nagoshi *et al.* (2019) identificaron los dos biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* y además lograron reportar que el flujo de la plaga provino desde la Florida (US). Adicionalmente, evaluaron las diferencias en la abundancia de los biotipos en el Centro, Este y Oeste del África

puesto que ambos biotipos (haplotipos) son igualmente abundantes en Tanzania y Congo (Centro del África), pero el biotipo de arroz es más abundante en Tanzania y Kenia (Este del África), mientras que en Togo y Sao Tomé (Oeste del África) el biotipo de maíz es más abundante que el de arroz. En América del Norte y del Sur, la frecuencia de los biotipos también difiere ya que el biotipo de maíz es más común que el de arroz. Finalmente, Acharya *et al.* (2021) también utilizaron los mismos marcadores de Nagoshi *et al.* (2019) y realizaron secuenciaciones de muestras larvales de *S. frugiperda* del África (Uganda, Tanzania, Congo, Zimbawe) y Asia (Corea, Vietnam, Nepal). Estos autores encontraron que, con los resultados de secuenciación del gen *COI*, el biotipo de arroz es más abundante que el biotipo de maíz en todos estos países y que ambos difieren en 10 sitios polimórficos. Mientras que con la secuenciación del gen *TPI* encontraron tres subpoblaciones del insecto que estuvieron compuestas por muestras mixtas de ambos biotipos. La variación genética de estos dos marcadores basados en estimadores de diversidad genética como número de haplotipos, sitios segregantes, polimorfismo nucleotídico y diversidad nucleotídica mostró en general que hay más variación genética en las poblaciones del Asia que del África, indicó que el origen de las poblaciones del Asia es el más reciente.

Recientemente, trabajos relacionados con la secuenciación de nueva generación en *S. frugiperda* han permitido la obtención del genoma completo de los biotipos del insecto, y a partir del mismo, se encontró que la especie tiene 29 cromosomas, y que los biotipos no han presentado una gran diferenciación genética, no obstante, la mayor diferenciación se encontró en el cromosoma sexual Z (Gouin *et al.*, 2017). Además, Gouin *et al.* (2017) determinaron que el tiempo de divergencia de los biotipos de *S. frugiperda* es de 2 millones de años, demostró que su evolución es reciente. Posteriormente, un trabajo realizado por Fiteni *et al.* (2022) encontró que tres genes están relacionados con la asociación de los biotipos a sus hospederos maíz y arroz y que estos se encuentran en los cromosomas 12, 14 y 29, siendo el cromosoma 29 representado por el cromosoma sexual y este tiene grandes implicaciones en la diferenciación genética entre los dos biotipos ya que secuencias del insecto de diversos países del mundo, incluidos países del hemisferio occidental y oriental, han mostrado tener altos valores de F_{ST} relacionados con este cromosoma. Adicionalmente, otro trabajo reciente de Yainna *et al.* (2021) también basado en análisis de la genómica poblacional de *S. frugiperda* demostró que el biotipo de maíz presenta dos linajes mitocondriales a nivel del gen *COI* y que el marcador *TPI* es más adecuado para la diferenciación de los biotipos. Otro aspecto interesante fue el encontrar que el genoma mitocondrial de este insecto indica múltiples invasiones del insecto al hemisferio oriental, mientras que el genoma nuclear un evento de invasión, particularmente del biotipo de maíz hacia esta parte del mundo. Estos autores también encuentran que diversos genes de los cromosomas 12, 14 y 29 juegan un papel importante en la diferenciación genética entre estos biotipos, siendo el cromosoma 29, el cromosoma sexual Z. Ellos también mencionan la importancia de los genes del citocromo P450 en la respuesta de resistencia del insecto a controles químicos, por lo que estudios futuros de anotación genómica y transcriptómica en este insecto deberán ser realizados en el futuro para la mejora del manejo de la plaga.

1.3 Conclusiones generales de la genética de poblaciones y filogeografía de *S. frugiperda*

Los análisis en genética de poblaciones son frecuentemente utilizados para determinar si existen fuerzas evolutivas afectó las poblaciones naturales (Hedrick, 2004, Freely, 2005). Estos análisis se basan en el uso de un marcador genético o fenotípico para determinar la variación de los alelos o fenotipos de las poblaciones naturales de una especie en campo, puesto que esta variación puede ser influenciada por el efecto de una selección natural que puede generar cambios en la frecuencia de los alelos de una población o de poblaciones de una misma especie por medio de la adaptación (Hedrick, 2004; Hartl y Clark, 1997). Esta adaptación puede ser generada por la relación existente entre plantas y hospederos, que en este caso son los insectos y dependiendo de su nivel de especialización, los insectos pueden presentar una asociación evidente con sus hospederos, por ello han sido denominados polífagos (se alimentan de plantas de diferentes familias o géneros), oligófagos (se alimentan de plantas de una misma familia o género) y monófagos (se alimentan de una misma especie o género) (Saldamando, 2016) esto implica que las poblaciones de los insectos pueden presentar diferentes niveles jerárquicos de diferenciación genética (Saldamando, 2010, 2016). En el caso de *S. frugiperda*, la especie ha divergido en dos biotipos que son idénticos en su estadio de larva pero que difieren en su fenotipo en los adultos, ya que la morfometría geométrica del ala ha demostrado que su forma y tamaño es distinta (ver próximo capítulo) (Cañas-Hoyos *et al.*, 2014). Los biotipos de este insecto, en Colombia, se diferenciaron en dos poblaciones, denominadas biotipo de maíz y de arroz basados en trabajos realizados previamente por Pashley (1986). El biotipo de maíz, se encontró en plantas de maíz, algodón, sorgo y caña de azúcar en mayor abundancia y el biotipo de arroz, en cultivos de arroz y pastos. Adicionalmente, se encontraron poblaciones híbridas entre estos dos biotipos, siendo las más frecuencias las poblaciones ++ que posiblemente se originaron de cruces entre hembras del biotipo de arroz con machos del biotipo de maíz, este tipo de cruzamiento fue posteriormente corroborado en estudios realizados con el insecto por Saldamando *et al.* (2014).

Para la identificación de estos biotipos, se emplearon los marcadores moleculares de PCR-RFLP de los genes mitocondriales *COI* y *SacI* y el gen nuclear *FR* en trabajos publicados por estudiantes de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín en los años 2008, 2010 y 2015. No obstante, en un trabajo realizado en 2011, se utilizó la secuenciación del gen *COI* para llevar a cabo un análisis filogeográfico de *S. frugiperda*. De estos trabajos, se puede concluir que los primeros marcadores fueron útiles para identificar los biotipos del insecto, además fáciles de estandarizar y económicos. Sin embargo, no fueron los mejores marcadores para realizar análisis de genética de poblaciones ya que no permiten realizar una evaluación de la variación genética al interior de una población. Hoy en día, se emplea con más frecuencia la

secuenciación de los genes *COI* y del gen *TPI* ya que existe información en bases de datos del Genbank de haplotipos del insecto de diversos países del mundo, donde se ha venido reportando la presencia del insecto, desde el año 2016 en el África y en Asia.

La distribución de los biotipos de *S. frugiperda* es muy amplia en Colombia, particularmente en los departamentos donde se cultivan los hospederos donde el insecto ha sido más reportado. Esta distribución y la asociación a las plantas hospederas no ha sido influenciada por la Cordillera de los Andes como barrera geográfica de dispersión poblacional. Además, no se ha reportado la influencia de una barrera geográfica en la evolución de estos biotipos a nivel mundial, por lo que la teoría de especiación que puede aplicarse a la evolución de estos biotipos implica que su diferenciación se dio en simpatria (Prowell, 1998). En Colombia, la secuenciación del gen *COI*, permitió concluir que las poblaciones que más se mueven en el país es el biotipo de maíz, no obstante, los haplotipos no presentaron una diferenciación genética influenciada por una barrera geográfica, por lo que el comportamiento de polifagia del insecto le permite invadir diferentes cultivos en el país y por lo tanto futuras investigaciones deberían enfocarse en identificar los biotipos de *S. frugiperda* en otros cultivos y en otras plantas hospederas secundarias.

Por otro lado, los análisis filogeográficos realizados en *S. frugiperda*, el estudio realizado en Colombia fue uno de los pioneros. No obstante, el tamaño del fragmento del gen *COI* secuenciado, no permitió la identificación de los biotipos del insecto. De todas formas, se logró concluir que el biotipo de maíz presenta más haplotipos y presenta una mayor dispersión en el país. Este gen junto con el gen *TPI* hoy en día son muy utilizados en diversos países del mundo, especialmente en África y Asia, para establecer el origen de sus muestras y determinar cómo ocurre la migración de esta plaga en estos dos continentes (Nagoshi *et al.*, 2010; Nagoshi *et al.*, 2019). Esto demuestra la importancia de la genética de poblaciones y de la filogeografía para monitorear los movimientos de las plagas y establecer nuevas estrategias de su manejo dependiendo de su acervo genético.

Respecto a la evolución de los biotipos, un trabajo realizado en el año 2017 por Gouin *et al.* (2017) se basó en el análisis de secuenciación de nueva generación del genoma completo de *S. frugiperda* con el uso de muestras colectadas en diversos países del mundo. Estos autores concluyeron que los biotipos de maíz y arroz, divergieron hace 2 millones de años. Esto significa que la evolución de estas poblaciones es reciente. Este tiempo de divergencia puede ser importante para los resultados obtenidos en los análisis de aislamiento reproductivo entre los biotipos de este insecto realizados en Colombia, ya que su aislamiento fue parcial (ver más adelante), además en las estrategias de manejo que requieren estas dos poblaciones puesto que representan dos entidades biológicas muy diferentes. Adicionalmente, es necesario el uso de la secuenciación de nueva generación o alto rendimiento para realizar análisis genómicos poblacionales de *S. frugiperda* en Colombia, debido a que estudios realizados por Gouin *et al.*

(2017), Fineti *et al.* (2022) y Yainna *et al.* (2022) han demostrado la relevancia de evaluar los genomas de los biotipos de maíz y arroz de la especie puesto que encontraron que su tiempo de divergencia es de 2 millones de años, por lo que su evolución es reciente, y que además tres genes están implicados en la asociación al hospedero y que se encuentran en los cromosomas 12, 14 y 29, siendo el cromosoma sexual Z uno de los más relevantes en la asociación a sus hospederos y a su diferenciación genética dado su aislamiento reproductivo.

En síntesis, los resultados relacionados con el uso de la biología molecular y de la genética de poblaciones ayudaron en la identificación de los biotipos de *S. frugiperda* en Colombia, y este tipo de investigaciones fueron novedosas en el país, particularmente en este insecto. Más estudios genómicos deberán ser llevados a cabo en nuestro país, teniendo en cuenta la respuesta diferencial de los biotipos de Colombia a los insecticidas y a las endotoxinas del *Bacillus thuringiensis*. Estos tipos de trabajos, ya han comenzado a desarrollarse recientemente en otros países del mundo. No obstante, en otros países, no se han realizado estudios del aislamiento reproductivo en *S. frugiperda*, como se muestran en este libro, entre ellos el aislamiento reproductivo postcigótico entre ellos biotipos (Velásquez-Vélez *et al.*, 2011), el aislamiento comportamental entre los biotipos (Saldamando *et al.*, 2014), el aislamiento químico (Cañas-Hoyos *et al.*, 2017), la diferencia en la respuesta a endotoxinas del *B. thuringiensis* (Ríos-Díez *et al.*, 2012) e insecticidas (Ríos-Díez y Saldamando, 2011), entre otros.

1.4 Referencias

- Busato, G.R., Grützmacher A. D., De Oliveira A. C., Vieira E. A., Zimmer P. D., Kopp M. M., Byeira, J.D.M. y Magalhães T.R.M. (2004). Analysis of the molecular structure y diversity of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to the corn y rice crops in Rio Grye do Sul state, Brazilian. *Neotropical Entomology*, 33, 709-716.
- Cano-Calle, D., Arango-Isaza R. E., y Saldamando-Benjumea C. I. (2015). Molecular identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains in Colombia by using a PCR-RFLP of the mitochondrial gene cytochrome oxydase I (*COI*) y a PCR of the gene FR (For Rice). *Annals of Entomological Society of America*, 108, 172-180
- Cañas-Hoyos, N., Márquez, E. J., y Saldamando, C. I. (2014). Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains from central Colombia: a wing morphometric approach. *Annals of Entomological Society of America*, 107, 575–581
- Clark, P. L., Molina-Ochoa, J., Martinelli, S., Skoda, S. R., Isenhour, D. I., Lee, D. J., Krumm, J. T., y Foster, J.E. (2007). Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in western hemisphere. *Journal of Insect Science*, 7, 05.
- Cock, M.J.W., Patrick, B., Buddie, A., Cafa, G., y Crozier, J. (2017). Molecular methods to detect *Spodoptera frugiperda* in Ghana, y implications for monitoring the spread of invasive species in developing countries. *Scientific Reports*, 7, 4103.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. y Quatro, J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among ADN Haplotypes: Application to Human Mitochondrial ADN Restriction Data. *Genetics*, 131, 479-471.
- Fiteni, E., Dury, K., Gimenez, S. *et al.*, (2022). Host-plant adaptation as a driver of incipient speciation in the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *BMC Ecology y Evolution*, 22, 133.
- Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., y Tamò, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West y Central África. *PloS One*, 11, e0165632
- Gouin, A., Bretaudeau, A., Nam, K. *et al.*, (2017) Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Scientific Reports* 7, 11816
- Hartl, D.L. y Clark, G.C. (1997) *Principles of Population Genetics*. Editorial Sinauer Associates, Sunderly.
- Hedrick, P. H. 2005. *Genetics of populations*. (3a Ed.). Editorial Jones y Bartlett, Sudbury Massachusetts 720p.
- Levy, C. H., Garcia-Maruniak. A. y Maruniak, J. (2002). Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects y cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase c subunit I gene. *Florida Entomologist*, 85, 186-190.

- Lewter, J.A., Szalanski, A. L., Nagoshi, R. N., Meagher, R. L., Owens C. B. y Luttrell, R.G. (2006). Genetic variation within y between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 89, 63-67.
- Murúa, M.G.M., Vera, T., Abraham, S., Juárez, M.L., Prieto, S., Head, G.P., y Willink, E. (2008). Fitness y Mating Compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations from Different Host Plant Species y Regions in Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*, 101, 639-649.
- Nagoshi, R.D. y Meagher, R.L. (2003). Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes y their distribution in the world indicate limitations in interstrain mating. *Insect Molecular Biology*, 12, 453-456.
- Nagoshi, R.D. y Meagher, R.L. (2004). Behavior y distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. *Florida Entomologist*, 87, 440-448.
- Nagoshi, R.N., Meagher, R. L., Adamczyk, J. J., Braman, S. K., Bryenburg, R.L., y Nuessly, G. (2006). New restriction fragment length polymorphisms in the cytochrome oxidase I gene facilitate host strain identification of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 99, 671-677.
- Nagoshi, R. D., Meagher, R. L., Nuessly, G. y Hall, D.G. (2007a). Effects of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) interstrain mating in wild populations. *Environmental Entomology*, 35, 561-568.
- Nagoshi, R. D., Silvie, P., Meagher, R. L., Lopez, L. y Machado, V. (2007b). Identification y comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, y Florida. *Annals of the Entomological Society of America*, 100, 394- 402.
- Nagoshi, R. N, Meagher, R. L., Flyers, K., Gore, J., Jackson, R., Lopez, J., Armstrong, J. S... y Leonard, R. (2008). Using haplotypes to monitor the migration of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Texas y Florida. *Journal of Economic Entomology*, 101, 742-749
- Nagoshi, R.N. y Meagher, R.L. (2008). Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity y migration. *Florida Entomologist*, 91, 446-554.
- Nagoshi, R. N. (2010). The fall armyworm triose phosphate isomerase (Tpi) gene as a marker of strain identity y interstrain mating. *Annals of the Entomological Society of America* 103, 283-292
- Nagoshi, R.N., Goergen, G., Plessis, H.D. *et al.*, (2019). Genetic comparisons of fall armyworm populations from 11 countries spanning sub-Saharan África provide insights into strain composition y migratory behaviors. *Scientific Reports*, 9, 8311
- Nayyar N., Gracy R. G., Ashika T. R., Mohan G., Swathi R. S., Mohan M., Chaudhary M... y Venkatesan T. (2021). Population structure y genetic diversity of invasive Fall Armyworm after 2 years of introduction in India. *Scientific Reports*, 11, 7760.
- Nei, M., y Kummar S. D (2000). *Molecular evolution y phylogenetics*. Oxford University Press.

- Pashley, D. P. (1986). Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) a sibling species complex? *Annals of Entomological Society of America*, 79, 898–904.
- Pashley, D. P., McMichael M. y Silvain J. F. (2004). Multilocus genetic analysis of host use, introgression y speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*, 97, 1034-1044.
- Peakall, R., y Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching y research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Powell, D.P. 1998. *Sex linkage y speciation in Lepidoptera*. In D. Howard y S. Berlocher (eds. *Endless forms: Species y speciation*. Oxford University Press. New York. 309–319.
- Powell, D. P, McMichael, M., y Silvain, J.F. (2004). Multilocus genetic analysis of host use, introgression y speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*, 97, 1034–1044.
- Rosas-García, N, F., Herrera-Mayorga, V., Rivera, G., Mireles-Martínez, M., Paredes Sánchez, F. A., y Villegas-Mendoza, J. M. (2016). Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* provenientes de plantas hospederas de maíz en diferentes regiones de México. *Southwestern Entomologist*, 40, 761-770.
- Saldamando, C. I. y Vélez-Arango A.M. (2010). Host plant association y genetic differentiation of corn y rice Strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. *Neotropical Entomology*, 39, 921-929.
- Salinas-Hernández, H., y Saldamando-Benjumea, C.I. (2011). Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains from Colombia. *Neotropitral entomologist*, 40, 421-430.
- Yainna, S., Tay, W.T., Dury, K. *et al.*, (2022). The evolutionary process of invasion in the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Scientific Reports*, 12, 21063
- Vélez-Arango, A. M., Arango, R. E., Villanueva, D., Aguilera, E. y Saldamando, C. I. (2008). Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*, 34, 145-150.

CAPÍTULO 2. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA ALAR DE LOS BIOTIPOS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Autores: Noresly Cañas Hoyos¹, Edna Judith Márquez², Clara Inés Saldamando Benjumea³.

1. Ingeniera Biológica, M.Sc. Bosques y conservación ambiental, Universidad Nacional de Colombia, ncanas@unal.edu.co (<https://orcid.org/0009-0007-1902-1935>).
2. Laboratorio de Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia—Sede Medellín, Colombia. ejmarque@unal.edu.co (<https://orcid.org/0000-0003-0760-3747>)
3. Biotecnología Vegetal Grupo UNALMED-CIB, Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos 16-223, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, cisaldam@unal.edu.co(<https://orcid.org/0000-0001-9368-8200>)

2.1 Introducción a la morfometría geométrica

La morfometría geométrica es un método matemático y estadístico con una base biológica, que permite separar la variación morfológica causada por factores ambientales, de la variación debida al componente genético en un rasgo biológico que se desea estudiar (Dujardin, 2008). La morfometría representa un método rápido y económico, ampliamente usado para identificar especies crípticas de insectos, razas, biotipos o poblaciones (Jaramillo *et al.*, 2015; Soto *et al.*, 2011; Cañas-Hoyos *et al.*, 2014).

Para llevar a cabo un estudio morfométrico, es necesario identificar unos puntos de referencia o landmarks (LM) sobre la estructura que se planea estudiar de cada individuo y posteriormente convertirlos en coordenadas. Este conjunto de LM determina una figura geométrica de la estructura analizada en cada individuo que es posteriormente comparada entre individuos de una misma población o entre poblaciones de una misma especie o hasta entre especies crípticas (Jaramillo *et al.*, 2015; Soto *et al.*, 2011; Cañas-Hoyos *et al.*, 2014). Un estimador del tamaño de la figura geométrica, es el tamaño centroide (CS) (Dujardin 2008; Dujardin, 2010). CS se define como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las distancias entre el centroide de la figura y cada punto de referencia (Bookstein, 1991). Para la realización de comparaciones morfométricas de estructuras y comparar las figuras geométricas, se requiere realizar un análisis generalizado de Procrustes, el cual superpone cada configuración de LM sobre una configuración consenso que resume la variación geométrica de toda la muestra (Adams y Funk, 1997). Este análisis es necesario en la morfometría geométrica puesto que elimina los efectos de la escala, orientación y posición, dejando únicamente la variación biológica (Zelditch *et al.*, 2004), para ello se realizan tres pasos principales: 1. Se ajusta el tamaño de cada configuración de LM, dividiendo cada coordenada por el CS. 2. Las configuraciones ajustadas se trasladan una sobre otra y se superponen haciendo coincidir sus centroides y 3. Se rotan de manera que la suma de las distancias al cuadrado entre cada punto de referencia y el punto equivalente en la figura consenso sea mínima. (Zelditch *et al.*, 2004). Este proceso genera un espacio multidimensional conocido como el espacio de Kendall cuyas características no permiten hacer uso de análisis estadísticos multivariados, por ser curvo o no euclidiano (Dujardin *et al.*, 2009), por esta razón es necesario proyectar ortogonalmente cada configuración, sobre un plano tangente a la configuración consenso. Estas proyecciones son divididas en sus componentes uniformes (relative warps) y no uniformes (partial warps) que en conjunto son las variables de la forma y pueden ser usados como datos en análisis multivariados para comparar grupos de poblaciones de insectos (Jaramillo *et al.*, 2011; Jaramillo *et al.*, 2015).

La morfometría geométrica ha sido ampliamente utilizada para analizar poblaciones de vectores de enfermedades humanas, como los Triatominos (Dujardin, 2008), también para evaluaciones del tamaño de ala de poblaciones de *Tecia solanivora* a lo largo de un gradiente

altitudinal (Hernández *et al.*, 2010), para distinguir poblaciones de *Helicoverpa zea* de Irán, colectadas de cultivos de algodón, tomate, arveja y maíz (Khiaban *et al.*, 2010), entre otros.

Con respecto a los análisis de variación morfológica entre los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda*. Norelly Cañas Hoyos, escribió un artículo en 2014, en el que se llevo a cabo un análisis de morfometría geométrica del ala de adultos (hembras y machos) de una colonia mantenida en el Laboratorio de Ecología y Evolución de insectos (Cañas-Hoyos *et al.*, 2024). Este trabajo hizo parte de una pasantía que ella realizó en la universidad en una colaboración entre los grupos de investigación de Biotecnología Animal y Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB y posteriormente su tesis de maestría en Bosques y conservación originó el artículo de Cañas-Hoyos *et al.*, (2016). La morfometría geométrica fue empleada, como un método alternativo al uso de marcadores moleculares y demostró ser eficiente en la separación de las poblaciones de este insecto.

2.2 Análisis de la morfometría geométrica en los biotipos de *S. frugiperda*

Para la realización del análisis morfométrico alar de los biotipos de *S. frugiperda*, se emplearon adultos obtenidos de una colonia de *S. frugiperda* establecida en el laboratorio desde 2013 hasta 2016 (Cañas-Hoyos *et al.*, 2014). En este trabajo, los autores analizaron la venación de las alas, de machos y hembras de ambos biotipos. Ellos seleccionaron 15 puntos de referencia anatómicos o landmarks (LM) por ser puntos homólogos que se repiten en todas las alas, ya que eran fáciles de identificar y reproducibles. Además, el análisis se realizó solo en el lado izquierdo de los adultos de la colonia para evitar una variación generada entre las dos alas del mismo insecto (figura 2.1). Los resultados de los partial warps (PW) mostraron que el biotipo de arroz presenta dimorfismo sexual en la forma del ala. Además, Cañas-Hoyos *et al.*, (2014) observaron que existe un efecto alométrico del tamaño del ala, en la forma del ala en machos y hembras. Por ello, eliminaron este efecto y a su vez encontraron que también existe un dimorfismo sexual en el tamaño del ala del biotipo de arroz. No obstante, no encontraron dimorfismo para la forma y el tamaño del ala en el biotipo de maíz, pero debido a que, en el biotipo de arroz, se logró detectar dimorfismo sexual en el ala, los análisis morfométricos posteriores, se realizaron separadamente por sexo. Estos nuevos análisis incluyeron un análisis discriminante y un análisis de “cross validation”, utilizó la variable “CS” (relacionada con el tamaño del ala) que se usan para lograr clasificar correctamente las poblaciones analizadas dentro de cada una de las categorías de los biotipos, sea maíz o arroz. Esto permitió encontrar que la morfometría del ala produce una mejor discriminación en hembras que en machos (figura 2.2). Estos autores, también llevaron a cabo, unos análisis de

configuración de las alas y encontraron que existen cinco puntos anatómicos o “landmarks” que difieren entre los machos de los biotipos de maíz y arroz y esto son: 1, 12, 13, 14 y 15 (figura 2.3). Además, encontraron nueve puntos anatómicos que difieren entre las hembras de los biotipos que son: 1, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15 y 24 (figura 2.3). Finalmente, el análisis del tamaño centroide, estudiado por estos autores, fue significativamente diferente entre las hembras de los biotipos. No obstante, esta variable no fue significativa para machos.

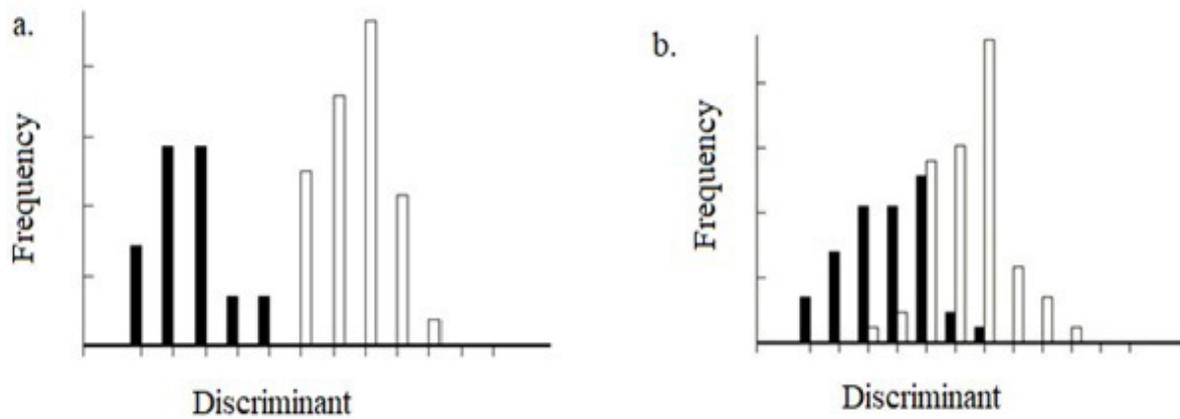
Figura 2.1 Ala izquierda de *S. frugiperda* con sus 15 puntos de referencia anatómicos. (Tomado de la tesis de Maestría de Norely Cañas-Hoyos).



El trabajo realizado por Cañas-Hoyos *et al.* (2014) ha mostrado ser una muy buena alternativa al uso de marcadores moleculares para la identificación de los biotipos de *S. frugiperda*. Esto comprueba que la morfometría geométrica del ala, puede ser aplicada a machos y hembras adultos de esta especie, ya que tanto su forma como su tamaño difiere entre estas dos poblaciones. Otros estudios relacionados con el análisis de poblaciones naturales de los biotipos de *S. frugiperda* fueron realizados por Cañas-Hoyos *et al.* (2016) (ver más adelante) y demostraron que las poblaciones de campo y laboratorio pueden ser analizadas con esta herramienta, puesto que ambas se diferenciaron en tamaño y forma del ala, permitiendo distinguir los biotipos de este insecto.

Como se mencionó anteriormente, posteriormente, en su tesis de Maestría, Norely Cañas produjo el artículo: Cañas-Hoyos *et al.* (2016), en el que se analizaron poblaciones de laboratorio y de campo de los biotipos de *S. frugiperda*. Este trabajo se realizó con el fin de evaluar la heredabilidad del tamaño (teniendo en cuenta el CS) y de la forma de las alas (teniendo en cuenta los PW o en este caso los RW (relative warps) de este insecto con el uso de la información de adultos de la colonia y a su vez para llevar a cabo, un análisis de la genética de poblaciones con el uso del estimador Q_{ST} (Freely, 2005).

Figura 2.2 a) Análisis discriminante realizado en las hembras de los biotipos de *S. frugiperda*. b) Análisis discriminante realizado en los machos de los biotipos de *S. frugiperda*. Biotipo maíz = barras Negras, Biotipo arroz = barras blancas. (Tomado del trabajo de pregrado de Norely Cañas-Hoyos).



Adicionalmente, en la teoría de la genética cuantitativa se ha descrito que para determinar si la variación en un carácter morfológico es resultado de la variación genética del carácter más que la variación ambiental, es necesario estimar su heredabilidad (Falconer, 1989). Un carácter es heredable si la semejanza del carácter es compartida entre padres e hijos, por lo que, es posible cuantificar el estimador de heredabilidad amplia y determinar la proporción de varianza fenotípica del rasgo que es explicada principalmente por su varianza genética, para ello se emplea información del carácter cuantitativo en cuestión de un insecto que proviene de una población mantenida en una colonia de laboratorio, puesto que las condiciones ambientales son controladas (Falconer, 1989). Una manera común de estimar la heredabilidad amplia es utilizar un método de sib-mating analysis (análisis de relación entre medio-hermanos) con el uso de una ANOVA anidada. La heredabilidad toma valores entre 0 y 1, un valor de heredabilidad alta (mayor a 0.8) significa que una parte importante de toda la variabilidad fenotípica de un carácter medido es debida a la variabilidad genética (Falconer, 1989).

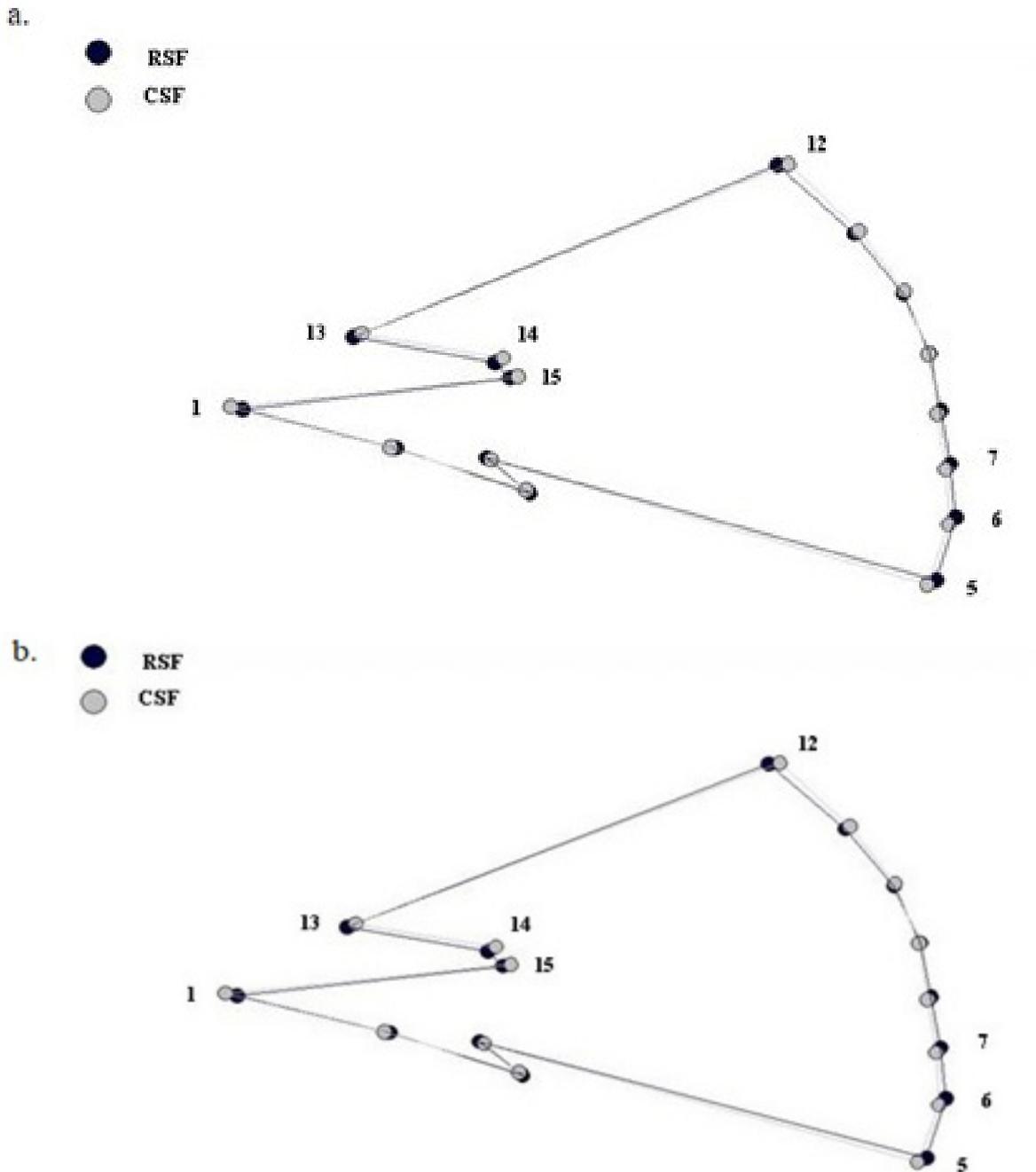
Para realizar este estudio, Cañas-Hoyos *et al.* (2016) llevaron a cabo muestreos de más de 100 larvas en los mismos cultivos de maíz y arroz usados por Cañas-Hoyos *et al.* (2014), del departamento del Tolima. Estas colectas se realizaron durante los meses de mayo y octubre de 2013. Estos autores siguieron los mismos protocolos de mantenimiento de la colonia realizados en 2014. Posteriormente, Cañas-Hoyos *et al.* (2016) analizaron las alas izquierdas de 161 individuos de laboratorio, (14 hembras de arroz (RSF = hembras de biotipo de arroz), 16 hembras de maíz (CSF = hembras de biotipo de maíz), 7 machos de arroz (RSM = machos del biotipo de arroz), 8 machos de maíz (CSM = machos del biotipo de maíz), 116 individuos de la F_1) y 75 individuos de campo (38 de maíz y 37 de arroz). Cañas-Hoyos *et al.* (2016), también seleccionaron 15 puntos de referencia (LM) anatómicos que fueron seleccionados por ser puntos homólogos

que se repiten en todas las alas, fáciles Para estimar la heredabilidad del tamaño y la forma del ala, Cañas-Hoyos *et al.* (2016) usaron un diseño experimental de apareamiento factorial anidado para generar familias con relaciones de hermanos medios y hermanos completos (un macho fue apareado con tres hembras) (Falconer, 1989). La heredabilidad del tamaño y a forma del ala fue calculada a partir de los valores de CS y RW1 (Symmons y Kotiaho, 2007), basado en una ANOVA anidada en la que una variable (CS o RW1) fue considerada en conjunto con dos variables nominales (hembra y progenie). La variable nominal se anida y por esta razón cada valor de estas (subgrupo compuesto de hembra y progenie) es encontrada en combinación con un valor de una variable nominal del alto valor (en este caso los machos) (Falconer, 1989). Para determinar las diferencias en forma y tamaño del ala de las poblaciones de campo colectadas en campo, se evaluó el efecto alométrico (contribución del tamaño a las diferencias en la forma del ala) usando una regresión multivariada (Dujardin, 2010). Cuyo el efecto alométrico es significativo, la hipótesis de pendientes alométricas comunes, se debe contrastar por medio de un análisis de covarianza multivariado (MANCOVA), si el modelo no es rechazado (los grupos tienen pendientes alométricas comunes), se hace un ajuste al tamaño y se analiza si los datos siguen mostró diferencias en la forma (Dujardin, 2008). Para evaluar si hay diferencias en la forma del ala de los biotipos se debe realizar un análisis discriminante. Este análisis se realizó por separado para hembras y machos (Márquez *et al.*, 2011; Cañas-Hoyos *et al.*, 2014).

Adicionalmente, Cañas-Hoyos *et al.* (2016) estimaron los valores del para los datos de CS y PW1 obtenidos de poblaciones silvestres de los biotipos de maíz y arroz usando la siguiente formula: $Q_{st} = \text{Var entre} / (\text{var entre} + \text{var dentro})$ donde, var entre = la varianza entre poblaciones, en este caso entre los biotipos de maíz y arroz y var dentro = la varianza dentro de cada población. El Q_{st} es comparable al F_{st} y representa el grado de diferenciación genética entre poblaciones. Cuyo significa que el caracter cuantitativo se ha diferenciado en una mayor medida de lo que se esperaría si solo se diferenciaron por causa de deriva genética (hay selección disruptiva y se están favoreciendo los fenotipos diferentes en las poblaciones diferentes), si $Q_{st} = 0$, el caracter es selectivamente neutro, y significa que la diferenciación en la poblaciones es menor que la que se esperaría por deriva genética y en ambas poblaciones está siendo seleccionado el mismo fenotipo (Freely, 2005).

A partir de las Anovas anidadas se obtuvieron los estimadores para los RW : $\text{Var D} = 0.866$, $h^2D = 0.4668$, $h^2s = 0.00062$, $h^2D + h^2s = 0.2340$. Para el CS y $\text{var D} = 0.000017$, $\text{var D} = 0.00000593$, $h^2D = 0.3334$, $h^2s = 0.1163$, $h^2D + h^2s = 0.1958$, para el RW1. Estos resultados sugieren que las heredabilidades de la forma de ala (PW) y del tamaño del ala (CS) son mayores para los machos que para las hembras, por lo que puede existir más efecto ambiental en la forma y tamaño del ala en las hembras que en los machos.

Figura 2.3 a) Configuraciones consenso del tamaño del ala de los machos de *S. frugiperda*, b) Configuraciones consenso del tamaño del ala de las hembras de *S. frugiperda*. CSM = Corn strain males, RSM = Rice strain males, CSF = Corn strain females, RSF = Rice strain females. (Tomado del trabajo de pregrado de Norelly Cañas-Hoyos).



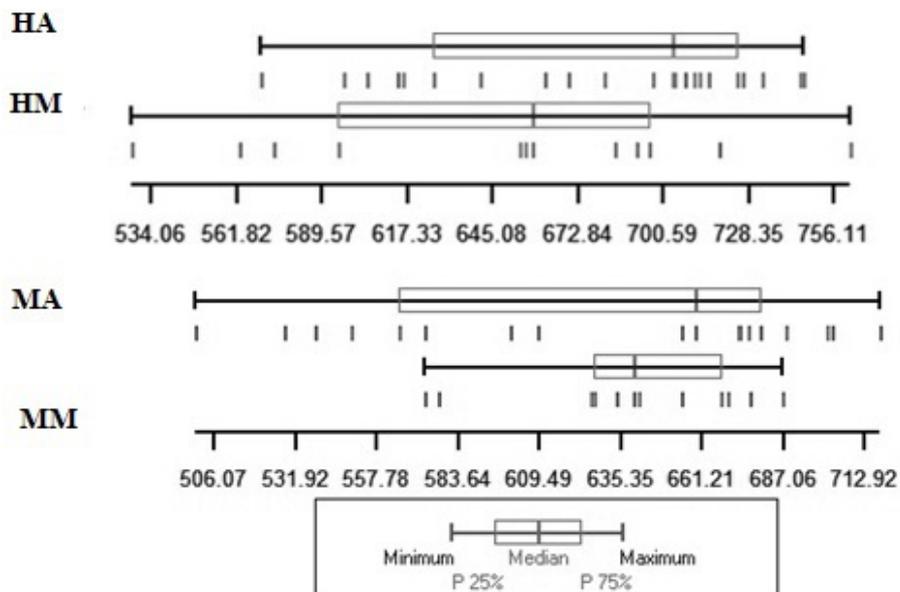
Además, estos valores de heredabilidades son relativamente bajos (Falconer, 1989). Respecto a las poblaciones de campo de *S. frugiperda*, el análisis morfométrico fue realizado en 75 individuos de ambos biotipos, colectados provenientes de colectas directas del campo (n=25 CSF, n=22 CSM y n = 12 RSF, n = 16 RSM). Los resultados, mostraron diferencias significativas en el tamaño del ala (CS) entre los biotipos (figura 2.4). Adicionalmente, Cañas-Hoyos *et al.* (2016)

encontraron diferencias en la forma del ala (RW) puesto que el análisis discriminante separó a los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* en ambos sexos (figura 2.5).

Finalmente, los valores para los evaluados para determinar si existe diferenciación genética, basada en caracteres morfológicos, entre los biotipos de maíz y arroz de poblaciones de campo de *S. frugiperda* para el CS y para el RW1. Estos valores demuestran que las poblaciones de los biotipos de esta especie presentan estructura genética a nivel morfológico para ambos estimadores del ala.

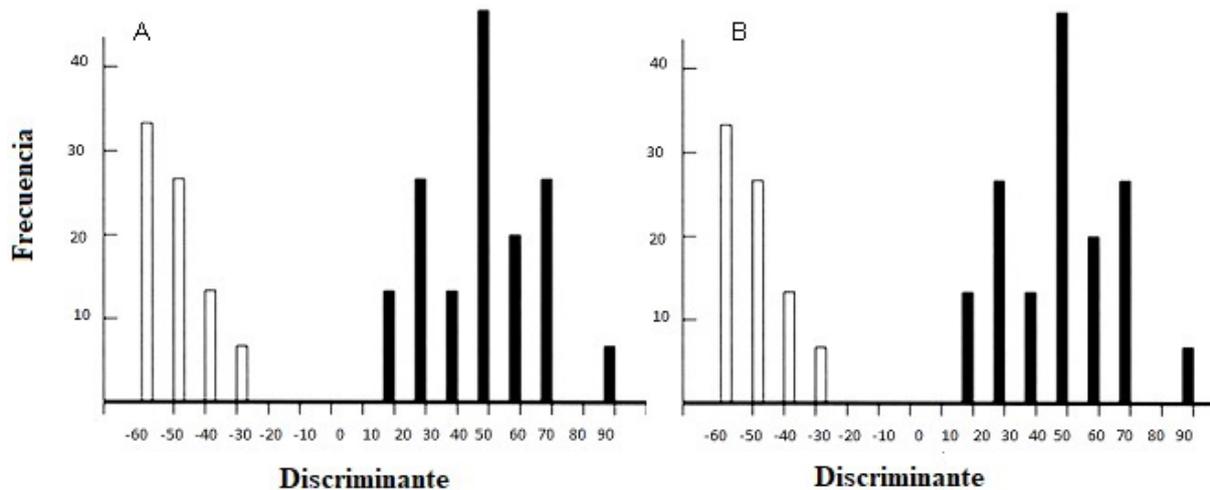
Cañas- Hoyos *et al.*, (2016) demostraron que los valores de heredabilidad del CS (tamaño) fueron mayores que los del RW1 (la forma) tanto en machos como en hembras, a su vez los componentes de heredabilidad de los machos (para el CS y para el RW1) fueron mayores que en las hembras, sugiriendo que el componente genético del tamaño del ala y el componente genético de los machos desempeñan un papel más importante en la herencia del tamaño y la forma del ala de esta especie. De acuerdo con Falconer (1989), valores de heredabilidad cercanos a 0.8 son altos mientras valores cercanos a cero son muy bajos. En este estudio la heredabilidad de las hembras fue muy baja a pesar de ser poblaciones mantenidas bajo condiciones de laboratorio. En este caso, para *S. frugiperda*, la herencia del tamaño y forma del ala fueron menos afectadas por factores ambientales en los machos y es más probable que estén mayormente afectadas en las hembras. Estudios posteriores deberían incluir poblaciones más grandes y considerar condiciones ambientales diferentes para determinar si la heredabilidad es fácilmente influenciada por tales condiciones.

Figura 2.4 Comparación del tamaño centroide (CS) entre los biotipos de *S. frugiperda*. HA= hembra de arroz, HM= hembra de maíz, MA = macho de Arroz, MM = machos de maíz (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos).



Los valores de estimados, demuestran que los biotipos de *S. frugiperda* se encuentran genéticamente diferenciados en los caracteres morfológicos CS y RW1. Estudios anteriores basados en la caracterización de los biotipos provenientes del departamento del Tolima obtenidos por Saldamando y Vélez (2010) estimaron un $\Phi_{Pt} = 0.42$ para el gen del citocromo oxidasa I (COI) y $\Phi_{Pt} = 0.17$ para la región en tadem FR en 246 individuos colectados en 2007 y 2008. En este trabajo los valores de fueron de 0.385 para el CS y de 0.326 para el RW1 los cuales son valores similares a 0.42 o mayores a 0.17, así que estos resultados sugieren que los dos rasgos cuantitativos de CS y RW1 están diferenciados en un grado mayor que los rasgos genéticos analizados por Saldamando y Vélez (2010). Estos valores también sugieren que en las poblaciones de campo de esta especie se está favoreciendo una selección direccional (Freely, 2005), es decir, que los fenotipos del biotipo de maíz se están diferenciando morfológicamente de los del biotipo de arroz. Es importante recalcar que debido a que el número total de individuos fue de 75, es necesario investigar este parámetro en investigaciones futuras para corroborar estos resultados.

Figura 2.5 Análisis discriminante realizado en los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* de poblaciones de campo. A) En hembras y B) En machos. Blanco = Biotipo de maíz, Negro = Biotipo de arroz (Tomado de la tesis de Maestría de Norely Cañas-Hoyos).



2.3 Conclusiones generales sobre la morfometría geométrica alar en *S. frugiperda*

La morfometría geométrica alar mostró ser una técnica válida para la identificación de los biotipos de *S. frugiperda* de poblaciones de campo y de laboratorio, de Colombia, por lo que puede ser empleada para su diferenciación en reemplazo de los métodos moleculares, siempre y cuando el investigador tenga a la mano adultos y tamaños poblacionales altos (Cañas-Hoyos *et*

al., 2014; Cañas-Hoyos *et al.*, 2016). En el primer estudio de Cañas-Hoyos *et al.*, (2014), los investigadores comprobaron que la morfometría demostró dimorfismo sexual en el biotipo de arroz con respecto al tamaño del ala y a su vez que el tamaño del ala difiere entre los machos de ambos biotipos de manera más discriminatoria que entre las hembras. No obstante, en un trabajo posterior Cañas-Hoyos *et al.*, (2016) encontraron que el tamaño del ala fue discriminatorio para ambos sexos de los dos biotipos, por lo que demuestra que los resultados de sus investigaciones pueden ser empleados en futuros trabajos.

Por otro lado, Cañas-Hoyos *et al.*, (2016) observaron que las poblaciones de campo de los biotipos de maíz y arroz fueron significativamente diferentes en la forma y tamaño del ala. Estos resultados demuestran la posibilidad de usar enfoques morfométricos para distinguir estos dos biotipos como un método alternativo a los marcadores moleculares cuyo se colectan adultos en campo, y por lo tanto emplearlos como un método adicional a la biología molecular que es costosa e implica mayor tiempo en el análisis y la estandarización. Hasta la fecha, no se ha descubierto ninguna herramienta morfológica para diferenciar los biotipos en sus estadios de larva y por eso los marcadores moleculares continúan siendo necesarios para *S. frugiperda*. Es importante mencionar que, un trabajo posterior realizado con muestras del insecto de Estados Unidos demostró que la morfometría geométrica no es una herramienta tan poderosa para distinguir las poblaciones de los biotipos de este insecto, ya que los autores encontraron diferencias en la forma y tamaño del ala de *S. frugiperda* de poblaciones colectadas en diferentes cultivos (maní, maíz y arroz), pero no entre sus biotipos, por lo que mencionan que los trabajos realizados en Colombia presentaron resultados diferentes puesto que el tamaño y forma del ala puede ser influenciada por el hospedero (Nagoshi *et al.*, 2020). Ellos emplearon el mismo número de landmarks que los trabajos colombianos y analizaron 182 muestras. No obstante, no realizaron los mismos análisis multivariados. Este trabajo muestra la necesidad de realizar un análisis morfométrico de mayor escala para los biotipos de *S. frugiperda*, incluyendo más caracteres morfológicos además de las alas, como la genitalia, y caracteres de morfología tradicional.

La morfometría del ala y los estimadores de heredabilidad también han sido usados en poblaciones de la mosca de la fruta, *Drosophila gouveai* para demostrar que las variables morfométricas del ala tienen un componente genético aditivo en la varianza fenotípica, así que esas variables son marcadores cuantitativos apropiados para evaluar diferencias morfológicas entre poblaciones (Marsola-Moraes *et al.*, 2004). Adicionalmente, Cañas-Hoyos *et al.*, (2016) usaron ANOVAS anidadas basadas en el método de hermanos medios para calcular la heredabilidad (Falconer, 1989) del tamaño y de la forma del ala y encontraron que sus valores eran bajos. Estos resultados sugieren que el tamaño de la muestra empleado por estos autores es bajo o que existe plasticidad fenotípica en el ala de *S. frugiperda* o como mencionan Nagoshi *et al.* (2020), el tamaño y forma del ala están influenciadas por el hospedero.

En otro estudio realizado en la mosca de la fruta, *Drosophila suboscuro*, los autores encontraron que moscas silvestres y de laboratorio difieren en los valores de heredabilidad de la forma del ala (los valores estimados fueron del 90% para poblaciones de laboratorio y 15% para poblaciones de campo colectadas en 1989) pero esos valores fueron diferentes de poblaciones colectadas en 1988 (14 % para poblaciones de laboratorio y 7% para poblaciones de campo) (Orengo y Prevosti, 1999). Los resultados obtenidos por Orengo y Prevosti (1999) son relevantes y se deben tener en cuenta en estudios posteriores de heredabilidad del ala en *S. frugiperda* dado que es posible que la selección natural influya la morfometría del ala en diferentes periodos de tiempo o por el otro lado, los caracteres morfométricos del ala sufren de plasticidad fenotípica.

En otras especies de lepidópteros plaga como *Tecia solanivora* también se han realizado estudios morfométricos, y se encontró dimorfismo sexual basado en el tamaño y la forma del ala (Hernández *et al.*, 2010). En *Synneuria sp.* una especie de geometridae proveniente de Chile, Benítez *et al.*, (2011) encontraron que las poblaciones naturales no difieren en el tamaño o forma del ala, pero sus sexos si son claramente separados por el tamaño, sin embargo, en los estudios anteriores no se estimaron los valores de heredabilidad de la forma y el tamaño del ala como se hizo en la presente investigación. Los resultados encontrados en este muestran que la herencia del tamaño y la forma del ala en *S. frugiperda* está más influenciada en machos que en hembras y por lo tanto el tamaño y forma del ala en la hembra puede ser más afectada por factores ambientales. Además, las poblaciones silvestres de estos dos biotipos fueron significativamente diferentes en el tamaño y forma del ala y por esta razón esta herramienta puede ser útil en especímenes de laboratorio (Cañas-Hoyos *et al.*, 2014) y de campo para diferenciar los biotipos. No obstante, futuras investigaciones deberán continuar con el uso de esta herramienta en poblaciones más grandes del insecto para así estimar todos estos parámetros de nuevo y comprobar si la heredabilidad continúa siendo la misma y si el tamaño y forma del ala siguen siendo útiles para distinguir las poblaciones de este insecto.

Adicionalmente, un análisis genético poblacional basado en el tamaño y forma del ala mostró que los valores de obtenidos para los biotipos de *S. frugiperda* reflejan que los biotipos, se encuentran genéticamente diferenciados en los caracteres morfológicos CS y RW1. Estudios anteriores basados en la caracterización de los biotipos provenientes del departamento del Tolima obtenidos por Saldamando y Vélez (2010) estimaron un $\Phi_{Pt} = 0.42$ para el gen de la Citocromo oxidasa I (*COI*) y $\Phi_{Pt} = 0.17$ para la región en tadem FR en 246 individuos colectados en 2007 y 2008. En este trabajo los valores de fueron de 0.385 para el CS y de 0.326 para el RW1 los cuales son valores similares a 0.42 o mayores a 0.17, así que estos resultados sugieren que los dos rasgos cuantitativos de CS y RW1 están diferenciados en un grado mayor que los rasgos genéticos analizados por Saldamando y Vélez (2010). Igualmente, los valores de fueron superiores a los estimadores obtenidos por Cano -Calle *et al.* (2015), puesto que

ellos encontraron estimadores de $\Phi_{i_{PT}} = 0.376$, $g_l = 13,370$, $P < 0.001$, para el gen *COI*, $\Phi_{i_{PT}} = 0.50$, $g_l = 13,354$, $P < 0.001$, para el gen *FR*. Estos valores también sugieren que en las poblaciones de campo de esta especie se está favoreciendo una selección direccional (Freely 2005), es decir, que los fenotipos del biotipo de maíz se están diferenciando morfológicamente de los del biotipo de arroz. Debido a que el número total de individuos fue de 75, es necesario investigar este parámetro en otros trabajos para corroborar estos resultados y comprobar que la morfometría geométrica es útil para determinar diferenciaciones genéticas entre los biotipos de *S. frugiperda*.

2.4 Referencias

- Adams, D. y Funk, D. (1997). Morphometric inferences on sibling species y sexual dimorphism in *Eochlamisus bebbianae* beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. *Systematic Biology*, 46, 180–194.
- Benítez, H. A., Parra, L.E., Sepúlveda-Zúñiga E. y Sanzana MJ. (2011). Geometric Perspectives of Sexual Dimorphism in the Wing Shape of Lepidoptera: The Case of *Synneuria* sp (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of the Entomological Research Society*, 13, 53-60.
- Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric tools for landmark data*. Geometry y biology. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Cañas-Hoyos, N., Márquez, E. J. y Saldamando, C. I. (2014). Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains from central Colombia: a wing morphometric approach. *Annals of the Entomological Society of America*, 107, 575–581
- Cañas-Hoyos, N., Márquez, E.J. y Saldamando-Benjumea, C.I. (2016). Heritability of Wing Size y Shape of the Rice y Corn Strains of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, 45, 411-9.
- Dujardin, J.P. (2008). Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics y Evolution*, 8, 875 -890.
- Dujardin, J-P., D. Costa, N. Bustamante, N. Jaramillo, y Catalá, S. (2009). Deciphering 12 morphology in Triatominae: The evolutionary signals. *Acta Tropica*, 110, 101–111.
- Dujardin, J. P. (2010). COO, MOG y COV for Windows. Institut de Recherches pour le Développement, Montpellier, France.
- Falconer, D. (1989). *Introduction to quantitative genetics* (3a Ed). Longman. Sci y teach. London, 438.
- Freely, J. (2005). *Molecular ecology* (2aEd.). Editorial West Sussex, Jonh Wiley y Sons, Engly, 388.
- Hernández, N., Barragán, A., Dupas, S., Silvain, J., y Dangles, O. (2010). Wing shape variations in an invasive moth are related to sexual dimorphism y altitude. *Bulletin of Entomological Research*, 100, 529-541
- Khiaban, N.G.M.Z., Haddad Irani Nejad K., Hejazi M. S., Mohammadi S. A. y Sokhyan N. (2010). A geometric morphometric study on the host populations of the pod borer, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in some parts of Irán. *Munis Entomology y Zoology Journal*, 29, 13-24.
- Jaramillo, N. (2011). *Morfometría geométrica: principios teóricos y métodos de empleo*. *Fronteras de investigación en enfermedades infecciosas*. Modelo enfermedad de Chagas, Editorial Universidad de Antioquia, .69 – 87.
- Jaramillo, N., Dujardin, J.P., Calle, D., y Fonseca, I. (2015). Geometric morphometrics for the taxonomy of 11 species of *Anopheles* (Nyssorhynchus) mosquitoes. *Medical y Veterinary Entomology*, 29, 26-36.

- Márquez, E., Jaramillo, N., Gómez, A., y Dujardin, J. P. (2011). Morphometric y molecular differentiation of a *Rhodnius robustus*-like form *R. robustus* Lrousse, 1927 y *R. prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Acta tropica*, 120, 103-109.
- Marsola-Moraes E, y Melo Sene F. (2004) Heritability of wing morphology in a natural population of *Drosophila gouveai*. *Genética* 121, 119–123
- Nagoshi KL, Allan SA y Meagher RL. (2020). Assessing the Use of Wing Morphometrics to Identify Fall Armandworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains in Field Collections. *Journal of Economic Entomology*, 113(2), 800-807. doi: 10.1093/jee/toz344. PMID: 31879767.
- Orengo, D. J. y Prevosti, A. (1999). Wing size heritability in *Drosophila suboscuro*. *Heredity*, 82, 100-106.
- Saldamando, C. I. y Vélez-Arango, A. M. (2010). Host plant association y genetic differentiation of corn y rice Strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. *Neotropical Entomology*, 39, 921-929.
- Simmons, L. W. y Kotiaho, J.S. (2007). Quantitative genetic correlation between trait y preference supports a sexually selected sperm process. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 16604-16608.
- Soto, A., Liria, J., y De Luna E. (2011). Morfometría geométrica y filogenia en *Rhodniini* (Hemiptera, Reduviidae) de Venezuela. *Acta zoológica mexicana*, 27, 87-102.
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, D. H., y Fink, W. (2004). *Geometric Morphometrics for Biologists: A primer*: Elsevier Academic Press. Waltham, MA.

CAPÍTULO 3. GENÉTICA DE POBLACIONES Y FILOGEOGRAFÍA DE *TECIA SOLANIVORA*

Autores: Diego Fernando Villanueva Mejía¹, Clara Inés Saldamando Benjumea²

1. Grupo de investigación Ciencias Biológicas y Bioprocesos (CIBIOP), Escuela de Ciencias Aplicadas e Ingeniería, Universidad EAFIT. dvillanu@eafit.edu.co (<https://orcid.org/0000-0002-3837-5006>).
2. Biotecnología Vegetal Grupo UNALMED-CIB, Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos 16-223, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, cisaldam@unal.edu.co(<https://orcid.org/0000-0001-9368-8200>)

3.1 *Tecia solanivora* introducción

La polilla guatemalteca (*Tecia solanivora* Povolny, 1973) (Lepidoptera, Gelechiidae), es un insecto holometábolo, cuya larva es reconocida como una de las principales plagas del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), puesto que se alimenta de los tubérculos en campo y almacenamiento (Villanueva-Mejía, 2015). *T. solanivora*, es causante de un alto número de aplicaciones de insecticidas químicos en este cultivo, debido al daño que causan sus larvas por el consumo del tubérculo tanto en campo como en almacenamiento, afectó su calidad y ocasionando pérdidas económicas que oscilan entre el 50 y el 100% del cultivo (MacLeod, 2005; Herrera, 1997). La polilla, fue reportada por primera vez, en Guatemala en 1956, momento desde el cual, se dispersó con gran rapidez en otros países de Centro y Suramérica e incluso España. Fue reportada en Costa Rica en 1970, Panamá, Honduras y San Salvador en 1973, Venezuela en 1983, Colombia en 1985, Ecuador en 1996, Islas Canarias en España en 1999 y México en 2011 (Hooker, 1980; Hilje, 1994; Herrera, 1997; Torres, 1998; García *et al.*, 2002; Niño, 2004; Roblero *et al.*, 2011). Puesto que el país de origen de este insecto donde fue reconocido como plaga fue Guatemala, a *T. solanivora* se le ha denominado la polilla Guatemalteca de la papa (Villanueva -Mejía *et al.*, 2015 a, b)

Por otro lado, *T. solanivora*, se caracteriza por ser un insecto holometábolo, que comprende cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. La duración de cada uno de estos instares y del desarrollo del individuo, es afectada por las condiciones ambientales, siendo la temperatura y la humedad relativa los factores que más influyen, observándose una relación inversa entre la duración del desarrollo y la temperatura (Torres, 1989; Notz 1995, Niño, 2004). Sobre el control del insecto, se conoce que, la mayoría de los métodos usados para el manejo de este insecto, se basan en el estudio del efecto de insecticidas químicos con 12 a 24 aplicaciones por período de cultivo (Hilje, 1994; MacLeod, 2005). Controladores biológicos tipo Baculovirus (Baculoviridae), han sido estudiados para su manejo (Espinell *et al.*, 2010, 2012), y ya existe un producto biológico de Agrosavia para el control de este insecto, así como los derivados de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner, 1915) (Villanueva *et al.*, 2009; López *et al.*, 2010), e incluso, esfuerzos para su control mediante plantas mejoradas genéticamente (Valderrama *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2012) o con feromonas (Bosa *et al.*, 2005; Bosa *et al.*, 2006; Bosa *et al.*, 2008; Mc Cormick *et al.*, 2012). Recientemente, en el centro de investigación de Agrosavia, Tibaitatá, se evaluó la resistencia de 132 accesiones de papa al efecto de *T. solanivora*, en condiciones de laboratorio y se encontró que las accesiones (genotipos) 1815 y 2384 fueron las más resistentes al ataque de la larva del insecto (Sánchez-León *et al.*, 2021).

Como lo menciona Villanueva-Mejía (2015), en su tesis doctoral: en la biología evolutiva, el uso de las herramientas moleculares juega un papel muy importante en la identificación de la variación genética de las especies (a nivel del gen o de una secuencia de un gen) con el fin de

definir si sus poblaciones se encuentran genéticamente estructuradas, si presentan asociación a plantas hospederas (especies polífagas, oligófagas y monófagas), si su comportamiento migratorio varía por población, si han sufrido de cuellos de botella o de fenómenos de recolonización y extinción. Entre los insectos, que en la época de la tesis de Diego Villanueva se habían estudiado se tenía conocimiento de la genética de poblaciones de *Ostrinia nubilalis* en Francia (secuenciación de genes nucleares *TPI*, aloenzimas) (Martel *et al.*, 2003), *Bemisia tabaci* en todo América y el mediterráneo (microsatélites y secuenciación del gen mitocondrial *COI*) (De Barro *et al.*, 2005), *Spodoptera frugiperda* en el Hemisferio Occidental (AFLP, PCR-RFLP del gen *COI*, PCR del gen *FR*) (Prowell *et al.*, 2004, Saldamando y Vélez -Arango, 2010, Velásquez- Vélez *et al.*, 2011), *Neoleucinodes elegantalis* en Colombia (secuenciación del gen *COI*) (Díaz- Montilla *et al.*, 2013), *Helicoverpa armigera* en África y Europa (aloenzimas) (Nibouche *et al.*, 1998), *Pthorimaea operculella* en Estados Unidos (AFLP) (Medina *et al.*, 2010), *Heliothis virescens* en Brasil (secuenciación de genes *COI*, *COII* y *NAD6*) (Albernaz *et al.*, 2012), entre otros insectos, factores que han sido significativos para la mejora de las estrategias de manejo integrado de un insecto considerado plaga (Saldamando y Vélez- Arango, 2010; Salinas-Hernández *et al.*, 2011).

De los pocos trabajos sobre la genética de poblaciones de *T. solanivora*, fue el estudio llevado a cabo por Pulliandre *et al.* (2008), quienes encontraron una baja variabilidad genética de *T. solanivora* en Suramérica con el uso de la secuenciación del gen mitocondrial del citocromo b (*Cytb*), particularmente en Colombia, esto debido al bajo número de haplotipos encontrados por ellos, por esta razón, los autores concluyeron que las poblaciones de este insecto pasaron por un cuello de botella en nuestro país. Además, para la realización de este trabajo emplearon muestras del insecto de varios países de Sur América, Centro América y España. Como es sabido en la teoría de la genética de poblaciones, y según el reloj molecular, diferentes genes evolucionan a diferentes tasas (Nei y Kummar 2000; Hedrick 2005; Freely 2005) y por ello representan diferentes niveles de variabilidad genética de individuos de una misma especie. Es importante resaltar que el gen *Cytb* en insectos presenta una tasa de evolución más lenta que el gen de la citocromo oxidasa I (*COI*), el primero se ha utilizado en la entomología médica para identificar especies de un mismo género y en algunos casos dentro de un mismo orden, mientras que el segundo para evaluar la diferenciación genética a nivel de especie (Freely, 2005), permitiendo, de esta manera realizar un análisis de la diferenciación genética y filogenia de los insectos con una mayor resolución (dada su alta tasa de cambio nucleotídico) (Simmons y Welle, 2001).

Un aspecto que debe tenerse en cuenta al evaluar la genética de poblaciones de *T. solanivora* es el hecho de que, en Colombia, se haya considerado que sus poblaciones, presenten una baja variabilidad genética, y más aún, cuyo este país presenta marcadas diferencias geográficas (como las Codillera de los Andes) y ambientales, propicio para la diversificación genética de las especies (Villanueva-Mejía, 2015). Por otro lado, en este país existen más de 30 variedades

de papa de las especies *Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*, varias de ellas cultivables, con diferencias marcadas en su producción por departamento (Agronet, 2014). Cada departamento de Colombia produce un área diferente de estos cultivos con una distribución ecológica distinta, por lo cual estas plantas pueden ser potencialmente utilizadas por *T. solanivora* como hospederos, permitiendo su fácil dispersión en el país. ¿Esto con lleva a la pregunta principal de la tesis de Diego Fernando Villanueva, ¿como se caracteriza la genética de poblaciones de *T. solanivora* en Colombia?

Los resultados obtenidos de esta tesis, publicada en el año 2015, presentaron un panorama más claro de la capacidad de dispersión y adaptación de *T. solanivora* en Colombia y a su vez de su relación con el hospedero que hasta el momento ha sido considerado como su principal fuente de alimentación, supervivencia y reproducción: *Solanum tuberosum* L. A su vez, la asociación de la plaga con la papa criolla *S. phureja*. De esta tesis se originaron cuatro artículos, el primero fue una revisión bibliográfica del insecto, los dos siguientes sobre la genética de poblaciones y filogeografía y el último sobre la caracterización molecular de su genoma mitocondrial.

3.2 Genética de poblaciones y filogeografía de *Tecia solanivora*

Estudios sobre la genética de poblaciones y filogenia de *Tecia solanivora* han sido muy poco desarrollados en la plaga, dentro de los trabajos más destacados se encuentran los resultados obtenidos en la tesis de doctorado de Diego Villanueva, entre los que se realizan los análisis de la filogeografía del insecto con el uso de la secuenciación de dos genes mitocondriales (*COI* y *Cytb*) y la estandarización de ocho microsatélites evaluados en poblaciones del insecto de cuatro departamentos de Colombia: Antioquia, Boyacá, Norte de Santander y Nariño. Estos trabajos origina los artículos de: Villanueva -Mejía *et al.* (2015 a) y Villanueva-Mejía *et al.* (2015b). Adicionalmente, una caracterización del genoma mitocondrial del insecto, su composición de genes, orden y filogenia (Ríos-Ramírez *et al.*, 2016). Uno de los primeros estudios genéticos que se han realizado en la especie, se llevó a cabo con el objeto de hacer un seguimiento de la historia ecológica y genética de la invasión de esta plaga en Centro y Sur América (Puillyre *et al.*, 2008). Este trabajo, los autores llevaron a cabo un análisis de secuencias de una región del gen mitocondrial citocromo b (*Cytb*) a partir de larvas de *T. solanivora* proveniente de países como Guatemala, Ecuador y Colombia. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que individuos procedentes de Sur América comparten un mismo haplotipo mitocondrial, mientras que individuos originarios de Guatemala presentan un haplotipo con una mayor variabilidad genética. Basados en estos resultados, ellos sugieren que la diferenciación genética de *T. Solanivora* en Guatemala es mayor debido a que esta especie es originaria de este país, mientras

que en Sur América la diversidad genética es menor dado que el proceso de invasión de esta especie pudo haberse acompañado de una reducción del acervo genético del insecto (cuello de botella). Este estudio, adicional al trabajo realizado por Torres-Leguizamón *et al.*, (2009) en el que se estandarizaron nueve microsatélites en la especie y un posterior análisis poblacional (Torres-Leguizamón *et al.*, 2011), son las únicas investigaciones enfocadas en la genética de esta polilla. Pulliandre *et al.*, (2008) intentaron analizar la capacidad de dispersión o de invasión de este insecto en Sur América, empleando únicamente 21 muestras de Colombia, siendo la mayoría de ellas del departamento de Cundinamarca. Este tipo de análisis tienen importantes implicaciones en el momento de concluir los fenómenos evolutivos que sufren las poblaciones naturales (selección natural, flujo genético, deriva, mutaciones, apareamiento asociativo) (Hedrick, 2005), por lo que un bajo número de muestras no es recomendable para realizar un trabajo poblacional, ni mucho menos, muestras colectadas en una sola localidad. Esta pudo ser la causa por la que ellos concluyeron que las poblaciones de *T. solanivora* sufrieron un cuello de botella. No obstante, el efecto de un cuello de botella en una población tiene como consecuencia una reducción de su la variabilidad genética, puesto que pocos individuos se conservan en la población, después de sufrir una drástica reducción de su tamaño, por lo que la probabilidad de cruces endogámicos entre sus individuos es mayor comparado con una población grande y por lo tanto la fijación de alelos es superior en una población pequeña (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2005). Estos cuellos de botella, ocurren por fenómenos aleatorios e impredecibles de la naturaleza, haciendo que una población reduzca su potencial evolutivo (Hartl y Clark, 1997) y por lo tanto su poder adaptativo. Los resultados obtenidos por Pullyre *et al.*, (2008) demostraron que *T. solanivora* presenta un bajo número de haplotipos en Sur América, por lo que su potencial genético es bajo. Además, ellos concluyen que el insecto pasó por un cuello de botella. Estas interpretaciones de la biología evolutiva del insecto se pudieron generar por el tipo de marcador molecular escogido en su estudio, y por el bajo tamaño muestral.

Como lo mencionado por Villanueva-Mejía (2015) en su tesis doctoral, diferentes genes evolucionan a diferentes tasas (Hartl y Clark, 1997) y por ello, representan diferentes niveles de variabilidad genética de individuos de una misma especie o en diferentes niveles jerárquicos en la filogenia de un grupo. El *Cytb* es un gen que en insectos presenta una tasa de evolución más lenta que el gen *COI*, el primero se ha utilizado en la entomología médica para identificar especies de un mismo género y en algunos casos dentro de un mismo orden, mientras que el segundo para evaluar la diferenciación genética a nivel de especie (Freely, 2005). Esto demuestra que el nivel de resolución de un gen depende de la pregunta del investigador. Adicionalmente, diferentes genes se heredan de distinta manera (Avise, 1994; Hartl y Clark, 1997; Freely, 2005). En animales, los genes nucleares se heredan de manera biparental y sufren de recombinación, mientras que los genes mitocondriales de manera uniparental (de madres a hijos) y por lo tanto no sufren de recombinación, los primeros son los marcadores más útiles para estudiar la genética de poblaciones de una especie y los segundos para estudiar su filogeografía (Freely, 2005).

De la revisión bibliografía realizada por Villanueva y Saldamando (2013) se explicó que los estudios históricos y basados en la genética del insecto, han mostrado que *T. solanivora* es originaria de Guatemala y que en 1970 esta plaga se dispersó a otros países en Centro América, incluyendo Honduras y Costa Rica (Torres-Leguizamón *et al.*, 2011). Posteriormente, esta plaga migró a Nicaragua y Salvador debido al libre movimiento de tubérculos de papa entre países de Centro y Suramérica. *T. solanivora* fue reportada por primera vez en Suramérica, más específicamente en Venezuela en 1989 y dos años más tarde en Colombia. En 1990 fue encontrada en Ecuador (Pozo y Zambrano, 2002) y en Tenerife (Islas Canarias) (García *et al.*, 2002). El reporte más reciente de esta especie fue realizado en México (Roblero *et al.*, 2011). Dado el comportamiento migratorio de esta plaga, dos estudios separados basados en la diferenciación genética y composición haplotípica del insecto fueron realizados usando secuencias del gen mitocondrial citocromo B (*Cytb*) con muestras procedentes de Guatemala, Costa Rica, Honduras, Venezuela, Ecuador, Colombia e Islas Canarias (Pulliandre *et al.*, 2008; Torres-Leguizamón *et al.*, 2011). A partir de esos análisis, Puillyre *et al.*, (2008) concluyeron que las poblaciones de *T. solanivora* sufrieron un cuello de botella en Suramérica, mientras que Torres-Leguizamón *et al.*, (2011) infirió el comportamiento migratorio de este insecto en Centro, Suramérica y España.

Para realizar el análisis filogeográfico, Villanueva *et al.*, (2015 a) realizaron salidas de campo en las que se colectaron larvas, pupas y adultos de *T. solanivora* en los años 2011 y 2012 a partir de tubérculos infestados con el insecto procedentes de campo o almacenamiento (bodegas). Los muestreos se llevaron a cabo en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Norte de Santander y Nariño, en cultivos de papa común (*Solanum tuberosum*) y en Norte de Santander también se colectó en papa criolla (*S. phureja*). Los individuos colectados fueron clasificados, teniendo en cuenta, las claves taxonómicas dadas por Coto (1997) para Lepidópteros de la familia Gelechiidae. Una vez realizada la colecta, los especímenes fueron ubicados en tubos de plásticos que contenían etanol al 70%, mientras se trasladaron al laboratorio donde fueron almacenados a -70°C hasta su procesamiento. Para la extracción de ADN, se utilizó la técnica CTAB empleada por Salinas-Hernández y Saldamando (2011). Para la amplificación y secuenciación parcial de los genes mitocondriales del citocromo oxidasa I (*COI*) y el citocromo B (*Cytb*) se utilizaron los cebadores dados por Pulliandre *et al.* (2008) y diseñados por Villanueva *et al.* (2015 a) y después, se obtuvieron productos de amplificación y de secuenciación para 150 individuos de Colombia (120 de *S. tuberosum* y 30 de *S. phureja*). A las secuencias colombianas, se les adicionaron 427 secuencias del gen mitocondrial *Cytb* de *T. solanivora* de Guatemala, Costa Rica, Ecuador, e Islas Canarias que fueron obtenidas de las bases de datos del Genbank de los trabajos de Puillyre *et al.* (2008) y Torres-Leguizamón *et al.* (2009, 2011).

Los productos de secuenciación para los dos genes analizados en *T. solanivora* produjeron amplicones de 553 y 484 pb para los genes *COI* y *Cytb* respectivamente, a partir de 120

individuos de *T. solanivora* de Colombia, que fueron colectados exclusivamente en *S. tuberosum*. Las secuencias fueron concatenadas para realizar los posteriores análisis poblacionales quedando finalmente un fragmento de 1037 nucleótidos. Las secuencias del gen *Cytb* mostraron un alto nivel de homología genética al compararlas con secuencias de otros Lepidópteros reportados en el GenBank, usando BLAST. El polimorfismo encontrado se describe con los siguientes estimadores: $H = 7$, $\pi = 0.02228$, $Hd = 0.351$, $S = 162$, y $\theta = 0.03022$. Al comparar cada gen de manera independiente, se puede observar que el polimorfismo encontrado fue más grande para el gen *COI* que para el gen *Cytb*, dado que para *COI* se obtuvo: $H = 3$, $\pi = 0.04130$, $Hd = 0.329$, $S = 146$, y $\theta = 0.05128$ y para *Cytb*: 16 sitios polimórficos, $H = 5$, $\pi = 0.00055$, $Hd = 0.066$, $S = 16$, y $\theta = 0.00617$. Estos valores demuestran que la diversidad genética de *T. solanivora* es baja para ambos loci, puesto que sus valores fueron más bajos comparados con las secuencias del gen *COI* obtenidas por Salinas -Hernández y Saldamando (2011) con *S. frugiperda*.

Por otro lado, las frecuencias haplotípicas estimadas para los genes concatenados fueron de 95/120 para H1, 19/120 para H2, 2/120 para H6 y 1/120 para H3-H5 y H7. El Haplotipo H1 este compuesto por todos los departamentos de Colombia (Antioquia, Boyacá, Nariño y Norte de Santander), mientras que H2-H4, H6-H7 estuvieron compuestas por secuencias de Norte de Santander, y H5 por secuencias procedentes de Boyacá. La presencia del haplotipo H1 en varios departamentos del país muestra que hay movimiento de material vegetal contaminado de papa con larvas de *T. solanivora* dada su detección en varias zonas del país.

Respecto a los resultados del test de Tajima-Nei, sus valores mostraron que todos los departamentos, con la excepción de Boyacá, presentan tamaños constantes dada la neutralidad calculada para cada departamento, indicó que no están bajo presión de selección, expansión poblacional, cuello de botella o heterogeneidad de la tasa de mutación (Tabla 3.1) (Nei y Kumar, 2000). En el caso de Boyacá, la población se encuentra en expansión y este resultado no es sorprendente debido a que esta zona del país representa una de las localidades que envía el tubérculo a otras zonas del país. Este tipo de análisis del test de Tajima-Nei, representan una evaluación de la demografía de las poblaciones naturales basado en la teoría de Coalescencia y cuyo las poblaciones se encuentran en expansión, su valor $D < 0$, en contracción $D > 0$ y de tamaño constante $D = 0$. Esto se asume después de que una población natural haya sufrido un proceso de cuello de botella (Nei y Kumar 2000; Excoffier *et al.*, 2005) y ha sido ampliamente utilizado en los análisis de filogeografía ya que muchos de ellos han encontrado una relación entre estos cambios demográficos y un evento de vicarianza o geográfico que los influyere en su proceso de diferenciación genética (Freely, 2005).

Tabla 3.1. Test de neutralidad Tajima-Nei estimado para *T. solanivora* en Colombia (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).

Population	N	D (Tajima-Nei)	p
Antioquia	30	0.0000	1
Boyacá	30	-1.147	0.042
Norte de Santander	30	-0.50349	0.328
Nariño	30	0.0000	1
Mean	30	-0.41262	0.5925

Posteriormente, las secuencias concatenadas de estos genes mitocondriales también fueron empleadas para el análisis de la genética de poblaciones de este insecto, con el uso de un análisis de la varianza molecular (AMOVA), la cual produjo valores significativos, como se observa en la tabla 3.2. por lo que la especie se encuentra genéticamente diferenciada en todo el país. Como se mencionó en el capítulo sobre la genética de poblaciones de *S. frugiperda*, los datos obtenidos de una secuenciación de ADN son aptos para realizar una evaluación de la estructura genética de una población natural con el análisis de varianza molecular (AMOVA), puesto que permite llevar a cabo un análisis de la variabilidad genética al interior de una población (componente dentro de la población), entre poblaciones y en la población total (Excoffier *et al.*, 2005) y a su vez, asume que un gen posee cuatro alelos, que se representan por los cuatro nucleótidos (A, T, C, G) en cada una de las posiciones que presenta cada SNP (single nucleotide polymorphism) en la secuencia (Excoffier *et al.*, 2005).

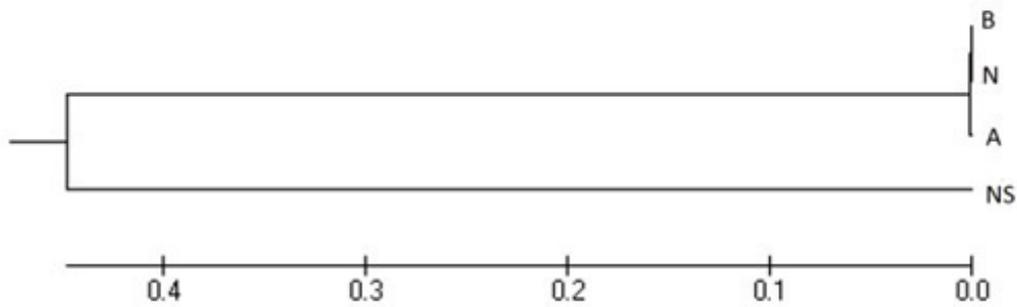
Tabla 3.2. Análisis de la estructura poblacional de *Tecia solanivora* colectada en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Norte de Santander y Nariño analizada con la secuenciación de los genes citocromo oxidasa I y citocromo b. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Fernando Villanueva Mejía).

Fuentes de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación/Pruebas de significancia
Entre poblaciones	3	861.5	9.42 Va	68.05	$F_{ST} = 0.6808$
Dentro de las poblaciones	116	513.33	4.42 Vb	31.95	$p < 0.001$
Total	119	1.374.833	762.405		

Adicionalmente, Villanueva *et al.* (2015 a) obtuvieron un dendrograma UPGMA de las secuencias concatenadas de los genes *COI* y *Cytb*, con las distancias genéticas de F_{ST} en el que se ve reflejada la diferenciación genética entre las poblaciones analizadas de *T. solanivora* de Colombia ya que se mostró una marcada distancia genética entre el departamento de Norte de

Santander y los demás departamentos muestreados (figura 3.1). Esta gran diferenciación se debe, posiblemente, al movimiento de material vegetal contaminado del cultivo de la papa entre los departamentos de Boyacá, Antioquia y Nariño, ya que Boyacá envía tubérculos a estos departamentos de Colombia, mientras que Norte de Santander no recibe tanto material externo, sino que la papa que se produce es para consumo doméstico (Villanueva *et al.*, 2015 a).

Figura. 3.1 Dendrograma UPGMA obtenido con los genes concatenados del *COI* y *Cytb* y las distancias genéticas de F_{ST} pareados entre los departamentos muestreados del insecto *T. solanivora*. A = Antioquia, B = Boyacá, N = Nariño y NS = Norte de Santander) (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).



Posteriormente, estos mismos autores emplearon las secuencias exclusivas del gen *Cytb* de *T. solanivora* obtenidas a partir de muestras del insecto tomadas en diversos países para comparar la genética de sus poblaciones y encontraron que las poblaciones de este insecto provenientes de Ecuador, Islas Canarias y Colombia se agruparon entre sí, dentro del mismo cluster genético, en el dendrograma calculado, mientras que las poblaciones de Venezuela se agruparon en un segundo cluster y Guatemala en un tercer cluster. Esta topología obtenida sugiere que Guatemala es la población de *T. solanivora* más diferenciada genéticamente al compararla con los demás países, este resultado puede ser explicado porque este país representa el centro de origen de la plaga como lo encontrado por Torres-Leguizamón *et al.* (2011) (figura 3.2).

Figura. 3.2 Dendrograma UPGMA obtenido con el gen *Cytb* y las distancias genéticas de F_{ST} pareados entre los diferentes países muestreados del insecto *T. solanivora*. E = Ecuador, C = Colombia, IC = Islas Canarias, V = Venezuela, y G = Guatemala. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).

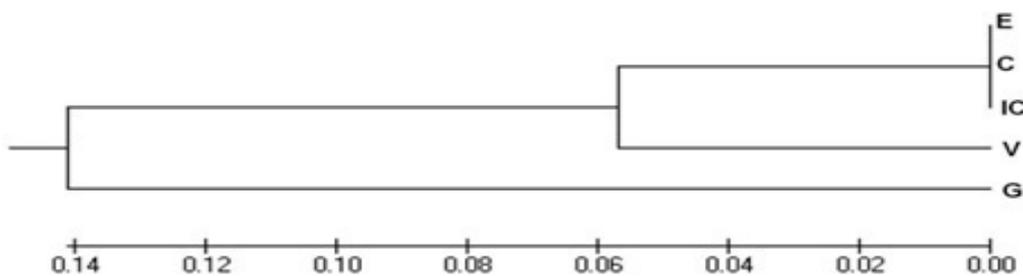


Tabla 3.3. Características de cada locus microsatélite en *T. solanivora* de Colombia, incluyendo el número de alelos totales (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), heterocigocidad esperada no sesgada (UHe) y el índice de fijación (F). (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).

Población	Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
Antioquia									
Micro	1	38	6	5.157	1.716	0.921	0.806	0.817	-0.143
Micro	2	37	7	2.590	1.273	0.297	0.614	0.622	0.516
Micro	3	35	5	3.032	1.265	0.371	0.670	0.680	0.446
Micro	4	38	4	1.632	0.665	0.211	0.387	0.392	0.456
Micro	5	38	6	4.079	1.509	0.368	0.755	0.765	0.512
Micro	6	33	4	3.170	1.199	0.061	0.685	0.695	0.911
Micro	7	38	6	4.997	1.675	0.105	0.800	0.811	0.868
Micro	8	38	5	2.722	1.222	0.132	0.633	0.641	0.792
Boyacá									
Micro	1	25	4	3.388	1.278	0.880	0.705	0.719	-0.249
Micro	2	36	4	2.554	1.082	0.194	0.608	0.617	0.680
Micro	3	38	7	3.780	1.475	0.368	0.735	0.745	0.499
Micro	4	34	5	3.099	1.206	0.441	0.677	0.687	0.349
Micro	5	38	5	2.796	1.174	0.684	0.642	0.651	-0.065
Micro	6	32	5	3.879	1.445	0.156	0.742	0.754	0.789
Micro	7	38	7	5.906	1.847	0.026	0.831	0.842	0.968
Micro	8	37	6	4.430	1.608	0.459	0.774	0.785	0.407
Norte de Santander									
Micro	1	36	7	4.909	1.738	0.944	0.796	0.808	-0.186
Micro	2	38	4	3.021	1.198	0.579	0.669	0.678	0.135
Micro	3	37	6	3.248	1.392	0.270	0.692	0.702	0.609
Micro	4	37	4	2.788	1.149	0.459	0.641	0.650	0.284
Micro	5	38	4	2.415	1.052	0.605	0.586	0.594	-0.033
Micro	6	12	2	2.000	0.693	0.000	0.500	0.522	1.000
Micro	7	38	7	4.878	1.720	0.000	0.795	0.806	1.000
Micro	8	38	4	2.938	1.185	0.132	0.660	0.668	0.801
Nariño									
Micro	1	37	9	3.574	1.669	0.568	0.720	0.730	0.212
Micro	2	37	7	2.931	1.369	0.351	0.659	0.668	0.467
Micro	3	38	6	3.198	1.408	0.500	0.687	0.696	0.273
Micro	4	38	4	2.470	1.030	0.211	0.595	0.603	0.646
Micro	5	38	4	1.904	0.790	0.368	0.475	0.481	0.224
Micro	6	25	3	1.771	0.760	0.160	0.435	0.444	0.632
Micro	7	38	4	3.967	1.382	0.000	0.748	0.758	1.000
Micro	8	38	3	2.111	0.839	0.289	0.526	0.533	0.450

Tabla 3.4. Análisis del equilibrio de Hardy Weinberg para cada locus por cada población. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).

Test de Bonferroni								
Población	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif	$\alpha=0.05/n$	α	Signif
Boyacá	Micro1	6	14.245	0.027	ns	0.05/4	0.013	ns
Antioquia	Micro1	15	63.403	0.000	***	0.05/3	0.017	*
N. Santander	Micro1	21	110.796	0.000	***	0.05/2	0.025	*
Nariño	Micro1	36	111.261	0.000	***	0.05/1	0.050	*
N. Santander	Micro2	6	12.313	0.055	ns	0.05/4	0.013	ns
Nariño	Micro2	21	43.666	0.003	ns	0.05/3	0.017	*
Antioquia	Micro2	21	120.011	0.000	***	0.05/2	0.025	*
Boyacá	Micro2	6	65.660	0.000	***	0.05/1	0.050	*
Antioquia	Micro3	10	51.572	0.000	***	0.05/4	0.013	*
Boyacá	Micro3	21	68.152	0.000	***	0.05/3	0.017	*
N. Santander	Micro3	15	68.345	0.000	***	0.05/2	0.025	*
Nariño	Micro3	15	62.670	0.000	***	0.05/1	0.050	*
Antioquia	Micro4	6	13.016	0.043	ns	0.05/4	0.013	ns
N. Santander	Micro4	6	18.364	0.005	ns	0.05/3	0.017	*
Boyacá	Micro4	10	86.867	0.000	***	0.05/2	0.025	*
Nariño	Micro4	6	66.414	0.000	***	0.05/1	0.050	*
Nariño	Micro5	6	7.257	0.298	ns	0.05/4	0.013	ns
Boyacá	Micro5	10	14.461	0.153	ns	0.05/3	0.017	ns
Antioquia	Micro5	15	50.695	0.000	***	0.05/2	0.025	*
N. Santander	Micro5	6	40.981	0.000	***	0.05/1	0.050	*
N. Santander	Micro6	1	12.000	0.001	***	0.05/4	0.013	*
Antioquia	Micro6	6	87.155	0.000	***	0.05/3	0.017	*
Boyacá	Micro6	10	79.233	0.000	***	0.05/2	0.025	*
Nariño	Micro6	3	18.948	0.000	***	0.05/1	0.050	*
Antioquia	Micro7	15	136.838	0.000	***	0.05/4	0.013	*
Boyacá	Micro7	21	217.871	0.000	***	0.05/3	0.017	*
N. Santander	Micro7	21	228.000	0.000	***	0.05/2	0.025	*
Nariño	Micro7	6	114.000	0.000	***	0.05/1	0.050	*
Nariño	Micro8	3	16.001	0.001	ns	0.05/4	0.013	*
Antioquia	Micro8	10	80.998	0.000	***	0.05/3	0.017	*
Boyacá	Micro8	15	52.812	0.000	***	0.05/2	0.025	*
N. Santander	Micro8	6	62.633	0.000	***	0.05/1	0.050	*

Por otro lado, Villanueva *et al.*, (2015b) realizaron un análisis adicional de la genética de poblaciones de *T. solanivora* con el uso de marcadores de ocho microsatélites en la especie. Ellos emplearon estos marcadores ya que habían sido previamente estandarizados por Torres-Lequizamón *et al.*, (2009) en *T. solanivora*. Además, los microsatélites fueron tenidos en cuenta, porque representan los marcadores moleculares más útiles para realizar análisis en genética de poblaciones ya que son codominantes y fáciles de estandarizar en el laboratorio (Freely 2005, Villanueva *et al.*, 2015 b). Los microsatélites consisten en loci de secuencias simples repetidas en tándem (usualmente de 5 a 20) en el genoma con una longitud de repetición mínima de 12 pares de bases (Vaughan y Lloyd, 2003; Ellegren, 2004). Los que tienen un rango de 1 a 6 nucleótidos longitud son clasificados como mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, y hexanucleótidos repetidos (van Oppen *et al.*, 2000). Estudios comparativos en insectos, con estos marcadores, han sugerido que la longitud y frecuencia del microsatélite está relacionada con el tamaño del genoma (Hancock, 1996). Debido al alto nivel de polimorfismo, confiabilidad y reproducibilidad en la genotipificación mediante PCR, estas secuencias son los marcadores moleculares de ADN más poderosas y disponibles para estudios evolutivos y de genética de poblaciones (Zhang, 2004).

El análisis de los datos obtenidos con los microsatélites reveló la presencia de 2– 9 alelos efectivos en todos los ocho microsatélites (Tabla 3.3). El microsatélite 1 produjo el mayor número de alelos (Antioquia = 6, Boyacá = 4, Norte de Santander = 7 y Nariño = 9), seguido de los microsatélites 2, 3, 4, 7 y 8, mientras que el microsatélite 6 produjo el menor número de alelos (Antioquia = 4, Boyacá = 5, Norte de Santander = 2 y Nariño = 3). Adicionalmente, los valores de las heterocigocidades observadas y esperadas fueron diferentes en todos los microsatélites, esto podría dar origen al desequilibrio de Hardy Weinberg detectado en la tabla 3.4 que posteriormente fue corregido con una prueba de Bonferroni (que permite aceptar la hipótesis nula de un análisis cuyo ha sido rechazada por las múltiples comparaciones similares realizadas en una variable). Los valores estimados de F o F_{is} también fueron altos indicó que existen mas cruzamientos dentro de cada población que entre las poblaciones analizadas o departamentos evaluados.

Posterior al análisis de HW, se realizó un análisis de la genética de las poblaciones de *T. solanivora* al comparar los datos de microsatélites obtenidos en los cuatro departamentos de Colombia y los estimadores F_{ST} y R_{ST} , este último se empleo también dado que es óptimo para usar en marcadores de microsatélites ya que esta diseñado para evaluar un marcador con múltiples heterocigotos y alelos que se producen por repeticiones en tandem (Slatkin 1985; Freely 2005). El análisis de varianza molecular obtenido para los estimadores $R_{ST} = 0.175$ ($p < 0.01$) y $F_{ST} = 0.094$ ($p < 0.01$), fueron significativos (Tabla 3.4), por lo que sugieren que las poblaciones de *T. solanivora* de Colombia están genéticamente diferenciadas. Adicionalmente, los valores F_{ST} pareados sugieren un modelo de diferenciación poblacional en la que las poblaciones de Nariño

y Norte de Santander son las más diferenciadas del resto del país (Tabla 3.5). Los microsatélites que produjeron los valores F_{ST} más altos fueron el 4, 5 y 6, mientras que los microsatélites 6 y 7 produjeron los valores F_{ST} y F_{IT} más altos (Tabla 3.6). Los valores R_{ST} obtenidos fueron más altos que los valores F_{ST} en esta especie, demostró el poder del primer estimador cuyo se aplica al análisis de los microsatélites (Slatkin,1985).

Tabla 3.5. Análisis de Varianza Molecular realizado con individuos de *T. solanivora* de poblaciones de Colombia, para obtener los estimadores F_{ST} (a) y R_{ST} (b) (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).

a)

Source	df	SSM	SEst.	Var.	%	F-Statistics	P	Nm
AmongPops	3	78.345	26.115	0.288	9%	Fst=0.094	0.010	2.422
AmongIndiv	148	630.026	4.257	1.471	48%	Fis=0.528	0.010	
WithinIndiv	152	200.000	1.316	1.316	43%	Fit=0.572	0.010	

b)

Source	df	SSM	SEst.	Var.	%	F-Statistics	P	Nm
AmongPops	3	934.296	311.432	3.704	17%	Rst=0.175	0.010	1.180
AmongIndiv	148	4423.789	29.890	12.406	59%	Ris=0.710	0.010	
WithinIndiv	152	772.000	5.079	5.079	24%	Rit=0.760	0.010	

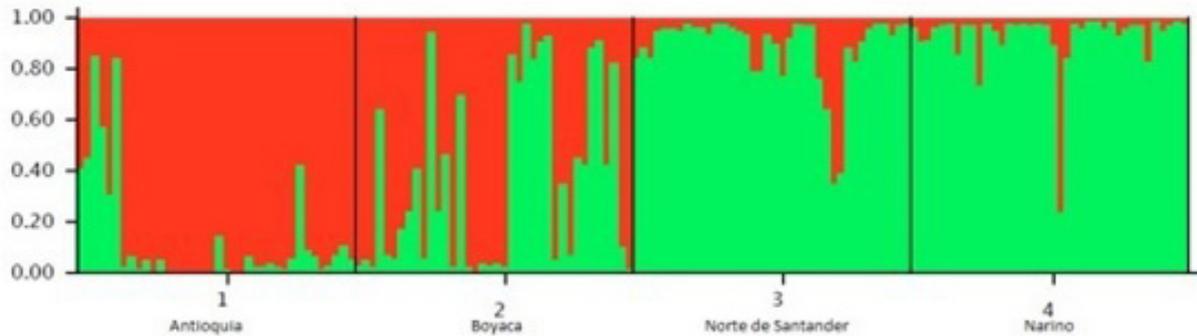
Tabla 3.6. Valores de F_{ST} pareados para las poblaciones de *T. solanivora* muestreadas en Colombia. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).

	Antioquia	Boyacá	Norte de Santander	Nariño
Antioquia				
Boyacá	0.045			
Norte de Santander	0.083	0.049		
Nariño	0.101	0.063	0.036	0.000

Finalmente, un análisis bayesiano de asignación ubicó a *T. solanivora* provenientes de las poblaciones de Norte de Santander y Nariño en un cluster, mientras que las poblaciones del insecto de Antioquia y Boyacá en otro cluster. Como se puede observar en la figura 3.3, los cuatro departamentos muestreados de Colombia, se subdividen en $K = 2$ poblaciones donde la población en rojo tiene los genotipos de *T. solanivora* de los departamentos de Antioquia y

Boyacá y la población en verde, principalmente muestra los genotipos de *T. solanivora* colectados en Nariño y Norte de Santander (figura 3.3).

Figura 3.3 Análisis de asignación Bayesiano de los genotipos de *T. solanivora* analizada con ocho marcadores de microsatélites en los departamentos e Antioquia, Boyacá, Nariño y Norte de Santander. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).



En el trabajo de Villanueva *et al.*, (2015 b), se realizó un análisis demográfico genético de las poblaciones usando el software BOTTLENECK 1.2 (Piry *et al.*, 1999; Ruíz-García *et al.*, 2013), para evaluar si una especie, ha experimentado un cuello de botella reciente. Esta evaluación se realizó, puesto que Pulliandre *et al.* (2008) sugirieron que las poblaciones de *T. solanivora* de Colombia habían sufrido de este proceso evolutivo (Tabla 3.7). Los resultados de este análisis sugieren que las poblaciones de *T. solanivora* de nuestro país, no han sufrido un reciente cuello de botella. Villanueva *et al.*, (2015 b) consideran que las diferencias obtenidas por ellos y Pulliandre *et al.*, (2008), se deben a que los últimos autores analizaron un número bajo de individuos por población en Venezuela, Ecuador y Colombia, y por lo tanto, el número de haplotipos obtenido en cada país fue bajo.

En el trabajo de Villanueva *et al.*, (2015 b) se encontró que el número de alelos encontrados para los ocho microsatélites analizados en *T. solanivora* de Colombia fue más bajo comparado con un estudio previo para esta especie realizado por Torres–Leguizamón *et al.*, (2009). Ellos encontraron de 8 hasta 22 alelos en poblaciones de Guatemala y Costa Rica, mientras que en Colombia se encontraron de 2 a 8 alelos por microsatélite. Las diferencias obtenidas entre estos dos trabajos, pueden ser por varias causas. Primero que todo, existen diferencias en la visualización de los patrones de las bandas obtenidas entre estos dos estudios, debido a que ellos usaron el método de la autoradiografía y Villanueva *et al.* (2015 b) utilizaron tinción con Nitrato de Plata. Otra posible explicación, es que Torres- Leguizamón *et al.* (2009) analizaron poblaciones de *T. solanivora* de dos países (Guatemala y Costa Rica) donde ésta especie es originaria (Torres-Leguizamón *et al.*, 2011), mientras que en esta investigación se analizaron poblaciones Colombia, donde la especie invadió al país en 1985 (Herrera, 1997). Debido a que las poblaciones fuente (ancestrales) se espera presenten una variabilidad genética mayor que las poblaciones

fundadas (invadidas), los resultados aquí obtenidos coinciden con la historia y biología evolutiva de esta especie (Villanueva *et al.*, 2015 a y b).

Tabla 3.7. Resultado con el software Bottleneck para determinar el efecto de cuellos de botella recientes en *T. solanivora* de Colombia. Ko= número de alelos observados, He= heterocigocidad esperada, Heq = heterocigocidad esperada bajo modelo de coalescencia, SD= desviación estándar, Prob= Probabilidad, SMM= Modelo de mutación paso a paso. (Tomado de la tesis de Doctorado de Diego Villanueva Mejía).

Population	locus	Ko	He	Under S.M.M.			
				Heq	S.D.	DH/sd	Prob
Antioquia	Micro 1	76	0.817	0.73	0.069	1.264	0.027
	Micro 2	74	0.622	0.773	0.055	-2.757	0.027
	Micro 3	70	0.68	0.676	0.083	0.046	0.417
	Micro 4	76	0.392	0.593	0.109	-1.849	0.059
	Micro 5	76	0.765	0.735	0.063	0.472	0.38
	Micro 6	66	0.695	0.6	0.102	0.936	0.157
	Micro 7	76	0.811	0.733	0.064	1.2	0.054
	Micro 8	76	0.641	0.679	0.083	-0.462	0.248
	Sign Test			Wilconxon test			
	SMM Prob=	0.58217		SMM Prob (One tail for H excess)=			
	Styarized differences test			0.47266			
	SMM Prob=	0.34204		Mode Shift			
				Normal L shaped distribution			
Boyacá	Micro 1	4	0.719	0.61	0.1	1.093	0.08
	Micro 2	4	0.617	0.595	0.107	0.204	0.496
	Micro 3	7	0.745	0.776	0.051	-0.609	0.224
	Micro 4	5	0.687	0.68	0.08	0.088	0.458
	Micro 5	5	0.651	0.676	0.082	-0.302	0.303
	Micro 6	5	0.754	0.682	0.075	0.958	0.149
	Micro 7	7	0.842	0.776	0.05	1.324	0.037
	Micro 8	6	0.785	0.734	0.066	0.774	0.217
	Sign Test			Wilconxon test			
	SMM Prob=	0.30167		SMM Prob (One tail for H excess)=			
	Styarized differences test			0.03711			
	SMM Prob=	0.10605		Mode Shift			
				Normal L shaped distribution			

Population	locus	Ko	He	Under S.M.M.				
				Heq	S.D.	DH/sd	Prob	
Norte de Santander	Micro 1	7	0.808	0.778	0.048	0.615	0.312	
	Micro 2	4	0.678	0.586	0.109	0.839	0.188	
	Micro 3	6	0.702	0.735	0.064	-0.523	0.238	
	Micro 4	4	0.65	0.601	0.101	0.483	0.383	
	Micro 5	4	0.594	0.597	0.108	-0.03	0.403	
	Micro 6	2	0.522	0.3	0.158	1.4	0.023	
	Micro 7	7	0.806	0.773	0.053	0.608	0.315	
	Micro 8	4	0.668	0.594	0.108	0.69	0.278	
	Sign Test			Wilconxon test				
	SMM Prob=	0.27687		SMM Prob (One tail for H excess)=				
	Styarized differences test			Mode Shift				
	SMM Prob=	0.07446		Normal L shaped distribution				
Nariño	Micro 1	9	0.73	0.830 0.038 -2.663		0.038	-2.663	0.02
	Micro 2	7	0.668	0.773 0.053 -1.982		0.053	-1.982	0.053
	Micro 3	6	0.696	0.731 0.067 -0.519		0.067	-0.519	0.239
	Micro 4	4	0.603	0.594 0.102 0.089		0.102	0.089	0.462
	Micro 5	4	0.481	0.594 0.106 -1.065		0.106	-1.065	0.135
	Micro 6	3	0.444	0.477 0.138 -0.239		0.138	-0.239	0.335
	Micro 7	4	0.758	0.598 0.106 1.505		0.106	1.505	0
	Micro 8	3	0.533	0.471 0.135 0.462		0.135	0.462	0.367
		Sign Test			Wilconxon test			
		SMM Prob=	0.17714		SMM Prob (One tail for H excess)=			
		Styarized differences test			Mode Shift			
		SMM Prob=	0.0594		Normal L shaped distribution			

Los valores obtenidos con los estimadores R_{ST} y F_{ST} con el análisis de varianza molecular (AMOVA) sugieren que *T. solanivora* de Colombia está genéticamente diferenciada, siendo el valor de R_{ST} mas alto que el valor F_{ST} corroborando los resultados obtenidos con la secuenciación de los genes mitocondriales *COI* y *Cytb*. Los valores F_{ST} pareados mostraron que las poblaciones de Boyacá y Antioquia, seguido por Boyacá y Norte de Santander, son las poblaciones genéticamente más similares. Adicionalmente, Norte de Santander y Nariño produjeron los valores F_{ST} más bajos, sugiriendo esto que existe una baja diferenciación genética entre estas dos regiones de Colombia. Los primeros resultados pueden ser explicados teniendo en cuenta que Boyacá es el principal distribuidor de papa en Colombia hacia el resto del país y que

el movimiento del tubérculo puede ser la principal causa de que exista homogenización genética entre las poblaciones de *T. solanivora* de éstas regiones en Colombia. Por otra parte, Norte de Santander fue la primera región de Colombia que ésta plaga invadió en 1985 (Herrera, 1997) y por ello, la composición genética de individuos de *T. solanivora* de esta región difiere de las otras regiones del país (Niño, 2004; Pulliandre *et al.*, 2008). Además, se debe tener en cuenta que la producción de papa en ésta región (Norte de Santander) es usada principalmente para consumo doméstico y, por lo tanto, los tubérculos de papa (principal medio de movilidad de la plaga), no se distribuye a otras regiones de Colombia. Para el caso de Nariño, se detectó la más alta diferenciación genética que en las demás regiones evaluadas. Este resultado se explica debido a que Nariño es la región con la mayor cantidad de variedades de papa *Solanum tuberosum* cultivadas en Colombia, mientras que, en el resto del país, la variedad más sembrada es Diacol capira, esto implica que Nariño representa una mayor oferta de hospederos y variada que en otras regiones de Colombia.

A pesar de haber encontrado que *T. Solanivora* de Colombia se encuentra genéticamente diferenciada, es importante mencionar que tanto los valores R_{ST} como F_{ST} encontrados son bajos. Esto podría ser explicado por la historia de colonización de esta especie en Colombia, país que invadió recientemente, ya que ocurrió en 1985 (Herrera, 1997)

Los resultados obtenidos con STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000; Evanno *et al.*, 2005) mostraron que *T. solanivora* de Colombia está diferenciada en $K=2$ poblaciones compuestas por un primer cluster que agrupa a los departamentos de Antioquia y Boyacá y un segundo cluster a Norte de Santander y Nariño. La figura de STRUCTURE muestra que Boyacá es la región que más comparte la mayoría de los genotipos entre todas las regiones evaluadas. Esto podría ser explicado por la ubicación de Boyacá (centro del país) y el papel que juega como distribuidor de papa, donde los tubérculos se transportan hacia el resto del país y adicionalmente, es una región que recibe una gran cantidad de papa procedente de otras regiones de Colombia, para que desde allí se distribuyan a otras regiones, una de ellas es Antioquia. Por otro lado, Norte de Santander fue el primer lugar que invadió *T. solanivora* en Colombia, mientras que Nariño es una de las regiones más diversas, en cuanto a variedades de papa como hospederos para esta plaga, sumando a esto su cercanía con Ecuador, país donde se produce una gran cantidad de variedades y especies de papa del género *Solanum* (Villanueva *et al.*, 2015 a).

En general, *T. solanivora* es considerada una especie monófaga mientras que *S. frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), que es una especie polífaga, (Salinas-Hernández y Saldamando-Benjumea, 2011). Estos resultados podrían ser explicados por el nivel de asociación planta hospedera-plaga, donde *T. solanivora* tiene una restricción más alta de hospederos que las otras plagas. La asociación a plantas hospederas tiene una alta relevancia sobre el nivel de diferenciación genética de los insectos, debido a que *T. solanivora* representa una especie que esta

genéticamente diferenciada por su fuerte asociación a *Solanum tuberosum* y su escasa habilidad de dispersión (Villanueva *et al.*, 2015 b).

Adicionalmente, el análisis realizado mediante el software BOTTLENECK produjo resultados que sugieren que *T. solanivora* no ha sufrido un reciente cuello de botella poblacional, tal como lo argumentó Pulliandre *et al.* (2008). Villanueva *et al.* (2015 b) sugieren que las diferencias obtenidas entre este estudio y el reportado por Pulliandre *et al.* (2008), se debe a que los últimos autores analizaron un número bajo de individuos por población en Venezuela, Ecuador y Colombia, y, por lo tanto, el número de haplotipos obtenido en cada país fue bajo. Ellos argumentaron la baja presencia de haplotipos al efecto de un cuello de botella y no por el bajo número de muestras analizadas (efecto de la deriva genética). Por el contrario, Villanueva *et al.* (2015 a) encontraron un número alto de haplotipos en *T. solanivora* de Colombia puesto que analizaron un mayor número de muestras por población (por región evaluada) y adicionalmente, por analizar dos genes mitocondriales (*Cytb* y *COI*), los cuales tienen tasas de mutación diferentes, que permitieron corroborar la incidencia de un adecuado marcador molecular para insectos en cuanto a estudios genéticos se refiere.

Finalmente, las estrategias diseñadas para el manejo integrado de *T. solanivora* en Colombia requieren la información obtenida en la tesis de Diego Fernando Villanueva, dado el flujo genético demostrado entre la región de Boyacá y las otras regiones del país. Estos resultados implican que el manejo de la plaga deberá ser diferente en Antioquia y Boyacá vs Nariño y Norte de Santander, tal como se encontró en el análisis de los F_{ST} pareados y las $K=2$ subpoblaciones determinadas usando STRUCTURE. Adicionalmente, hay una posibilidad latente de que el movimiento de genes confiera resistencia a insecticidas entre las poblaciones con alto flujo de genes, teniendo en cuenta que los alelos de resistencia podrán segregarse rápidamente a través del país gracias al patrón migratorio de *T. solanivora*. Por otro lado, individuos de *T. solanivora* de las regiones de Norte de Santander y Nariño deben ser incluidas en futuros bioensayos en los que nuevos insecticidas estén siendo evaluados en Colombia, debido a la alta riqueza alélica encontrada en estas regiones, dado que esto podría sugerir una respuesta diferencial de individuos de estas poblaciones a los controladores que se estén evaluando en el país (Agonet, 2004; Niño, 2004).

Uno de los resultados más importantes obtenidos por Villanueva-Mejía, está relacionado con los posibles hospederos que *T. solanivora* pudo haber encontrado en Colombia o en los lugares donde el insecto es considerado una plaga importante. Particularmente, el resultado se refiere al conocimiento del flujo genético que ocurre entre los individuos de los hospederos analizados, los cuales son usados por la plaga para reproducirse o no. Es por esto que futuros estudios relacionados con el tema deben ser llevados a cabo para mejorar el manejo integrado de la plaga en Centro y Suramérica, dado que la monofagia

de *T. solanivora* ha sido siempre asociada a *S. tuberosum* y por lo tanto, futuros estudios deberían concentrarse en determinar si ésta polilla utiliza otros hospederos diferentes de *S. tuberosum* y *S. phureja* para su subsistencia y reproducción.

3.3 Conclusiones generales de *Tecia solanivora*

Dentro de las conclusiones más importantes obtenidas en la polilla Guatemalteca de Colombia se encuentran los resultados que demuestran que las poblaciones de *T. solanivora* de Colombia están genéticamente estructuradas, siendo la población de Norte de Santander la más diferenciada del resto de las poblaciones, probablemente porque la papa producida en esa región es empleada principalmente, para consumo doméstico, por lo que no reciben tubérculos de otras partes del país. Esta diferenciación genética se evidenció con la secuenciación de los genes mitocondriales *COI* y *Cytb* y con los marcadores de microsatélites

Por otro lado, se encontró que, de los dos marcadores de secuencias mitocondriales, el marcador *COI* fue mejor marcador que el *Cytb*, dado que permitió evidenciar la estructura genética poblacional en Colombia y el grado de expansión de las poblaciones de *T. solanivora* de Boyacá. Además, presentó mayor diversidad genética puesto que tuvo más sitios segregantes y más haplotipos. No obstante, la diversidad genética de *T. solanivora* es menor con estos dos genes mitocondriales que la diversidad encontrada con el gen *COI* en *S. frugiperda*.

La secuenciación del gen *Cytb* de las muestras colombianas de *T. solanivora* y su comparación con las bases de datos reportadas en el Genbank de muestras del insecto de Centro y Suramérica, demostraron que las poblaciones de este insecto de Colombia, Ecuador e Islas Canarias son más cercanas genéticamente entre sí, indicó flujo genético entre ellas. Además, estas muestras fueron distantes genéticamente de las poblaciones de Venezuela, quienes a su vez son más distantes genéticamente de las poblaciones de Guatemala. Estas distancias genéticas muestran que las secuencias de poblaciones de Sur América y de Islas canarias son más cercanas entre sí que con las muestras de la población de centro América. Por lo que la migración del insecto se corrobora en este trabajo ya que se hipotetiza que provino de Guatemala y de allí invadió otros países de Sur América.

Los análisis de secuenciación de los dos genes mitocondriales analizados en este estudio, muestran que existe un flujo genético entre las poblaciones de *T. solanivora* de la papa tradicional (*Solanum tuberosum*) con la papa criolla (*S. phureja*) por lo que no hay diferenciación genética entre ellas, esto indica que la plaga utiliza ambos hospederos indistintamente.

Con el uso de los microsatélites y un análisis bayesiano de asignación de poblaciones, se logró establecer que las muestras de *T. solanivora* provenientes de cuatro departamentos de Colombia se subdividen en $K = 2$ agrupaciones genéticas donde se estima poco de flujo genético de las muestras de Boyacá al resto del país. Las poblaciones están divididas en Antioquia y Boyacá y por Nariño y Norte de Santander. Estos marcadores corroboraron los resultados obtenidos con las secuencias de genes mitocondriales, demostró que la especie se encuentra genéticamente diferenciada en el país.

Con el fin de evaluar el efecto de controladores biológicos y químicos sobre las poblaciones de *T. solanivora*, se sugiere tener en cuenta las poblaciones de Nariño y Norte de Santander dada la diversidad alélica de microsatélites encontrada en los insectos colectadas en ellas.

3.3 Referencias

- Agronet. (2014). Available from: <http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%C3%ADsticas.aspx>. Recuperado abril, 2014.
- Albernaz, K., Silva-Bryão, K., Fresia, P., Cônsoli, F., y Omoto, C. (2012). Genetic variability y demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtADN sequences. *Bulletin of Entomological Research*, 102, 333-343.
- Avise J.C.(1994). *Molecular markers, natural history y evolution*. Chapman Hall, New York. MY 511 pp 368.
- Bosa, F., Cotes, A., Fukumoto, T., Bengtsson, M., y Witzgall, P. (2005). Pheromone-mediated communication disruption in Guatemalan potato moth *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Entomología Experimentalis et Applicata*, 114, 137-142.
- Bosa, C., Cotes, A., Osorio, P., Fukumoto, T., Bengtsson, M., y Witzgall, P. (2006). Disruption of pheromone communication in *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae): Flight tunnel y field studies. *Journal of Economic Entomology*, 99, 1245–1250.
- Bosa, C., Osorio, P., Cotes, A., Bengtsson, M., Witzgall, P. y Fukumoto, T. (2008). Control of *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) through its pheromone for mating disruption. *Revista Colombiana de Entomología*, 34, 68–75.
- Coto, D. (1997). *Lepidoptera en cultivos anuales y perennes: manual de reconocimiento*. Editor, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
- De Barro, P.J. (2005). Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia. Pacific region revealed using microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 14, 3695-3718.
- Díaz-Montilla, A., Suárez-Baron, H., Gallego-Sánchez, G., Saldamando-Benjumea, C, y Tohme, J. (2013). Geographic differentiation of Colombian *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera: Crambidae) haplotypes: evidence for Solanaceae host plant association y Holdridge life zones for genetic differentiation. *Annals of Entomological Society of America*, 106, 586-597.
- Ellegren, H. (2004). Microsatélites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, 435-445.
- Espinel-Correal, C., Lery, X., Villamizar, L., Gómez, J., Zeddám, J.L., Cotes, A.M., y López-Ferber, M. (2010). Genetic y biological analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* granulo virus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Applied y Environmental Microbiology*, 76, 7617-7625.
- Espinel-Correal, C., Lopez-Ferber, M. Zeddám, J., Villamizar, L., Gomez, L., Cotes, A., y Lery, X. (2012). Experimental mixtures of *Phthorimaea operculella* granulo virus isolates provide high biological efficacy on both *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 375-381.
- Evanno, G. Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Determining the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: asimulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.

- Excoffier, L., Laval, G., y Schneider, S. (2005). Arlequin ver 3.0: An integrated software for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- García, E., Ríos-Mesa, D., y Cabrera, R. (2002). *Distribución y georeferenciación de Tecia solanivora (Povolny) (Lep: Gelechiidae) en la Isla de Tenerife*. IN: *Memorias del II Taller Internacional de Polilla Guatemalteca (Tecia solanivora)*. Avances en investigación y Manejo Integrado de la Plaga. Quito. Ecuador.
- Hancock, J.M. (1996). Simple sequences y the expyng genome. *Bioessays*, 18, 421-425.
- Hartl, D.L., y Clark, G.C. (1997). *Principles of Population Genetics*. Editorial Sinauer Associates, Sunderly.
- Herrera, F. (1997). *La polilla guatemalteca de la papa. Biología, comportamiento y prácticas de Manejo Integrado*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Regional Uno. Cundinamarca- Boyacá. Bogotá.
- Hedrick, P. H. (2005). *Genetics of populations* (3a Ed.). Editorial Jones y Bartlett, SudburyMassachusets pp 720.
- Hilje, L. (1994). Caracterización del daño de las polillas de la papa *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera:Gelechiidae).en Cartago, CostaRica. *Manejo Integrado de Plagas*, 31, 43-46.
- Hooker, W. (1980). *Compendio de enfermedades de la papa*. Editor, Centro Internacional de la Papa.
- López-Pazos, S., Rojas, A., Ospina, S., y Cerón J. (2010). Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran y a coleopteran pest. *FEMS Microbiology Letters*, 302, 93-98.
- MacLeod, A. (2005). Data sheets on quarantine pests *Tecia solanivora*. *EPPO Bulletin*, 35, 399-401.
- McCormick, M., Karlsson, C., Ochoa, M., Proffit, M., Bengtsson, M., Zuluag T... y Witzgall P. (2012). Mating Disruption of Guatemalan Potato Moth *Tecia Solanivora* by Attractive y Non-Attractive Pheromone Blends. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 63-70.
- McGinnis, S. y Madden, T.L. (2004). BLAST: at the core of a powerful y diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 32, 20-25
- Martel, A., RéJasse, A., Rousset, F., Bethenod, M., y Bourguet, D. (2003). Hostplant- associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. *Heredity*, 90, 141-149.
- Medina, R. F., Rondon, S. I., Reyna, S. M., y Dickey, A. M. (2010). Population structure of the potato tuberworm *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) in the United States. *Environmental Entomology*, 39, 1037-1042.
- Nei, M. y Kummar S. (2000). *Molecular evolution y phylogenetics*. Editorial Oxford University Press, New York
- Nibouche, S. (1998). High temperature induced diapause in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Entomología Experimentalis et Applicata*, 87, 271-274.

- Niño, L. (2004). Revisión sobre la Polilla de la Papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. *Suplemento de la Revista Latinoamericana de la Papa*. 199-200.
- Notz, A. (1995). Influencia de la Temperatura sobre la Biología de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) Criadas en Tubérculos de papa *Solanum tuberosum* L. *Boletín de Entomología Venezolana*, 11, 49–54.
- Piry, S., Luikart, G., y Cornuet, J.M. (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90, 502-503.
- Povolny, D. (1973). *Scrobipalopsis solanivora* sp. n.—A new pest of potato (*Solanum tuberosum*) from Central América. *Acta Agronómica*, 21, 143-146.
- Pozo, A., y Zambrano, J. (2002). *Tecia solanivora* en el Ecuador. Memorias I Taller Internacional sobre Prevención y Control de la Polilla Guatemalteca de la papa. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. *Centro Internacional de la Papa*. Lima. Perú. 25-27.
- Pritchard, J.K. Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Prowell, D., McMichael, M., y Silvain, J., (2004). Multilocus genetic analysis of host use, introgression, y speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*, 97, 1034–1044.
- Puillyre, N., Dupas, S., Dangles, O., Zeddani, J., Capdevielle-Dulac, C., Barbin, K... y Silvain, J. (2008). Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions*, 10, 319–333.
- Ramírez-Ríos, V, Franco-Sierra, N.D., Correa Alvarez, J., Saldamando-Benjumea, C.I., y Villanueva-Mejía, D.F. (2016). Mitochondrial genome characterization of *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) y its phylogenetic relationship with other lepidopteran insects. *Gene*, 581, 107-116.
- Roblero, E., Vera, A., y Malo, E. (2011) First report of *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) attacking the potato *Solanum tuberosum* in Mexico. *Florida Entomologist*, 94, 1055–1056.
- Ruiz-García, M. (2013). The genetic demographic history and phylogeography of the Andean Bear (*Tremarctos ornatus*) by means of microsatélites and mtADN markers (pp.129-158). In. *Molecular Population Genetics. Evolutionary Biology y Biological Conservation of Neotropical Carnivores*. Editors: Manuel Ruiz-Garcia y Joseph M. Shostell (Pontificia Universidad Javeriana. Biology Dept..Bogota. Columbia y Penn State University-Fayette. PA. US)). Nova publishers
- Saldamando, C., y Vélez-Arango, A., (2010). Host Plant Association y Genetic Structure of Corn y Rice Strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. *Neotropical Entomology*, 39, 921–929.
- Salinas-Hernández, H., y Saldamando-Bejumea, C.I. (2011). Haplotype Identification within *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Corn y Rice Strains from Colombia. *Neotropical Entomology*, 40, 421-430.

- Simmons, R., y Weller, S. (2001). Utility y Evolution of Cytochrome b in Insects. *Molecular Phylogenetics y Evolution*, 20, 196–210.
- Slatkin, M.A.(1995). Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics*, 139, 457-462.
- Torres, F. (1989). *Algunos aspectos de la biología y comportamiento de la polilla de la papa Scrobipalopsis solanivora* Povolny 1.973, (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado Táchira, Venezuela, Ph.D. dissertation.
- Torres, F. (1998). *Biología y Manejo Integrado de la polilla Centroamericana de la Papa Tecia solanivora en Venezuela*. Maracay. Venezuela. Fondo Nacional de investigaciones Agropecuarias. Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología del Estado Táchira. A, 14.
- Torres, J., Villanueva, D., Restrepo-Cadavid, G., y Arango, R. (2012). Phenotypic evaluation of two transgenic potato varieties for control of *Tecia solanivora*. *Agronomía Colombiana*, 30, 7– 14.
- Torres–Leguizamon, M., Solignac, M., Vautrin, D., Capdevielle–Dulac, C., Dupas, S., y Silvai, J. (2009). Isolation y characterization of polymorphic microsatélites in the Potato Tuber Moth *Tecia solanivora* (Povolny,1973) (Lepidoptera:Gelechiidae). *Molecular Ecology Resources*, 9, 167-1169
- Torres-Leguizamón, M., Dupas, S., Dardon, D., Gómez. Y., Niño, L., Carnero, A... y Silvain, J. (2011). Inferring native range & invasion scenarios with mitochondrial ADN: the case of *Tecia solanivora* successive north-south step-wise introductions across Central & South America. *Biological Invasions*, 13, 1505-1519.
- Valderrama, A.M., Velásquez, N., Rodríguez, E., Zapata, A., Zaidi, M., Altosaar, I., y Arango, R.E. (2007). Resistance to *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in three transgenic Andean varieties of Potato expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein. *Journal of Economical Entomology*, 100, 172-179.
- van Oppen, M.J., Rico, C., Turner, G.F., y Hewitt, G.M. (2000) Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, y shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi cichlids. *Molecular Biology y Evolution*, 17, 489-498.
- Vaughan, V., y Lloyd, A.M. (2003). An Analysis of microsatellite loci in *Arabidopsis thaliana*: mutational dynamics y application. *Genetics*, 165, 1475-1488.
- Velásquez-Vélez, M.I., Saldamando-Benjumea, C. y Ríos-Díez, J. (2011). Reproductive isolation between two populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in corn y rice fields from Central Colombia. *Annals of the Entomological Society of America*, 104, 226-233.
- Villanueva, D.F., Velásquez, N., Rodríguez, E., Orduz, S., y Arango, R.E. (2009). Molecular characterization of a Colombian *Bacillus thuringiensis* strain with activity against *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35, 130-137.

- Villanueva, D. y Saldamando, C.I. (2013). *Tecia solanivora*, Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae): una revisión sobre su origen, dispersión y estrategias de control biológico. *Ingeniería y Ciencia*, 9, 197-214.
- Villanueva-Mejía, D.F., Ramírez-Ríos, V., Arango-Isaza, R.E., y Saldamando-Benjumea, C.I. (2015a). Phylogeography of *Tecia solanivora* from Colombia Based on Cytochrome Oxydase I y Cytochrome b Mitochondrial Genes. *Southwestern Entomologist*, 40, 775-788.
- Villanueva-Mejía, D.F., Ramírez-Ríos, V., Arango-Isaza, R.E., y Saldamando-Benjumea, C.I. (2015b). Microsatellite Analysis Reveals Population Structure y Population Expansion of *Tecia solanivora* in *Solanum tuberosum* in Colombia. *Southwestern Entomologist*, 40, 37-52.
- Zhang, D. X. (2004). Lepidopteran microsatellite ADN: redundant but promising. *Trends in Ecology y Evolution*, 19, 507-509.

Capítulo 4. Aislamiento reproductivo PRECIGÓTICO COMPORTAMENTAL Y POSTCIGÓTICO en *Spodoptera frugiperda*

Autores: Clara Inés Saldamando Benjumea¹, María Isabel Velásquez-Vélez², Juan Diego Ríos-Díez³ y Kelly Estrada Pihedrahíta⁴

1. Biotecnología Vegetal Grupo UNALMED-CIB, Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos 16-223, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, cisaldam@unal.edu.co (<https://orcid.org/0000-0001-9368-8200>)
2. Laboratorio de Zoología y Ecología Acuática (LAZOECA), Universidad de los Andes, Bogotá – Colombia. Velásquez948@uniandes.edu.co (<https://orcid.org/0000-0002-4369-5186>).
3. Profesor Asociado. Grupo de investigación Fitotecnia del trópico, Universidad del Magdalena, jriosd@unimagdalena.edu.co
4. Coordinadora de investigación, Universidad de Queen, departamento de medicina, Kingston, Canadá, kaep@queensu.ca (<https://orcid.org/0009-0003-1674-707X>).

4.1 Introducción general del aislamiento reproductivo

El aislamiento reproductivo ya sea precigótico o postcigótico tiene como finalidad reducir el flujo genético entre poblaciones pertenecientes a diferentes especies (Dobzhansky, 1937), y ha sido evaluado en una gran cantidad de insectos, dentro de los que se encuentran *Chorithippus parallelus* (Zetterstedt, 1821), *Drosophila* sp., (Fallen, 1823) *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797), *Anartia fatima* (Fabricius, 1793) y *A. amathea* (Linnaeus, 1758), *Heliconius cydno* (Doubleday, 1847) y *H. melpomene* (Linnaeus, 1758), (Hewitt *et al.*, 1987; Coyne y Orr 1989a, 1989b; Pashley *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1997; Jiggins *et al.*, 2001; Presgraves 2002; Groot *et al.*, 2008, 2010). Ejemplos más recientes de estudios de aislamiento reproductivo incluyen a los diferentes linajes de *Trips tabaci* (Gennadius, 1889) (Király *et al.*, 2022), entre tres especies de polillas del género *Habenaria* (*H. limprichtii*, *H. davidii*, y *H. delavayi*) (Zhang *et al.*, 2022), entre otros.

En muchos casos, el aislamiento reproductivo involucra la discriminación existente entre machos y hembras, previo al apareamiento, el cual es denominado aislamiento precigótico, ya que evita el flujo genético entre individuos pertenecientes a dos especies distintas, que en algunos casos pueden ser razas entre diferentes especies o biotipos (Futuyma, 2005; Prowell, 1998, Coates *et al.*, 2018). Otro tipo de aislamiento reproductivo, ocurre después del apareamiento entre las especies por lo que es denominado aislamiento postcigótico y en este caso la selección natural actúa contra la hibridación (Futuyma, 2005). Dentro del aislamiento reproductivo precigótico comportamental, en las mariposas, un caso de especiación se ha dado por la evolución del comportamiento de apareamiento entre machos y hembras de una misma especie basado en el patrón de coloración alar, como se ha observado en las mariposas *Heliconius cydno* y *H. melpomene*, ya que las hembras discriminan los machos que no presentan la misma coloración en el ala y este apareamiento asociativo es más pronunciado en poblaciones simpátricas que en alopátricas (Jiggins *et al.*, 2001). Mientras que, en las polillas, Monti *et al.* (1997) encontraron que las especies *Spodoptera latifascia* (Walker, 1856) y *S. descoinsi* (Lalanne-Cassou y Silvain, 1994) no se aparean entre sí dado que sus hembras producen diferentes feromonas y además existe una reducción en el fitness de los híbridos en sus generaciones F_1 y F_2 , demostrándose que también tienen aislamiento postcigótico. En otro caso, la polilla *Zeiraphera diniana* (Guénée, 1845) divergió en dos poblaciones que se encuentran asociadas principalmente al alerce europeo y al pino cembrano (Emelianov *et al.*, 2001). Otro ejemplo interesante es la polilla del maíz *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) de Francia puesto que también divergió dos poblaciones asociadas al maíz y a la artemisa que presentan diferencias en la composición de las feromonas emitidas por sus hembras y además presentan estructura genética poblacional (Bethenod *et al.*, 2005; Martel *et al.*, 2003; Malausa *et al.*, 2005; Coates *et al.*, 2018). Finalmente, dentro de la lista de ejemplos que adicionarse, es la polilla *S. frugiperda*

la cual ha evolucionado dos biotipos principalmente asociados al maíz y al arroz en Colombia (Vélez-Arango *et al.*, 2008; Cano-Calle *et al.*, 2015).

Estudios previos sobre aislamiento reproductivo realizado en poblaciones de Estados Unidos en *S. frugiperda* han demostrado que los biotipos de esta especie presentan aislamiento precigótico y aislamiento postcigótico (Saldamando, 2010; Saldamando, 2016). El aislamiento precigótico es de cuatro tipos: 1) temporal, debido a que, en poblaciones de los Estados Unidos, se ha encontrado que ambos biotipos se aparean a diferentes tiempos durante la noche, siendo el biotipo maíz el que cópula 6 horas más temprano en la noche (Pashley *et al.*, 1992; Scholf *et al.*, 2009), esta temporalidad no se encontró en Colombia ya que ambos biotipos de aparean entre las 2 h a 3 h después de la escotofase según los resultados dados por Velásquez *et al.*, (2011), y Saldamando *et al.* (2014), en trabajos de investigación que se mostrarán en este capítulo del libro, 2) comportamental parcial, puesto que rara vez las hembras del biotipo maíz se aparean con los machos del biotipo arroz. Sin embargo, el cruce recíproco sí produce progenie (Pashley *et al.*, 1992, Prowell, 1998). Estos resultados se encontraron tanto en poblaciones de los Estados Unidos, como en poblaciones de Colombia (Saldamando *et al.*, 2014), 3) químico, ya que las hembras de cada biotipo difieren en su composición de feromonas, las cuales pueden ser (Z)11-16:Ac, (Z)7-12:Ac, (Z)9-14:Ac y (Z)9-12:Ac, siendo el primer componente significativamente más abundante en hembras del biotipo maíz y los otros en hembras del biotipo arroz (Groot *et al.*, 2008). Aunque en un trabajo realizado en Colombia y que se explica en el próximo capítulo, se encontró que los biotipos no difieren en las proporciones de las feromonas mencionadas, pero si en sus compuestos volátiles (Cañas-Hoyos *et al.*, 2017) y 4) ecológico, puesto que cada biotipo se encuentra asociado a un hospedero diferente, siendo los más utilizados los cultivos de maíz y de arroz (Prowell *et al.*, 2004; Vélez-Arango *et al.*, 2008; Cano-Calle *et al.*, 2015).

Por otro lado, los biotipos de *S. frugiperda* también presentan aislamiento postcigótico, debido a que, en resultados del insecto obtenidos de poblaciones de los Estados Unidos, los pocos híbridos obtenidos a partir de cruces entre hembras del biotipo maíz y machos del biotipo arroz son inviables, sin embargo, el cruce recíproco sí produce híbridos fértiles y viables (Nagoshi y Meagher, 2004). En el trabajo realizado por Velásquez-Vélez *et al.* (2011) que se realizó con poblaciones del insecto de Colombia, los autores encontraron una reducción en el número de masas de huevos, número de hembras, desarrollo pupal, tiempo de desarrollo pupal, longevidad de adultos y peso de pupas de las líneas F₁ y F₂ comparadas con las líneas parentales compuestas por los biotipos de *S. frugiperda*, demostrándose que el aislamiento postcigótico de la especie es una barrera relevante para la permanencia de híbridos en el campo. Los híbridos viables (reconocidos con marcadores moleculares) entre estos dos biotipos se han encontrado en la naturaleza (Prowell *et al.*, 2004) y según Pashley (1998) y Prowell *et al.* (2004) ello ha implicado que la especiación de *S. frugiperda* al parecer se haya generado

en simpatria (Prowell, 1998), explicó la existencia de zonas de hibridación de este insecto en Estados Unidos (Prowell *et al.*, 2004) y en Colombia (Vélez-Arango *et al.*, 2008). Todas estas diferencias sugieren que estos biotipos se están comportando como dos nuevas especies incipientes (Dres y Mallet 2002; Saldamando *et al.*, 2014).

Según de Saldamando *et al.*, (2014), el aislamiento reproductivo encontrado en los biotipos de *S. frugiperda* fue evidenciado por primera vez en un estudio realizado por Pashley y Martin (1987) en un experimento de no escogencia donde ellos usaron poblaciones del insecto de Puerto Rico y Louisiana (Estados Unidos). Ellos intentaron realizar evaluaciones de cruces entre machos del biotipo de maíz con hembras del biotipo de arroz provenientes de una misma localidad, sin obtener cruces exitosos ya que no produjeron progenie, ni transferencia de espermatozoides. Por el contrario, los cruces de las hembras del biotipo de arroz con machos del biotipo de maíz produjeron progenie viable y fértil (Saldamando *et al.*, 2014). Además, ellos encontraron que los machos híbridos R X C (arroz x maíz) pueden aparearse y fertilizar a hembras de los dos biotipos, pero produjeron menos progenie que los cruces de las especies parentales. Resultados similares fueron observados por Groot *et al.* (2010) con los biotipos de este insecto de la Florida. Por lo que estos resultados sugieren que el aislamiento precigótico comportamental es parcial. Adicionalmente, Pashley *et al.* (1992) demostraron que los biotipos presentan aislamiento precigótico temporal ya que el biotipo de maíz se aparean las 2/3 primeras horas de la escotofase, mientras que el de arroz las últimas 1/3 horas de la noche. En otro estudio, donde se emplearon los biotipos colectados en Georgia se encontró que los cruces en el laboratorio solo se dieron dentro de cada población de cada biotipo (Lu *et al.*, 1994).

En estudios realizados en Colombia, sobre la identificación de los biotipos de *S. frugiperda*, se encontró que ambos muestran asociación a los cultivos de maíz y arroz y a su vez que el biotipo de maíz también se puede encontrar en maíz, algodón, sorgo, caña de azúcar y el biotipo de arroz, en cultivos de arroz y pastos (Vélez-Arango *et al.*, 2008; Cano-Calle *et al.*, 2015). En estos trabajos, se sugirió que la asociación que el biotipo de maíz se puede encontrar en bajas proporciones en cultivos de arroz y el biotipo de arroz en cultivos de maíz, además se demostró que existen poblaciones híbridas entre los biotipos, siendo la población con la presencia de los marcadores *COI* y *FR* de tipo *+/+* la más frecuente y por lo tanto se determinó que es producto de cruces entre hembras del biotipo de maíz con machos del biotipo de arroz dada la herencia de cada marcador, por ello los hallazgos encontrados del aislamiento reproductivo entre los biotipos de *S. frugiperda* originaron las investigaciones de este tema que se plasman en este capítulo que a su vez proporcionó las bases para el artículo sobre aislamiento reproductivo postcigótico y comportamental entre los biotipos de *S. frugiperda* de Velásquez-Vélez *et al.*, (2011).

Para analizar el aislamiento reproductivo entre individuos de diferentes especies, es importante entender el concepto de especiación, el cual es un proceso evolutivo relacionado con el

aislamiento reproductivo que previenen o reducen el flujo genético entre poblaciones de una misma especie (Coyne y Orr, 1989; Saldamando *et al.*, 2014). Por lo que, aquellos individuos de una población son considerados de la misma especie si estos son compatibles reproductivamente entre ellos (Mayr, 1942 citado por Turelli *et al.*, 2001), éste fue uno de los conceptos más reconocidos en el campo de la biología evolutiva, y al que se le llamó “concepto biológico de especie”. Con el fin de que dos poblaciones evolucionen en dos especies genéticamente diferenciadas, es necesario la existencia de aislamiento reproductivo entre estas poblaciones, posteriormente la formación de zonas de hibridación y finalmente la especiación (Coyne y Orr 1989; Butlin, 1998; Jiggins *et al.*, 2001; Turelli *et al.*, 2001).

El aislamiento reproductivo ha sido clasificado como precigótico y postcigótico (Dobzhansky 1937; Coyne y Orr, 1989; 1998, Turelli *et al.*, 2001). El primero consiste en la evolución de barreras reproductivas que ocurren antes de la formación del cigoto y son de tipo: comportamental, temporal, espacial, químico y mecánico. Este tipo de aislamiento explica las barreras al flujo genético entre individuos de diferentes especies evitan reproducirse al momento de cruzarse. El segundo tipo de aislamiento, consiste en la evolución de barreras reproductivas que ocurren después de la formación del cigoto y consisten en producción de híbridos inviables, híbridos estériles y bajo éxito reproductivo (fitness) de los híbridos (Dobzhansky, 1937; Coyne y Orr, 1989; 1998, Butlin, 1998; Turelli *et al.*, 2001).

Dos tipos de análisis que se realizan en laboratorio han sido considerados para la ejecución de estudios del aislamiento reproductivo precigótico y postcigótico: 1) el apareamiento asociativo y 2) la obtención de progenie híbrida entre razas, especies, variedades o biotipos, respectivamente (Coyne y Orr, 1998; Bridle *et al.*, 2006; McMillan *et al.*, 1997; Velásquez-Vélez *et al.*, 2011; Saldamando *et al.*, 2014). Los experimentos de apareamiento asociativo (aislamiento reproductivo precigótico comportamental) consisten en ubicar un macho de una población A (especie, raza o biotipo) en una misma jaula con dos hembras, una de la población A y la otra de otra población B (especie, raza o biotipo) por un determinado periodo de tiempo (ejemplo: 2 a 5 horas) y viceversa (Davis *et al.*, 1997; MacMillan *et al.*, 1997; Velásquez-Vélez *et al.*, 2011). Esto con el objeto de determinar si los dos individuos se reconocen entre sí. En el caso de que los machos y hembras evaluados se reproduzcan, las dos poblaciones son consideradas de la misma especie, pero si no lo hacen, podrían demostrar que son especies verdaderas (McMillan *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 2004). Otro tipo de evaluación, es el análisis de escogencia múltiple, en el que se colocan en una misma jaula dos machos con dos hembras de poblaciones o especies diferentes, esto con el fin de determinar el aislamiento comportamental y darle la oportunidad a cada uno de escoger pareja y competir por ella (Saldamando *et al.*, 2014). Este último diseño experimental permite además de evaluar la competencia y la escogencia entre machos y hembras de las dos poblaciones, la estimación del índice de aislamiento reproductivo (I) que puede ser comparado entre diferentes especies de animales y establecer su grado de aislamiento (Bailey *et al.*, 2004).

Por otro lado, los experimentos de aislamiento postcigótico se basan en la obtención de progenie híbrida a partir de cruces entre individuos de las poblaciones A y B, si ambas poblaciones hibridan y su progenie es fértil y viable, no hay aislamiento postcigótico, pero si ellas producen progenie infértil y/o inviable (regla de Haldane), se demostraría que esta barrera de aislamiento reproductivo se está desarrollando en la especie analizada (Coyne y Orr, 1989, 1998; Haldane 1922; Kost *et al.*, 2016).

En el trabajo de investigación realizado por María Isabel Velásquez dio origen a la tesis de pregrado y a su artículo: Velásquez-Vélez *et al.* (2011). En este artículo se muestra el primer estudio del aislamiento reproductivo entre los biotipos de *S. frugiperda* en Colombia. Otros análisis de este tipo de aislamiento se han reportado en poblaciones del insecto de los Estados Unidos por Pashley *et al.* (1992) y Scholf *et al.* (2009), pero debido a que las poblaciones de *S. frugiperda* son diferentes genéticamente a las poblaciones de Estados Unidos, como lo encontró por Salinas -Hernández y Saldamando (2011).

Los biotipos de *S. frugiperda*, fueron denominados especies verdaderas por Dres y Mallet (2002) debido a que en ellos se han observado formas de aislamiento reproductivo precigótico y postcigótico de poblaciones del insecto de Estados Unidos. El aislamiento precigótico es de cuatro tipos: 1) temporal, debido a que ambos biotipos se aparean a diferentes tiempos durante la noche, siendo el biotipo maíz el que cópula 6 horas más temprano en la noche (Pashley *et al.*, 1992; Scholf *et al.*, 2009), 2) comportamental parcial, dado que rara vez las hembras del biotipo maíz se aparean con los machos del biotipo arroz. Sin embargo, el cruce recíproco sí produce progenie (Pashley *et al.*, 1992; Prowell 1998), 3) químico, ya que las hembras de cada biotipo difieren en su la composición y concentración de feromonas, las cuales pueden ser (Z)11-16:Ac, (Z)7-12:Ac, (Z)9-14:Ac y (Z)9-12:Ac, siendo los dos primeros componentes son significativamente más abundantes en hembras del biotipo maíz y los otros en hembras del biotipo arroz (Groot *et al.*, 2008) y 4) ecológico, puesto que cada biotipo se encuentra asociado a un hospedero diferente, siendo los más utilizados los cultivos de maíz y de arroz (Prowell *et al.*, 2004).

Por otro lado, los biotipos de *S. frugiperda* también presentan aislamiento postcigótico, debido a que, en Estados Unidos, los híbridos obtenidos a partir de cruces entre hembras del biotipo maíz y machos del biotipo arroz son inviables, sin embargo, el cruce recíproco sí produce híbridos fértiles y viables (Nagoshi y Meagher, 2004). Los híbridos viables (reconocidos con marcadores moleculares) entre estos dos biotipos se han encontrado en la naturaleza (Prowell *et al.*, 2004) y según Pashley (1998) y Prowell *et al.* (2004) ello ha implicado que la especiación de *S. frugiperda* al parecer se haya generado en simpatria (Prowell, 1998). Todas estas diferencias sugieren que estos biotipos se están comportó como dos especies incipientes, según los resultados obtenidos en poblaciones de este insecto de los Estados Unidos (Dres y Mallet, 2002), pero no se tiene conocimiento sobre el aislamiento reproductivo de los biotipos de *S. frugiperda* de Colombia.

4.2 Evaluación del aislamiento reproductivo en *S. frugiperda* realizado en Colombia

Para la realización del trabajo de Velásquez-Vélez *et al.* (2011), se colectaron al azar larvas (N= 200) en todos los instar de *S. frugiperda*, en cultivos de maíz y arroz, las larvas del biotipo de maíz fueron colectadas en cultivos de maíz ubicados en el municipio de Mariquita Vereda San Felipe, en el municipio de San Luis Corregimiento de Payyé, y las larvas del biotipo de arroz fueron colectadas en cultivos de arroz ubicados el municipio de Ambalema, y en el municipio de Ibagué vereda Buenos Aires, todos estos municipios se ubican en el departamento del Tolima. Las larvas colectadas (N = 100 por cultivo) se llevaron vivas al cuarto de cría ubicado en la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín para establecer una colonia. A partir de la colonia se realizaron cruces dentro y entre poblaciones muestreadas para obtener las siguientes generaciones filiales.

Para evaluar el aislamiento precigótico y temporal en las poblaciones de maíz y arroz de *S. frugiperda*, se ubicó una hembra y un macho de cada población en jaulas de 20 x 30 cm² en condiciones de oscuridad y se contabilizó el tiempo necesario para que cada pareja tuviera su primer apareamiento y también el tiempo de duración del mismo (Pashley *et al.*, 1992). Tanto machos y hembras que fueron evaluados eran vírgenes y tenían 3 días de edad. Los resultados relacionados con el aislamiento temporal se muestran en las tablas 4.1 y 4.2.

Tabla 4.1. Aislamiento precigótico comportamental medido como tiempo de apareamiento de poblaciones de maíz y arroz de *Spodoptera frugiperda*. (Tomado de la tesis de Pregrado de María Isabel Velásquez Vélez).

Carácter	N	Biotipo	Promedio	ES	Test Normalidad	Homogeneidad de varianzas	Test comparativo
Tiempo primer apareamiento (min)	10	Maíz	181.1	10.81	KS = 0.096	F= 1.83	t = 0.96
	10	Arroz	239.7	15.96	p > 0.05	p = 0.193	p = 0.35
Tiempo de cópula (min)	10	Maíz	148	7.05	KS = 0.153	F= 0.91	t = 1.77
	10	Arroz	101.5	4.37	p > 0.05	p = 0.352	p = 0.093

Los resultados del aislamiento reproductivo precigótico temporal no fueron significativos ni para el tiempo requerido por las polillas para realizar su primer apareamiento ni para el tiempo requerido durante el apareamiento (Tablas 4.1, 4.2). Estos análisis se realizaron en dos trabajos, el primero por Velásquez-Vélez *et al.* (2011) y el segundo por Saldamando *et al.* (2014) y a pesar de que sus resultados no fueron significativos, ambos siguen las mismas tendencias de las poblaciones de *S. frugiperda* evaluadas en Louisiana, analizadas por Pashley *et al.* (1992).

Las poblaciones del biotipo de arroz del Tolima, se aparean más tarde en la noche que las poblaciones del biotipo de maíz, a los 239 (3.98 h) y 181 min (3 h) después de la escotofase respectivamente. En el caso de las poblaciones de Louisiana, los individuos del biotipo de arroz se aparean a los 475.8 min (7.93h) y las del biotipo de maíz a los 210 min (3.5 h) Además, el tiempo de duración del apareamiento también son similares a los resultados obtenidos por Pashley *et al.* (1992), debido a que las poblaciones del biotipo de maíz se demoran más tiempo apareándose que las poblaciones del biotipo de arroz, tanto en Estados Unidos como en Colombia (Tolima). En Louisiana, las poblaciones del biotipo de maíz se demoran apareándose de 115 +/-17 min y las del biotipo de arroz 77 +/- 7min, mientras que las poblaciones de estos dos biotipos del Tolima, se aparean durante 148 min y 101.50 min respectivamente (Tablas 4.1 y 4.2). La diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo respecto a los de Pashley *et al.* (1992) puede atribuirse a que el número de cruces utilizados por estos autores es mayor al número de evaluaciones que realizaron en los trabajos hechos en Colombia, por esta razón no se puede descartar la posibilidad de aislamiento reproductivo temporal entre las poblaciones de *S. frugiperda* colectadas en cultivos de maíz y arroz del Tolima.

Tabla 4.2. Aislamiento precigótico comportamental medido como tiempo de apareamiento de poblaciones de maíz y arroz de *Spodoptera frugiperda* (Tomado de la tesis de Pregrado de María Isabel Velásquez Vélez).

Carácter	N	Biotipo	Promedio	ES	Test Normalidad	Homogeneidad de varianzas	Test comparativo
Tiempo primer apareamiento (min)	34	Maíz	178.2	18.7	KS = 0.114	F= 4.0	Mann Whitney U = 508.5
	23	Arroz	203.6	28.0	p <0.01	p =0.051	p = 0.35
Tiempo de cópula (min)	32	Maíz	113.4	12.3	KS = 0.104	F= 1.65	t = 0.79
	21	Arroz	93.67	7.71	p >0.05	p = 0.205	p = 0.466

En el trabajo de Saldamando *et al.* (2014), se realizaron varias estimaciones del aislamiento reproductivo comportamental entre los biotipos de *S. frugiperda* del Tolima, la primera consistió en la determinación del índice de aislamiento reproductivo (I) (Gilbert y Starmer 1985, Coyne *et al.*, 2002), a partir de múltiples cruzamientos de escogencia en el que se ubicaron 2 hembras vírgenes y 2 machos vírgenes de cada biotipo en una jaula y se esperó el tiempo requerido para realizar la primera cópula, todos los adultos tenían 3 días de vida.

El índice de aislamiento reproductivo (I) tiene en cuenta el número de apareamientos entre cuatro tipos de parejas: Homotípicas: donde A = machos del biotipo de maíz x hembras del biotipo de maíz, D = machos del biotipo de arroz x hembras del biotipo de arroz. Heterotípico: donde B = machos del biotipo maíz x hembras del biotipo arroz y C = machos del biotipo de arroz

x hembras del biotipo maíz, N = número total de apareamientos observados (A + B + C + D) (Gilbert y Starmer, 1985; Coyne *et al.*, 2002). Este índice fue calculado con la siguiente fórmula $I = 4(AD-BC)/N^2$.

En la segunda estimación, Saldamando *et al.* (2014) obtuvieron una tabla de contingencia con test de Montecarlo y test de Fisher. En este análisis se quiso determinar si el apareamiento entre los biotipos de *S. frugiperda* de realizaban de manera independiente.

El tercer método se basó en un método de la máxima verosimilitud para estimar el grado de aislamiento entre biotipos (I) y la propensión de apareamiento de las hembras evaluadas (Davis *et al.*, 1997, McMillan *et al.*, 1997). Los apareamientos serán separados en cuatro categorías. Los modelos para analizar los apareamientos tendrán en cuenta los parámetros: a) I = índice de aislamiento, -1 significa apareamiento no asociativo y 1 apareamiento asociativo, b) Vm = propensión de apareamiento de la hembra de maíz (relativo al macho de maíz), c) Wm = propensión de apareamiento del macho de maíz (relativo a la hembra de maíz). Los parámetros Wa (propensión de apareamiento del macho de arroz (relativo a la hembra de arroz)) y Va (propensión de apareamiento de la hembra de arroz (relativo al macho de arroz)), tomaron los valores de 1 para la máxima verosimilitud (Bailey *et al.*, 2004).

Las probabilidades esperadas para los cuatro tipos de apareamiento son: a) Hembra de maíz con macho de maíz (m x m), $p_{mm} = (V_m / (V_m + V_a)) \times (W_m / (W_m + W_a)) + I/4$, b) Hembra de maíz con macho de arroz (m x a), $p_{ma} = (V_m / (V_m + V_a)) \times (W_a / (W_m + W_a)) - I/4$, c) Hembra de arroz con macho de maíz (a x m), $p_{am} = (V_a / (V_m + V_a)) \times (W_m / (W_m + W_a)) - I/4$, d) Hembra de arroz con macho de arroz (a x a), $p_{aa} = (V_a / (V_m + V_a)) \times (W_a / (W_m + W_a)) + I/4$. La optimización para la obtención del mejor estimador de cada parámetro y sus errores estándar se realizaron con varias iteraciones y el logaritmo de la verosimilitud se calculó como en Davis *et al.* (1997). Fueron evaluados cuatro modelos: 1) Apareamiento aleatorio, donde las propensiones de apareamiento se asumirán como iguales entre los sexos e $I = 0$, 2) Propensión de apareamiento, cuyo $I = 0$ y los valores de Wm y Vm son estimados, 3) Apareamiento asociativo, donde las propensiones de apareamiento se asumen como iguales entre los sexos y por ello I fue estimado y finalmente, 4) Apareamiento asociativo y propensión de apareamiento, donde I, Va y Wa fueron estimados por medio de iteraciones siguiendo los modelos utilizados por Davis *et al.* (1997) para llegar a su máxima verosimilitud. Estos tres tipos de análisis llegaron a los siguientes resultados (Tablas 4.3, 4.4 y 4.5).

Los resultados obtenidos con la estimación del índice de aislamiento basados en el índice de chi cuadrado (Gilbert y Starmer, 1985), produjeron un valor de: $I = 4[(13 \times 7) - (1 \times 10)] / 31^2 = 0.33$. Demostró que el apareamiento entre los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* es asociativo.

No obstante, este resultado muestra que el apareamiento asociativo es parcial ya que las frecuencias de apareamiento entre los biotipos son de 0.41 en el biotipo de maíz, 0.32 en el biotipo de arroz, 0.22 entre las hembras del biotipo de arroz con los machos de maíz y 0.032 entre el cruce recíproco. Adicionalmente, en la tabla 2.3 se observa que los apareamientos entre las hembras del biotipo de maíz con los machos del biotipo de arroz son los más reducidos puesto que solo ocurrieron una sola vez, mientras que los demás apareamientos generaron valores muy similares. Esto sugiere que, el apareamiento entre los biotipos es asociativo, pero parcialmente puesto que en el cruce recíproco se observa que las hembras del biotipo de arroz se aparean igualmente con los machos de ambos biotipos (Tabla 4.3).

Por otro lado, los resultados de la tabla 4.4 muestran que para calcular el índice de aislamiento reproductivo con el método de la máxima verosimilitud (ML) se requería tener en cuenta varios parámetros dentro de los cuales, la mejor estimación tuvo en cuenta los parámetros del índice de aislamiento y la propensión de apareamiento teniendo en cuenta solo al macho, el valor del índice estimado fue de 0.33 y la mayor propensión de apareamiento se dio en el macho del biotipo de maíz con un valor de 3.141 indicó que el macho del biotipo de maíz es 3 veces más propenso a buscar a la hembra que el macho del biotipo de arroz.

Tabla 4.3 Apareamientos entre los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* del departamento del Tolima (C= Biotipo maíz, R= Biotipo arroz). (Tomado del informe de pasantía (PAE) de Kelly Estrada Piedrahíta).

		C ♂	R ♂
	C ♀	13 (10.38)	1 (3.61)
	R ♀	10 (12.61)	7 (4.38)
Tabla de Contingencia	$\chi^2 = 4.64$	df = 1	p = 0.031
Monte Carlo test	$\chi^2 = 145.29$	df = 1	p < 0.0001
Fisher test		p = 0.0437	

En el estudio de Saldamando *et al.* (2014), los autores utilizaron métodos de máxima verosimilitud para estimar la propensión de apareamiento y el índice de aislamiento reproductivo entre los biotipos de *S. frugiperda* del Tolima. Schölf *et al.* (2011) también realizaron análisis con este método, pero Saldamando *et al.* (2014), también llevaron a cabo análisis de apareamiento utilizó un método de múltiple escogencia, por lo que se le dio la oportunidad a cada sexo de escoger su pareja, a diferencia de Schölf *et al.* (2011) ya que ellos no tuvieron en cuenta la escogencia de pareja de manera simultánea. No obstante, en ambos trabajos se obtuvieron índices de aislamiento reproductivo muy similares ya que Saldamando *et al.* (2014), obtuvieron un valor de I = 0.34 y Schölf *et al.* (2011) de I = 0.35 para los cruces en los que las hembras del biotipo maíz escogían a los machos de ambos biotipos y para el cruce contrario ellos encontraron un valor de I = 0.44. Para esos experimentos, ellos usaron las hembras de maíz temprano

en la noche y las de arroz tarde en la noche. En el caso de Saldamando *et al.* (2014), solo se usaron tétradas para evaluar este tipo de aislamiento. No obstante, ambos trabajos se apoyan mutuamente puesto que demuestran un aislamiento comportamental parcial entre los biotipos de *S. frugiperda*.

Respecto a los análisis de aislamiento comportamental encontrado en otros insectos, en el caso de las mariposas *Anartia fatima* y *A. amathea* ($I = 0.12$) (Davies *et al.*, 1997). El aislamiento reproductivo encontrado entre los biotipos de *S. frugiperda* es alto por lo que el aislamiento comportamental ha evolucionado más rápido para esta polilla que para estas dos especies de mariposas. *Anartia fatima* y *A. amathea* son dos especies de mariposas que producen una zona de hibridación en Panamá que tiene un tamaño de 10 km de ancho donde producen híbridos de la generación F_1 y retrocruces (Davies *et al.*, 1997). Estas dos mariposas, al igual que los biotipos de *S. frugiperda* han evolucionado aislamiento postcigótico, por lo que también son otro ejemplo de la regla de Haldane (Davies *et al.*, 1997; Velásquez-Vélez *et al.*, 2011), ya que esta regla sugiere que cruces entre dos entidades genéticas diferentes o especies producen híbridos estériles o inviables. En el caso de los biotipos de *S. frugiperda* Drès y Mallet (2002) sugieren que ambos son dos especies que se encuentran evolucionado barreras de aislamiento al flujo genético.

Saldamando *et al.* (2014) también realizaron un análisis del aislamiento temporal entre los biotipos de maíz y arroz y a diferencia de los trabajos de Schölf *et al.* (2009, 2011) y Pashley *et al.* (1992), no se encontró que fuera significativo entre estas dos poblaciones. Esto se debe muy probablemente al bajo número de cruces analizados de Colombia. No obstante, Saldamando *et al.* (2014) encontraron que el tiempo requerido para realizar el primer apareamiento fue de 2.9 h después de la escotofase para el biotipo de maíz y de 3.4 h para el biotipo de arroz, siguiendo la misma tendencia observada por Pashley *et al.* (1992) y Schölf *et al.* (2009), por lo que se puede sugerir que, en esta especie, el biotipo de maíz se aparee temprano en la noche y el de arroz mucho más tarde.

Adicionalmente, en el análisis del aislamiento postcigótico (Tabla 4.5, 4.6) entre los biotipos de *S. frugiperda* de Colombia (departamento del Tolima), Velásquez-Vélez *et al.* (2011) evaluaron varias características relacionadas con el éxito reproductivo de las poblaciones, las cuales fueron: tiempo de preoviposición, número de posturas producidas por hembra, porcentaje de eclosión, número de masas de huevos producidos por hembra, tiempo de incubación, número de larvas que alcanzaron el tercer instar, ciclo larval, número de lavas muertas, tiempo de desarrollo pupal, número de adultos por postura (machos y hembras), relación hembra/macho, tiempo de vida de machos y hembras y sus respectivos pesos de pupas (Tabla 4.5 y 4.6). De estas características, muchas de ellas fueron significativamente diferentes para las líneas parentales, F_1 y F_2 , entre las que se encuentran:

Número de masas de huevos producidas por hembra perteneciente a cada línea, debido a que la línea que produjo la mayor cantidad de huevos fue el cruce de individuos del cultivo de maíz y la que no produjo masas fue la línea $F_{2(2)}$, significó que esta última presenta problemas en su fitness (éxito reproductivo) a nivel reproductivo, esta línea provino de cruces entre individuos pertenecientes a la $F_{1(1)}$ que fueron hembras de maíz x machos de arroz.

b) Número de larvas que alcanzaron el tercer instar, ya que, por un lado, la línea $F_{2(1)}$ no produjo larvas y, por otro lado, la línea $F_{1(1)}$ produjo el menor número de larvas en este instar, significó que el fitness de estos dos cruces es menor comparado con las líneas parentales y la línea $F_{1(2)}$ que produjo el mayor número de larvas, quizás por un efecto de vigor híbrido.

c) Número total de adultos producidos por línea, dado que la línea que produjo un mayor número de adultos fue la $F_{1(2)}$ mostró presentar un tipo de vigor híbrido, esta línea es el producto de cruces entre hembras de arroz x machos de maíz, además la línea que no produjo adultos fue la $F_{2(1)}$ mostró de nuevo presentar problemas con su fitness a nivel de viabilidad de sus individuos. Es importante anotar que el número de adultos producidos por las líneas de maíz y arroz de *S. frugiperda* no difieren entre sí, las líneas que presentan una gran variación en el número de adultos son los híbridos $F_{1(1)}$, $F_{2(1)}$ y $F_{2(2)}$ obtenidos a partir de ellas, a excepción de la línea $F_{1(2)}$. Un aspecto importante para anotar en esta característica radica en el hecho que se las líneas $F_{1(2)}$ y $F_{2(2)}$ produjeron un menor número de hembras respecto al número de machos, lo cual válida la regla de Haldane (Haldane, 1922) en la cual Haldane afirma que una de las consecuencias de cruces entre dos taxones que se encuentran evolucionó barreras de aislamiento reproductivo es la reducción en la viabilidad y/o fertilidad en híbridos pertenecientes al sexo heterogamético, que en el caso (los lepidópteros), es la hembra.

d) El tiempo de desarrollo larval por cruce también fue significativo, puesto que las larvas pertenecientes a las dos líneas de la generación F_1 se desarrollaron más rápido que las demás líneas de *S. frugiperda* con una diferencia de hasta 4 días, lo cual puede resultar importante para el ciclo de vida de una polilla. Por otro lado, el tiempo de desarrollo larval de las poblaciones de maíz y arroz no difirieron entre sí.

e) El tiempo de incubación de los huevos por parte de las hembras de cada cruce fue significativamente diferente, especialmente en el caso de la línea $F_{1(1)}$, ya que fue la más demorada en la incubación de los huevos. Por otro lado, estos tiempos no difieren entre las líneas de maíz y arroz de *S. frugiperda*, ni tampoco con las líneas de la generación F_2 .

f) El tiempo de vida o longevidad de los adultos de cada uno de los cruces fue significativo, ya que en el caso de los machos, la línea de maíz fue la menos longeva y las más longevas fueron la línea de arroz y la $F_{2(2)}$, de manera similar en las hembras las líneas de arroz, $F_{1(1)}$, $F_{1(2)}$ y $F_{2(2)}$.

fueron más longevas, comparado con las hembras de maíz, demostró que la tasa de supervivencia entre las líneas de maíz y arroz difieren entre sí y que sus híbridos tienen un tiempo de vida superior a sus parentales.

g) El peso de las pupas pertenecientes a las líneas de *S. frugiperda* también fueron significativamente diferentes debido a que los pesos de las hembras pertenecientes a las líneas $F_{1(1)}$, $F_{1(2)}$ fueron los más bajos, sugiriendo que el sexo heterogamético en los híbridos entre las poblaciones de maíz y arroz de *S. frugiperda* pueden producir hembras de menor tamaño, lo cual también puede incidir en el fitness de éstos comparado con el fitness de las hembras de sus líneas parentales. Respecto a los machos, los híbridos pertenecientes a la línea $F_{1(2)}$ fueron los únicos que presentaron los pesos más bajos y por lo tanto su fitness también podría ser menor comparado con las líneas parentales.

Tabla 4.4. Estimaciones del índice de aislamiento reproductivo (I) y de las propensiones de apareamiento de machos y hembras utilizó el método de la máxima verosimilitud (ML) en los biotipos de *S. frugiperda* del departamento del Tolima, Colombia. Estimadores de los parámetros obtenidos basados en la obtención del mejor modelo basado en el criterio Aikake $AIC = 2 \times$ el mejor modelo que se encuentran en negrilla. (Tomado de la pasantía (PAE) de Kelly Estrada Piedrahíta).

Modelo	Parámetros estimados							
	Índice de aislamiento	MP =Propensión de apareamiento del macho (relativo al macho de arroz, fijo en 1)	MP =Propensión de apareamiento de la hembra relativo al macho de arroz, fijo en 1)	ML	AIC	Índice de aislamiento	MP macho maíz	MP hembra maíz
I+MP solo el macho	Si	Si	No	-36.61	77.21	0.340	3.141	1.000
I+MP	Si	Si	Si	-36.46	78.92	0.338	2.859	0.824
MP solo el macho	No	Si	No	-39.19	80.38	0.000	2.875	1.000
MP	No	Si	Si	-39.04	82.09	0.000	2.876	0.824
I+MP solo la hembra	Si	No	Si	-40.25	84.50	0.441	1.000	0.527
I	Si	No	No	-41.65	85.30	0.290	1.000	1.000
Null	No	No	No	-42.98	85.95	0.000	1.000	1.000
MP solo la hembra	No	No	Si	-42.83	87.66	0.000	1.000	0.824

Tabla 4.5. Características del aislamiento postcigótico evaluado en líneas de *S. frugiperda* de maíz y arroz mantenidas en condiciones de laboratorio (NA = no aplica).

Línea	Maíz N=15		Arroz N= 20		F1(1) N= 4		F2 N= 4		F1(2) N=4		F2 N=4	
	Promedio	SE	Promedio	SE	Promedio	SE	Promedio	SE	Promedio	SE	Promedio	SE
Característica/Localidad	San Felipe* San luis		Buenos aires		♀maíz	♂arroz	F1(1) x F1(1)		♀arroz	♂maíz	F1(2) x F1(2)	
Tiempo de preoviposición (días)	3.46	0.47	3.78	0.38	6.25	2.72	NA	NA	3.00	0.58	4.00	0.81
Número de Posturas por hembra	2.33	0.70	3.35	0.69	2.75	0.50	0.00	0.00	3.25	0.48	2.25	0.75
Porcentaje de eclosión (%)	0.77		0.73		0.45		0.00		0.85		0.75	
Número de masas de huevos por hembra	3.10	0.08	2.47	0.03	2.00	0.16	0.00	0.00	1.46	0.06	2.56	0.06
Tiempo de incubación (días)	3.00	0.01	2.83	0.01	3.60	0.11	NA	NA	3.00	0.06	2.63	0.09
Número de Larvas que alcanzaron 3er instar	39.97	1.48	42.76	0.85	18.55	2.63	0.00	0.00	59.38	4.62	29.67	4.77
Ciclo larval (días)	20.46	0.17	21.48	0.09	17.67	0.77	NA	NA	17.56	0.34	21.75	0.33
Número de larvas muertas	42.62	9.25	42.94	7.28	33.80	12.80	NA	NA	59.90	15.20	29.70	10.70
Tiempo de pupación (días)	10.48	0.29	10.95	0.27	10.66	0.33	NA	NA	10.38	0.18	12.11	0.48
Número de adultos por postura	9.68	0.25	8.59	0.17	7.00	0.63	0.00	0.00	17.88	2.93	5.56	1.09
Número de machos	5.24	0.78	4.47	0.66	3.40	1.03	0.00	0.00	10.50	4.66	3.88	2.49
Número de hembras	4.48	0.66	4.14	0.58	3.60	0.87	0.00	0.00	7.38	3.60	2.38	1.24
Tiempo de vida machos (días)	5.82	0.16	10.33	0.37	8.25	0.59	NA	NA	7.50	0.25	9.75	0.66
Tiempo de vida hembras (días)	7.36	0.15	12.40	0.30	12.25	1.48	NA	NA	11.75	0.38	11.25	1.25
Pesos pupas hembras (g)	0.179	0.0012	0.1842	0.0016	0.1701	0.0020			0.1569	0.0006	0.1541	0.0018
Peso pupas machos (g)	0.183	0.0007	0.1800	0.0010	0.1971	0.0030			0.1682	0.0005	0.1711	0.0009

Tabla 4.6. Análisis estadístico del aislamiento postcigótico entre poblaciones de maíz y arroz de *S. frugiperda*. (Tomado de la tesis de Pregrado de María Isabel Velásquez Vélez).

Característica	Normalidad	Igualdad de Varianza	Prueba estadística
	Kolmogorov-Smirnov (Ks)	Bartlett (B), Levene (L)	KW = Kruskal Wallis o
			Anova 1 vía
Tiempo de preoviposición	Media= 3.514	B=1.19	KW
	ds=1.407	p=0.88	H= 2.74
	N=37	L=0.17	GL= 4
	Ks=0.183	p=0.953	p= 0.601
	p<0.01		
Número de posturas	Media= 2.647	B=8.5	KW
	ds= 2.591	p=0.075	H=9.50
	N= 51	L=1.42	GL=5
	Ks= 0.164	p=0.237	p=0.091
	p<0.01		
Número de masas de huevos	Media= 2.450	B=45.55	KW
	ds=2.219	p<0.0001	H=16.31
	N=149	L=3.83	GL=5
	Ks=0.225	p=0.003	p=0.006
	P<0.01		
Número de larvas 3er instar	Media=39.59	B=6.43	KW
	ds=51.49	p=0.169	H=13.94
	N=138	L=0.99	GL=5
	Ks=0.001	p=0.424	p=0.016
	p<0.01		
Número de larvas muertas	Media= 42.41	B=3.26	KW
	ds=47.81	p=0.516	H=4.79
	N=100	L=0.19	GL=4
	Ks=0.188	p=0.943	p=0.310
	p<0.01		
Número total de adultos	Media= 8.91	B=32.81	KW
	ds=10.09	P=0.0001	H=18.84
	N=100	L=2.08	GL=5
	Ks=0.189	p=0.075	p=0.002
	P<0.01		
Tiempo de desarrollo larval	Media= 20.76	B=2.75	KW
	ds=3.942	p=0.6	H=8.76
	N=91	L=.25	GL=4
	Ks=0.157	p=0.907	p=0.067
	p<0.01		
			Anova 1 vía
			F= 2.92
			GL = 131,37
			p= 0.039

Característica	Normalidad	Igualdad de Varianza	Prueba estadística
	Kolmogorov-Smirnov (Ks)	Bartlett (B), Levene (L)	KW = Kruskal Wallis o
Relación macho/hembra	Media= 1.453	B=8.84	KW
	ds=1.128	p=0.065	H=2.40
	N=95	L=0.72	GL=4
	Ks=0.182	p=0.579	p=0.66
	p<0.01		
Tiempo en pupa	Media= 10.87	B=11.14	KW
	ds=1.557	P=0.025	H=7.05
	N=85	L=2.79	GL=4
	Ks=.0159	p=0.032	p=0.133
	p<0.01		
Tiempo de incubación	Media= 2.919	B=0.651	KW
	ds=0.565	P=0.164	H=11.15
	N=99	L=2.01	GL=4
	Ks=0.355	p=0.099	p=0.025
	p<0.01		
Tiempo de vida (longevidad)	Media= 9.353	B=23.01	KW
	dsL=3.780	p=0.006	H=28.85
	N=68	L=1.91	GL=9
	Ks=0.169	p=0.069	p=0.001
	p<0.01		
Peso de las pupas (gr)	Media= 0.1727	B=11.12	KW
	ds=0.03442	P=0.267	H=32.95
	N=321	L=1.04	GL=9
	Ks=0.070	p=0.410	p=0.0001
	p<0.01		
			Anova 1 vía
			F= 4.01
			GL = 9,311
			p= 0.0001

4.3 Conclusiones sobre el aislamiento comportamental y postcigótico de *S. frugiperda*

Estudios sobre el aislamiento reproductivo precigótico han demostrado ser una de las barreras más importantes contra el flujo genético, particularmente, entre especies que han evolucionado en simpatría (Jiggins *et al.*, 2001; Drès y Mallet 2002; Bailey *et al.*, 2004; Schölf *et al.*, 2011) o en alo simpatría (Coyne y Orr, 2004). En particular, la especiación es un proceso que se facilita entre las especies de insectos, cuyo muestran una especialización hacia un hospedero y a su vez un aislamiento comportamental (Bailey *et al.*, 2004; Jiggins *et al.*, 2001).

En los insectos fitófagos, el aislamiento reproductivo comportamental entre diferentes especies o la evolución de este aislamiento entre poblaciones de una misma especie en vía de especiación, en conjunto con la selección natural disruptiva ha generado evidencia que sugiere especiación simpátrica entre ellos (Thomas *et al.*, 2003; Schölf *et al.*, 2011) ya que el apareamiento asociativo junto con un cambio alocrónico o temporal de las épocas de apareamiento pueden actuar paralelamente para evitar el flujo genético entre poblaciones de distintas especies o razas (biotipos) de una misma especie (Saldamando *et al.*, 2014).

El aislamiento reproductivo comportamental ha sido ampliamente evaluado en especies de insectos que pueden ser mantenidos en condiciones de laboratorio y se han realizado en muchas investigaciones con las moscas de la fruta del género *Drosophila* sp. (Coyne y Orr 1989a, b, 1997, 1998). Sin embargo, también ha sido examinado en otras especies como en *Heliconius* sp., *Anartia* sp., *Chorthippus* sp. *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera frugiperda* (Jiggins *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 1997; Tregenza *et al.*, 2000; Bailey *et al.*, 2004; Malausa *et al.*, 2005; Pashley *et al.*, 1992; Schölf *et al.*, 2011 respectivamente). Adicionalmente, el aislamiento químico también ha sido ampliamente evaluado en polillas (*Spodoptera* sp. Monti *et al.*, 1997; Groot *et al.*, 2008), al igual que el aislamiento mecánico (*Carabus* subgénero *Ohomopterus*, Usami *et al.*, 2006) y el aislamiento temporal (*Ostrinia nubilalis* y *Spodoptera frugiperda*: Bethenod *et al.*, 2005; Schölf *et al.*, 2009).

En el caso de los biotipos de *S. frugiperda*, Prowell (1998) argumentó que ambas poblaciones han evolucionado las barreras al flujo genético en simpatria, puesto que ambos coexisten en varias poblaciones contiguas de maíz y arroz en los Estados Unidos y a pesar de ello, el biotipo de maíz se encuentra más frecuentemente en cultivos de maíz y el de arroz, en arroz y pastos. Esta evolución según ella se debe a que los genes relacionados con el aislamiento reproductivo se encuentran en el cromosoma sexual Z (o X en humanos) y puesto que los machos son ZZ y las hembras ZY, este tipo de genética ha facilitado la divergencia entre estas dos poblaciones. Tanto en Estados Unidos como en Colombia, se ha podido evidenciar que existe aislamiento comportamental entre los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda*, ya que los machos del biotipo de maíz presentan mayor propensión de apareamiento que los machos del biotipo de arroz, por lo que muestran más atracción hacia las hembras de su mismo biotipo y además son exitosos en los cruces con las hembras del biotipo arroz. En el trabajo realizado por Saldamando *et al.* (2014) se evidenció este tipo de apareamiento en un experimento de múltiple escogencia, en el que el índice de aislamiento reproductivo de $I = 0.34$ demuestra que las poblaciones de este insecto se encuentran en un proceso de especiación y que este valor es mayor al encontrado en otros estudios realizados con *Anartia* sp. indicó que son especies incipientes.

Adicionalmente, los resultados del aislamiento postcigótico encontrado en Colombia, por Velásquez-Vélez *et al.* (2011) también evidencian que la selección natural se encuentra en contra

de la hibridación entre estos dos biotipos ya que los híbridos de las generaciones F_1 y F_2 encontraron entre ellos presentan inviabilidad y esterilidad híbrida. Otro aspecto importante para mencionar esta relacionado con los resultados obtenidos por Velásquez -Vélez *et al.* (2011), ya que apoyan la regla de Haldane, puesto que esta argumenta que los híbridos entre dos entidades biológicas diferentes o especies pueden sufrir una reducción en su fitness, una inviabilidad o esterilidad particularmente en el sexo heterogamético que en el caso de los lepidópteros es la hembra. Adicionalmente, estos resultados también corroboran los trabajos realizados por Pashley y Martin (1987) en el que ellos observaron que los cruces entre hembras de maíz con machos de arroz no producen una gran cantidad de progenie y que, si esta era viable, la F_2 obtenida de los mismos presentaba una reducción en el fitness. Además, Pashley y Martin (1987) también observaron que el cruce recíproco entre hembras de arroz con machos de maíz no presentaron problemas con su fitness. Los mismos resultados fueron obtenidos para las poblaciones de *S. frugiperda* del Tolima, dado que el cruce $F_{1(1)}$ representa a cruces entre hembras de maíz con machos de arroz, uno de los cruces evaluados con menor fitness.

Hoy en día, estudios sobre la genómica de poblaciones de *S. frugiperda* ha mostrado la importancia del cromosoma sexual Z en la diferenciación genética entre los biotipos del insecto, ya que se encuentra en el cromosoma 29 y este cromosoma también interacciona con el cromosoma 3 y el 12 del insecto (Fiteni *et al.*, 2022). Estos hallazgos apoyan aun más la teoría de la regla de Haldane. Además, Gouin *et al.* (2017) compararon los genomas de los biotipos de *S. frugiperda* y encontraron que las dos han divergido hace 2 millones de años, lo cual es un tiempo de diferenciación muy corto y a pesar de ello, han evolucionado barreras al flujo genético, indicó la posibilidad de especiación simpátrica ya que la distribución de ambas poblaciones es ubicua, por lo que no hay evidencia de barreras geográficas al flujo genético entre los biotipos tanto en el hemisferio occidental, como en el oriental, siendo este último invadido por el insecto desde 2016 en África y su posterior dispersión en Asia (Goergen *et al.*, 2016; Fiteni *et al.*, 2022).

Por otro lado, resultados similares a los encontrados en el aislamiento postcigótico de *S. frugiperda*, se han evidenciado en otros Lepidoptera, como es el caso de las mariposas *Heliconius melpomene* y *H. cydno*, puesto que las hembras de la generación F_1 son estériles (Naisbit *et al.*, 2002). Presgraves (2002) demostró que la regla de Haldane es muy común en el orden Lepidoptera, dado el gran efecto del cromosoma sexual X o en el caso de los Lepidopteros Z en el grupo. Velásquez-Vélez *et al.* (2011) apoyaron la hipótesis de Presgraves puesto que la generación F_1 (\downarrow) produjo una menor cantidad de larvas y adultos demostró que la fertilidad de las hembras de la F_1 es baja. Adicionalmente, la eclosión de cada línea híbrida fue también baja (45%) comparada con las demás (75% en promedio). Se observó además una baja producción de huevos en las hembras híbridas, al igual que una reducción en el peso de sus pupas comparado con las líneas parentales y un menor número de adultos machos y hembras en las generaciones F_1 y F_2 .

Velásquez-Vélez *et al.* (2011) sugirieron que la especiación en Lepidóptera se debe especialmente al efecto del cromosoma sexual X como lo indicado por Prowell (1998). Posteriores estudios realizados por Kost *et al.* (2016) con los biotipos de *S. frugiperda* provenientes de Estados Unidos apoyaron la hipótesis de Velásquez-Vélez *et al.* (2011) puesto que ellos encontraron que los genes que generan una reducción en la fertilidad en las generaciones híbridas entre estas dos poblaciones, se encuentran en el cromosoma Z de la especie. Este último trabajo se basó en realizar análisis de mapeo genético de los genes *Tpi*, *637*, *tan*, *2087*, *acj6*, *esterasa clock* y *kettin* y la técnica Fluorescent in situ hybridization. Ellos encontraron que el gen de la esterilidad se encuentra cercano a los genes *637*, *acj6*, *tan*, y *2087* del cromosoma sexual de la polilla. Igualmente, los estudios de la genómica poblacional de los biotipos de *S. frugiperda* realizados por Fiteni *et al.* (2022) demostraron la importancia del cromosoma sexual Z en la diferenciación genética entre sus poblaciones, implicó que este cromosoma es importante en el proceso de especiación del insecto.

Finalmente, los resultados obtenidos respecto al aislamiento reproductivo pre y postcigótico de *S. frugiperda* y sus biotipos de Colombia, son importantes para la agricultura de este país y para su manejo integrado de plagas ya que el flujo reducido entre estas dos poblaciones puede ser usado de una manera ventajosa para el control de sus poblaciones si en el campo se liberan hembras de la generación F_1 que se crucen con machos en la naturaleza y generen híbridos con bajos fitness en la naturaleza que a su vez se aparean con poblaciones naturales reduciendo su capacidad de adaptación en el medio ambiente en el que se encuentran.

4.4 Referencias

- Bailey, R.I., Thomas, C.D., y Butlin, R.K. (2004). Premating barriers to gene exchange y their implications in a mosaic hybrid zone between *Chorthippus brunneus* y *Chorthippus jacobsi*. *Journal of Evolutionary Biology*, 17, 108 -119.
- Bethenod, M.T., Thomas, Y., Rousset, F., Frerot, B., Pelozuelo, L., Denestier, G., y Bourget, D. (2005.) Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. II: Assortative mating a host plant preferences for oviposition. *Heredity*, 94, 264 -270.
- Bridle, B.W, Julian, R., Shewen, P.E., Vaillancourt, J.P., y Kaushik, A.K. (2006). T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 70, 183-90.
- Butlin, R.K. (1998). What do hybrid zones in general, and the *Chorthippus parallelus* zone in particular, tell us about speciation? In: *Endless Forms: Species y Speciation* (D. J. Howard y S. H. Berlocher, eds), Oxford University Press, New York, 367– 378
- Cano-Calle, D., Arango-Isaza R. E., y Saldamando-Benjumea C. I. (2015). Molecular identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains in Colombia by using a PCR-RFLP of the mitochondrial gene cytochrome oxydase I (COI) y a PCR of the gene FR (For Rice). *Annals of Entomological Society of America*, 108, 172-180
- Cañas-Hoyos, N., Lobo-Echeverri T., y Saldamando-Benjumea C.I. (2017). Chemical Composition of Female Sexual Glycs of *Spodoptera frugiperda* Corn y Rice Strains from Tolima, Colombia. *Southwestern Entomologist*, 42, 375-394.
- Coates, B.S., Dopman, E.B., Wanner, K.W., y Sappington, T.W. (2018). Genomic mechanisms of sympatric ecological y sexual divergence in a model agricultural pest, the European corn borer. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 50-56.
- Coyne, J.A., y Orr, H.A. (1989a) .*Two rules of speciation*. En *Speciation y its consequences*, D. Otte y J.A. Endler. Editor Sinauer associates, Sunderly, Mass, 180-207.
- Coyne, J.A., y Orr, H.A. (1989b). Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution*, 43, 362-381.
- Coyne J.A., y Orr H.A. (1997). Patterns of Speciation in *Drosophila*. Revisited. *Evolution*, 51, 295-303.
- Coyne, J.A., Elwyn, S., Kim, S.Y., y Llopart, A. (2004). Genetic studies of two sister species in the *Drosophila melanogaster* subgroup, *D. yakuba* y *D. santomea*. *Genetics Research (Cambridge)*, 84, 11-26.
- Gilbert, D. G., y Starmer, W. T. (1985). Statistics of sexual isolation. *Evolution*, 39, 1380–1383.
- Davies, N., Aiello, A., Mallet, J., Pominankowski, A., y Silberglied, R. E. (1997). Speciation in two Neotropical butterflies: extending Haldane’s rule. *Proceeding of the royal Society Biological sciences*, 264, 845-851.
- Drès, M., y J. Mallet. (2002). Host races in plant-feeding insects y their importance sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 357, 471- 492

- Dobzhansky, Th. (1937) *Genetics y the Origin of Species* (Ed. 2da). Columbia University Press, New York.
- Emelianov, I., Drès, M., Baltensweiler, W., y Mallet, J. (2001). Host-induced assortative mating in host races of the larchmoth. *Evolution*, 55, 2002-2010.
- Fiteni, E., Dury, K., Gimenez, S., Meagher, R. L., Legeai, F., Kergoat, G. J... y Nam, K. (2022) Host-plant adaptation as a driver of incipient speciation in the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *BMC Ecology y Evolution*, 22, 133.
- Futuyma, D.F. (2005). *Evolution* (Ed 3ra). Sinauer Associates, 603.
- Király, K.D., Ladányi, M., y Fail, J. (2022). Reproductive Isolation in the Cryptic Species Complex of a Key Pest: Analysis of Mating y Rejection Behaviour of Onion Thrips (Thrips tabaci Lindeman). *Biology*, 11, 396.
- Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., y Tamò, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West y Central África. *PloS One*, 11, e0165632
- Gouin, A., Bretaudeau, A., Nam, K., Gimenez, S., Aury, J-M., Duvic, B... y Fournier, P. (2017). Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Scientific Reports*, 7, 11816.
- Hartl, D.L., y Clark, G.C. (1997). *Principles of Population Genetics*. Editorial Sinauer Associates, Sunderland.
- Groot, A. T., Marr, M., Schölf, G., Lorenz, S., Svatos, A., y Heckel, D. G. (2008). Host strain species sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. *Frontiers, Zoology*, 5, 20.
- Groot, A. T., Marr, M., Heckel, D.J., y Schölf, G. (2010). The roles y interactions of reproductive isolation mechanisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Ecological Entomology*, 35, 105-118.
- Haldane, J.B.S. (1922). Sex ratio y unisexual sterility in animal hybrids. *Journal of Genetics*, 12, 193-197.
- Hewitt, G. M., Butlin, R.K., y East, T.M. (1987). Testicular dysfunction in hybrids between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus paralellus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 31, 25-34.
- Jiggins, C.D., Linares, M., Naisbit, R.E., Salazar, C. Yang, Z.H., y Mallet, J. (2001). Sex-linked hybrid sterility in a butterfly. *Evolution*, 55, 1631-1638.
- Kost, S. Heckel, D.G., Yoshido, A., Marec, F., y Groot A.T. (2016). A Z-linked sterility locus causes sexual abstinence in hybrid females y facilitates speciation in *Spodoptera frugiperda*. *Evolution*, 70, 1418–1427.
- Lu, Y.J., Kochert, G.D., Isenhour, D.J., y Adang, M. J. (1994). Molecular characterization of a strain-specific repeated ADN sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Molecular Biology*, 3, 123–130.
- Malausa, T., Bethenod, M. T., Bontemps, A., Bourget, D., Cournet, J.M., y Ponsard, S. (2005). Assortative mating in sympatric host races of the European corn borer. *Science*, 308, 258 -260.

- Martel, C., Réjasse A., Rousset, F., Bethenod, M. T., y Bourguet, D. (2003). Host-plant-associated genetic differentiation in northern French populations of the European corn borer. *Heredity*, 90, 141-149.
- McMillan, W.O, Jiggins, C.D., y Mallet, J. (1997) What initiates speciation in passion-vine butterflies? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 8628– 8633.
- Monti, L., Genermont, J., Malosse, C., y Lalanne-Cassou, B. (1997). A genetic analysis of some components of reproductive isolation between two closely related species, *Spodoptera latifascia* (Walker) y *S. descoinsi* (Lalanne Cassou y Silvain) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 10, 121-134
- Naisbit, R.E., Jiggins, C.D., Linares, .M, Salazar C., y Mallet, J. (2002). Hybrid sterility, Haldane’s rule y speciation in *Heliconius cydno* y *H. melpomene*. *Race*, 1526, 1517–1526
- Nagoshi, R.D., y Meagher, R. L. (2004). Behavior y distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. *Florida Entomologist*, 87, 440 – 448.
- Pashley, D. P., y Martin, J.A. (1987). Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Entomological Society of America*, 80, 731–733.
- Pashley, D. P., Hammond, A. M., y Hardy, T.N. (1992). Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 104, 826-833.
- Presgraves, D.C. (2002) Patterns of postzygotic isolation in Lepidoptera. *Evolution*, 56, 1168-1183.
- Prowell, D.P. (1998). *Sex linkage y speciation in Lepidoptera*. Editors Howard, D., Berlocher, S. Endless forms: *Species y speciation*. Oxford University Press, New York. , 309 -319.
- Prowell, D. P., McMichael, M., y Silvain, J. F. (2004). Multilocus genetic analysis of host use, introgression y speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97, 1034 -1044.
- Quisenberry, S.S. (1991). Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strain reproductive compatibility. *Florida Entomology*, 74, 194–199.
- Saldamando, C. I., y Vélez-Arango, A.M. (2010). Host plant association y genetic differentiation of corn y rice Strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. *Neotropical Entomology*, 39, 921-929.
- Saldamando-Benjumea, C.I., Estrada-Piedrahíta, K., Velásquez-Vélez, M.I., y Bailey R.I. (2014). Assortative mating y lack of temporality between corn y rice strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) from Central Colombia. *Journal of Insect Behavior*, 27, 555–566.
- Saldamando, C. I. (2016). Biología Evolutiva de Tres Insectos de Importancia Económica de Colombia: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera, Crambidae), *Tecia solanivora* (Lepidopetera, Gelechiidae). *Boletín del Museo de Entomología Francisco Luis Gallego*, 8, 6-28

- Salinas-Hernández, H., y Saldamando-Benjumea, C.I. (2011). Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains from Colombia. *Neotropical Entomology*, 40, 421-430.
- Schöfl, G., Heckel, D.G., y Groot, A.T. (2009). Time-shifted reproductive behaviors among fall armyworm (Noctuidae: *Spodoptera frugiperda*) host strains: evidence for differing modes of inheritance. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 1447-1459.
- Schöfl, G., Dill, A., Heckel, D.G., y Groot, A.T. (2011). Allochronic separation versus mate choice: nonryom patterns of mating between fall armyworm host strains. *American Naturalist*, 177,470–485.
- Thomas, Y., Bethenod, M-T., Pelozuelo, L., Frérot, B., y Bourguet, D. (2003). Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis hubner* i. sex pheromone, moth emergence timing, y parasitism. *Evolution*, 57, 261–273.
- Tregenza, T., Buckley, S.H., Pritchard, V.S., y Butlin, R.K. (2000). Inter y intra-population effects of sex y age on epicuticular composition of meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 257– 278.
- Turelli, M. y Orr, H. A. (2000) Dominance, epistasis y the genetics of postzygotic isolation. *Genetics*, 154,1663–1679.
- Turelli, M., Barton, N.H., y Coyne J.A. (2001). Theory y speciation. *Trends in Ecology y Evolution*, 16, 330-343.
- Usami, T., Yokoyama, J., Kubota, K., y Kawata, M. (2006). Genital lock-y-key system y premating isolation by mate preference in carabid beetles (*Carabus* subgenus *Ohomopterus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 87, 145-154.
- Velásquez-Vélez, M. I, Saldamando-Benjumea, C.I., y Ríos-Díez J.D. (2011). Reproductive Isolation between Two Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Collected in Corn y Rice Fields from Central Colombia. *Annals of the Entomological Society of America*, 104, 826–83.
- Vélez-Arango, A. M., Arango, R. E., Villanueva, D., Aguilera, E. y Saldamando, C. I. (2008). Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*, 34, 145-150.
- Whitford F., Quisenberry S.S, Riley T.J., y Lee J.W. (1988). Oviposition preference, mating compatibility, y development of two fall armyworm strains. *Florida Entomology*, 71, 234–243.
- Zhang, H-P., Tao, Z-B., Trunschke, J., Shrestha, M., Scaccabarozzi, D., Wang H., y Ren Z-X (2022). Reproductive Isolation Among Three Nocturnal Moth-Pollinated Sympatric *Habenaria* Species (Orchidaceae). *Frontiers in Plant Science*, 13, 908852.

CAPÍTULO 5. AISLAMIENTO PRECIGÓTICO QUÍMICO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Autores: Norelly Cañas-Hoyos¹, Tatiana Lobo Echeverri² y Clara Inés Saldamando Benjumea³

1. Ingeniera Biológica, M.Sc. Bosques y conservación ambiental, Universidad Nacional de Colombia, ncanas@unal.edu.co (<https://orcid.org/0009-0007-1902-1935>).
2. Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia—Sede Medellín, Colombia, tloboe@unal.edu.co (<https://pub.orcid.org/v3.0/0000-0002-2609>)
3. Biotecnología Vegetal Grupo UNALMED-CIB, Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos 16-223, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, cisaldam@unal.edu.co(<https://orcid.org/0000-0001-9368-8200>)

5.1 Introducción del aislamiento reproductivo químico de *S. frugiperda*

Como se mencionó en el capítulo anterior, otro tipo de aislamiento precigótico, es el aislamiento químico. Este tipo de aislamiento ha evolucionado especialmente en las polillas y tiene relación con el sistema de comunicación entre hembras y machos que depende en gran parte de las feromonas emitidas por ellas (Jurenka, 2004). Las feromonas, hacen parte de unas sustancias producidas por los animales como señales de comunicación que son denominadas semioquímicos (Reddy y Guerrero, 2004). La función de estas, es inducir una reacción atrayente entre los individuos de una misma especie (Reddy y Guerrero, 2004; Jurenka 2004). No obstante, en la naturaleza también existen otros tipos de semioquímicos, que son las sustancias aleloquímicas. Estas sustancias, son secretadas por una especie, para generar una reacción en otra especie (Reddy y Guerrero, 2004). Dentro de los aleloquímicos se encuentran las kairomonas (que son emitidas por individuos de una especie y que benefician a otra especie a expensas de la primera (i. e. relación depredador y presa) y las alomonas (que son producidas por una especie y afectan a la especie receptora, (i. e. interacción planta e insecto) (Moraes *et al.*, 2008).

S. frugiperda es una polilla de la familia Noctuidae, la cual se caracteriza por presentar un alto número de especies consideradas plagas, por ello, diversos estudios de composición química de las feromonas se han realizado en ellos dado que pueden ser empleadas en la naturaleza para atraer a los machos y ayudar a realizar estudios de monitoreos de las especies (Cañas-Hoyos *et al.*, 2017; Jurenka 2004; Groot *et al.*, 2008; Groot *et al.*, 2010). En Colombia, se ha logrado identificar la presencia de dos biotipos denominados “biotipos de maíz y arroz”, el biotipo de maíz se encuentra principalmente asociado a los cultivos de maíz (*Zea mays* L), algodón (*Gossypium hirsutum* L), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y el biotipo de arroz, se encuentra principalmente en cultivos de arroz (*Oryza sativum* L). (Cano-Calle *et al.*, 2015). A nivel de larva, los biotipos son idénticos morfológicamente, pero pueden ser distinguidos con el uso de marcadores moleculares, entre ellos marcadores de esterasas, RFLPs, AFLPs, *COI*, y *NAD* (Pashley, 1986; Levy *et al.*, 2002; Nagoshi y Meagher 2003, 2004; Prowell *et al.*, 2004; Vélez-Arango *et al.*, 2008; Cano-Calle *et al.*, 2015). Sin embargo, los adultos pueden ser diferenciados con el uso de la morfometría geométrica, teniendo en cuenta las variables de la forma y tamaño de sus alas (Cañas-Hoyos *et al.*, 2014). El aislamiento reproductivo entre los biotipos es pre y postcigótico (Pashley y Martin, 1987; Pashley *et al.*, 1992; Groot *et al.*, 2010; Schölf *et al.*, 2011; Velásquez-Vélez *et al.*, 2011; Saldamando *et al.*, 2014). En el aislamiento precigótico, la especie ha evolucionado un aislamiento comportamental puesto que las hembras del biotipo de maíz casi no se aparean con los machos del biotipo de arroz y en los Estados Unidos el biotipo de maíz se aparean 6h antes que el biotipo de arroz, ya que el biotipo de maíz se aparean 3h después de la escotofase y

el de arroz 9h después (Pashley *et al.*, 1992; Schölf *et al.*, 2011; Saldamando *et al.*, 2014). No obstante, en Colombia no se ha logrado demostrar que existe aislamiento precigótico temporal, debido a que los biotipos no muestran marcadas diferencias en la hora de la noche al aparearse, pero el biotipo de maíz se aparee más temprano que el de arroz (Velásquez-Vélez *et al.*, 2011; Saldamando *et al.*, 2014). Respecto al aislamiento ecológico, se puede decir que existe una asociación al hospedero más amplia en el biotipo de maíz, ya que se ha reportado en maíz, algodón, sorgo y caña de azúcar, mientras que el de arroz en arroz, maíz y pastos principalmente (Cano-Calle *et al.*, 2015). Sobre el aislamiento precigótico químico, en estudios realizados por Groot *et al.* (2008), se evidenció diferencias en la concentración (proporción) de feromonas entre los biotipos de *S. frugiperda* en poblaciones de esta especie colectadas en Florida (Estados Unidos), las feromonas encontradas fueron: (Z)-7-dodecenil acetato, (Z)-9-dodecenil acetato, (Z)-11-hexadecenil acetato y (Z)-9-tetradecenil acetato (abreviado como (Z)7-12:Ac, (Z)9-12:Ac, (Z)11-16:Ac, (Z)9-14:Ac, respectivamente). Por el contrario, Lima y McNeil (2009) encontraron que las diferencias en las proporciones de las feromonas referenciadas por Groot *et al.* (2008) no se dan en todas las poblaciones de *S. frugiperda* de Estados Unidos, puesto que ellos encontraron resultados contrarios a los evidenciados por Groot *et al.* (2008). Una posible explicación a estos resultados se debe a las muestras de origen, ya que Lima y McNeil (2009) evaluaron poblaciones del insecto originarias de Louisiana y Groot *et al.* (2008) de Florida.

Puesto que Salinas-Hernández y Saldamando (2011), demostraron que existe diferenciación genética entre las poblaciones de *S. frugiperda* de Estados Unidos y Colombia, según los resultados de secuenciación del gen mitocondrial *COI*, y los autores concluyeron que el manejo del insecto debe ser realizado de una manera diferente entre los dos países. Además, dado que, Ríos-Díez y Saldamando -Benjumea (2011) demostraron que el biotipo de maíz tolera más rápidamente las endotoxinas Cry1Ac y Cry1Ab que el biotipo de arroz y Ríos-Díez *et al.* (2012) encontraron que el biotipo de arroz tolera mejor los insecticidas lambda-cialotrina y metomil que el biotipo de maíz. El propósito del trabajo de Cañas-Hoyos *et al.* (2017) fue ampliar el conocimiento de los compuestos volátiles emitidos por los biotipos de *S. frugiperda* dado que este tipo de estudios, no solamente es importante para el estudio de su aislamiento reproductivo químico, sino que también, es relevante para la mejora del manejo del insecto ya que desde este trabajo se determinó la presencia de las feromonas encontradas en previos estudios en la especie y la diferenciación de los compuestos volátiles emitidos por las hembras de los biotipos del insecto. Esta investigación, se origina de la tesis de Maestría en Bosques y Conservación de Norely Cañas Hoyos y demostró que los biotipos difieren parcialmente en sus compuestos por lo que el estudio de los semioquímicos puede ser una nueva alternativa de manejo del insecto en campo debidos a que, no solamente las feromonas, sino las kairomonas y alomonas son importantes en la comunicación intra (entre los biotipos) e interespecífica (entre la planta hospedera y cada biotipo) respectivamente.

5.2 Investigación del aislamiento químico realizada en Colombia

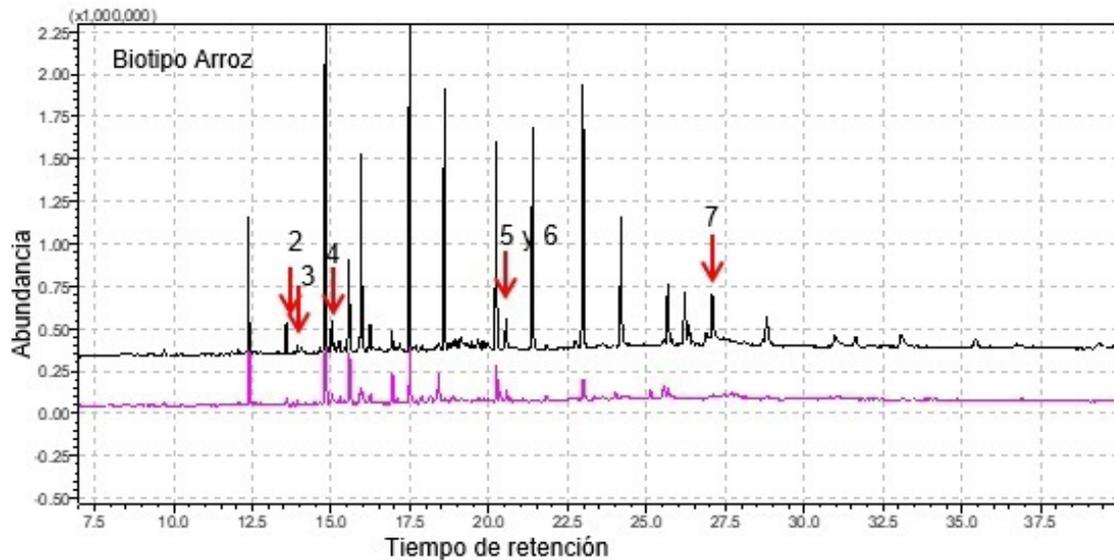
Para la realización de este estudio, Cañas-Hoyos *et al.* (2017) trabajaron con la colonia de *S. frugiperda* mantenida en el laboratorio entre los años 2009 y 2013. Para el análisis de los compuestos volátiles, se emplearon 180 hembras de cada biotipo de 3 días de edad y vírgenes. Los adultos de la colonia fueron sometidos a un fotoperiodo invertido de 14 horas en luz y 10 en oscuridad. Las hembras fueron empleadas para la extracción de las glándulas sexuales, después de la realización de un experimento en la que las hembras se separaron en dos grupos, que fueron evaluados por triplicado cada uno: a) 10 hembras ubicadas en una jaula en presencia de 3 machos y b) en ausencia de los machos. Esto con el fin de establecer si había un efecto del macho en la emisión de compuestos volátiles. A estas hembras, además, se les separó en tres grupos a los que se les extrajo las glándulas durante diferentes tiempos (3h, 6h y 10h) de escotofase (oscuridad) para determinar a qué hora en la noche producen más compuestos volátiles.

Los análisis de detección de compuestos volátiles se realizaron con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Esta técnica consiste en la combinación de la capacidad de separación que presenta el cromatógrafo de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas por lo que permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad (Sarria-Villa *et al.*, 2021). Esta detección, se realizó con los extractos de las glándulas después de su filtración. Posteriormente, para la detección de los compuestos volátiles, se tomaron cada uno de los picos de retención de los compuestos obtenidos de las glándulas, teniendo en cuenta el tiempo de retención y abundancia de cada uno de ellos. Cada compuesto fue analizado con el programa Lab solution, GCMS Solution 4.20 y con el software AMDIS-32. Los datos obtenidos fueron comparados con la librería de NI_{ST} y la base de datos The Pherobase (El-Sayed, 2016).

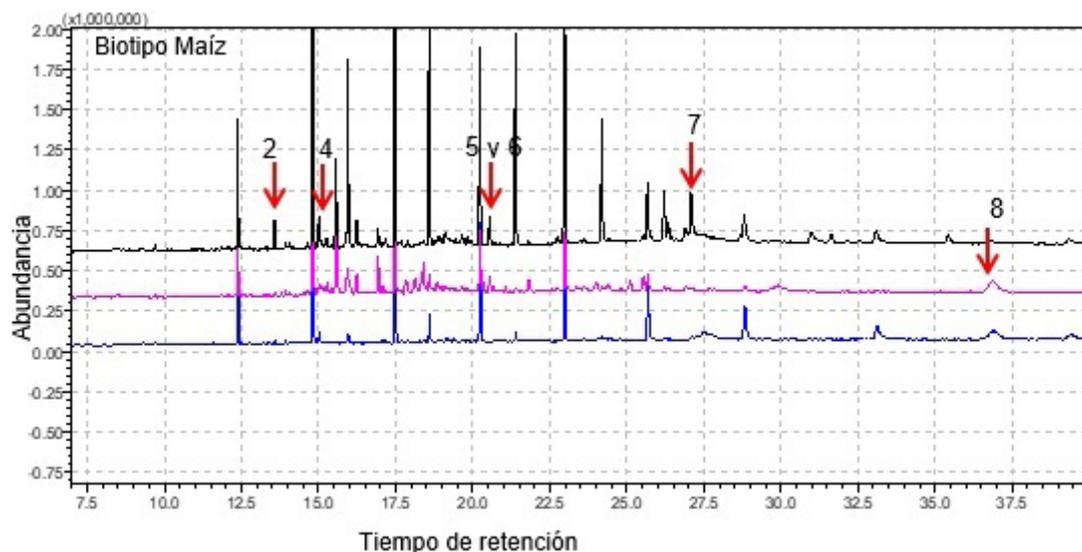
Al comparar el contenido de glándulas extraídas a las 3, 6 y 9 horas de oscuridad se logró observar que el mayor número de picos está presente a las 6 horas para ambos biotipos (figura 5.1, 5.2). Además, la producción de compuestos en la glándula sexual fue abundante y hubo un mayor número de picos cuyo la extracción se hizo a partir de hembras que permanecieron en presencia de los machos en las jaulas, estos machos se utilizaron para estimular a las hembras tanto del biotipo de arroz como el biotipo de maíz. Se detectaron un total de 27 compuestos en las glándulas sexuales de *S. frugiperda* en ambos biotipos, de los cuales 10 se hallaron exclusivamente en hembras del biotipo de arroz, 8 exclusivamente en las de maíz, mientras que 9 compuestos fueron comunes a ambos biotipos (figura 5.3).

Figura 5.1 Cromatogramas de extractos de glándulas sexuales de hembras de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* extraídas a las 3, 6 y 10 horas de oscuridad. Negro = 3 horas, Rosado = 6 Horas y Azul = 10 horas. **1.** D-Limoneno, **2.** (E,E)-2,4-Decadienal, **3.** Hexadecanal, **4.** 1-Dodecanol, **5.** (Z)7-12:Ac, **6.** (Z)9-14:Ac, **7.** Metil estearato, **8.** Heneicosano. Los picos no rotulados corresponden al solvente o compuestos indeterminados. (Tomado de la tesis de Maestría de Norely Cañas Hoyos).

a)



b)



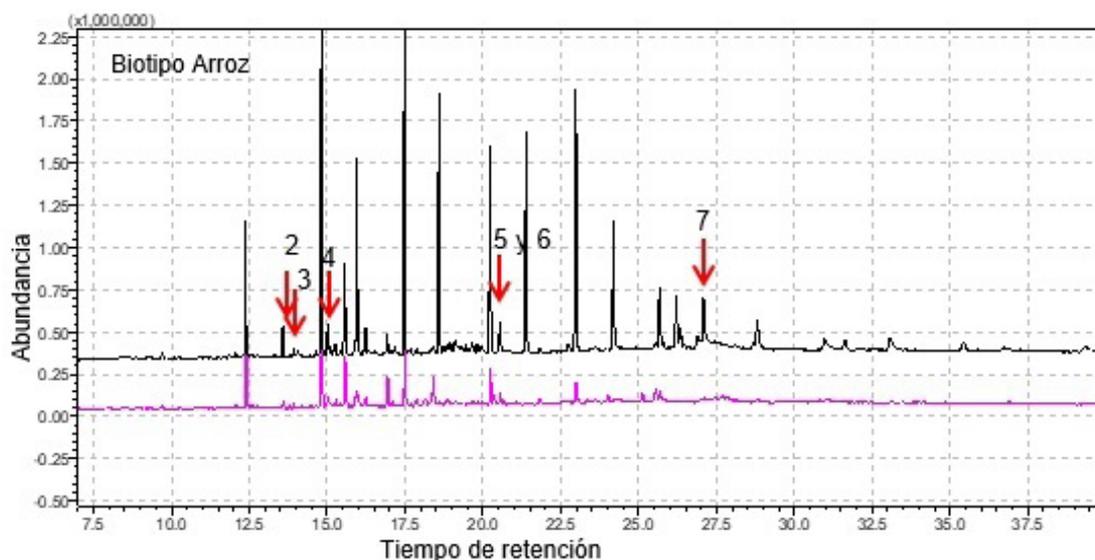
En la Tabla 5.1, se puede observar la asignación para cada compuesto teniendo en cuenta el tiempo de retención y su área relativa (tomada como abundancia según la librería NI_{ST} y la Pherobase). Los porcentajes de similitud entre los espectros de masas de los compuestos detectados y las bases de datos fueron mayores al 82 % en todos los casos. Entre los compuestos encontrados se detectaron 9 que han sido previamente referenciados en la literatura como

constituyentes de las glándulas sexuales de lepidópteros (Tablas 5.2, 5.3). Estos incluyen el Z-9-tetradecenil acetato y el Z-7-dodecenil acetato, ambos reportados como biológicamente activos en *S. frugiperda* por Tumlinson *et al.* (1986) y Unbehend *et al.* (2014).

Otros compuestos como el hexadecanal y el 1-dodecanol han sido reportados también como feromonas activas para especies de lepidópteros plaga como *Manduca sexta*, plaga del tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Tumlinson *et al.*, 1989; Angerilli *et al.*, 1998) y *Cydia pomonella*, plaga del manzano (*Malus domestica*) (Witzgall *et al.*, 1999) respectivamente.

Figura 5.2 Cromatogramas de extracto de glándulas sexuales de hembras de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* a) con y b) sin machos presentes. Negro = con machos, Rosado = sin machos. (Tomado de la tesis de Maestría de Norely Cañas Hoyos).

a)



b)

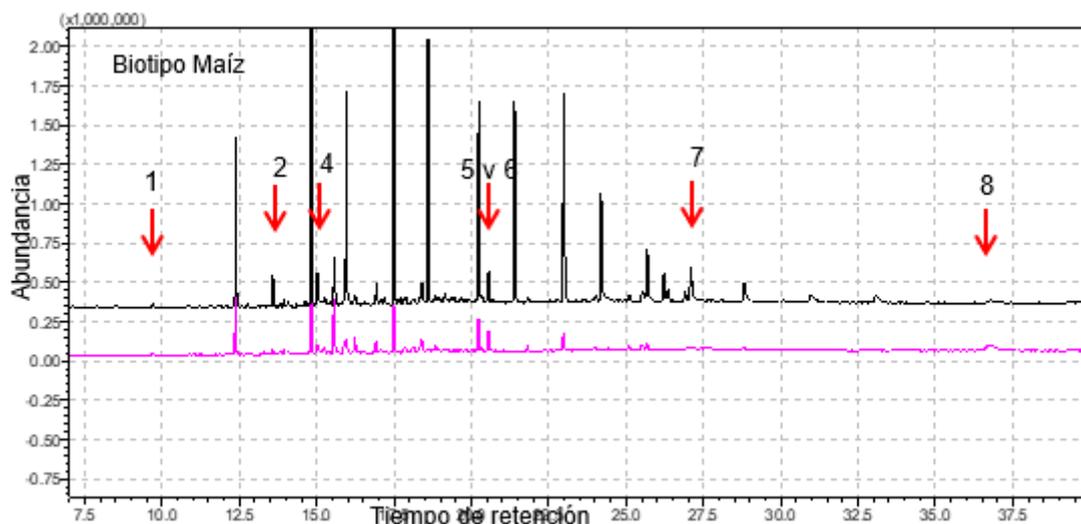
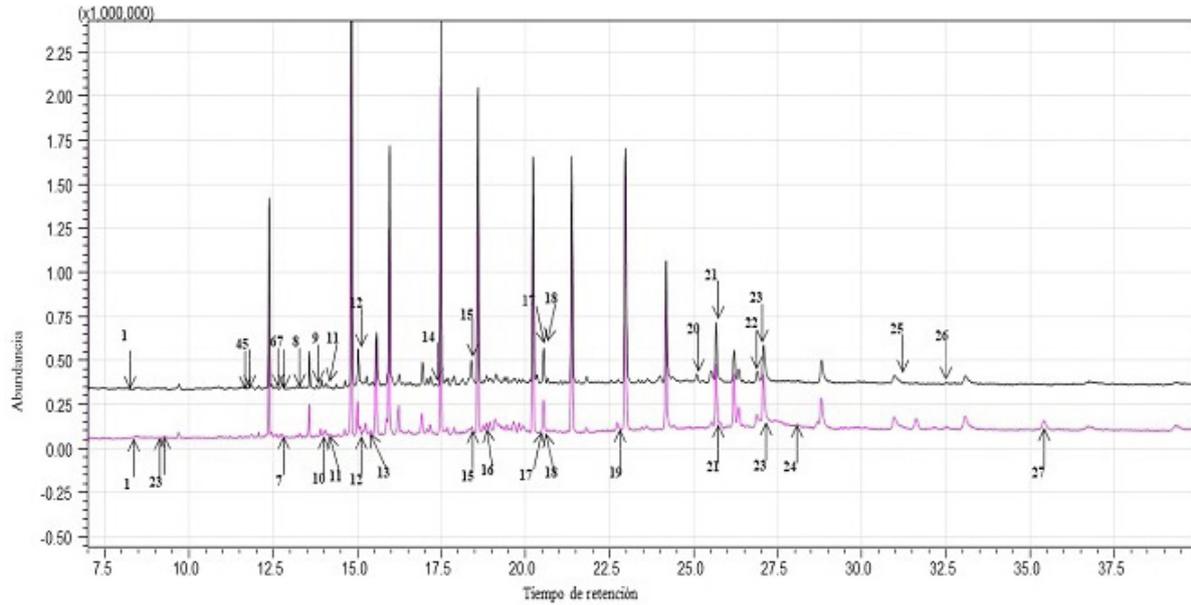


Figura 5.3 Cromatogramas de los extractos de las glándulas de hembras de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* que muestra todos los componentes encontrados en el insecto. Negro = Biotipo arroz, Rosado = Biotipo maíz. La lista aparece en la tabla 5.1. (Tomado de la tesis de Maestría Norely Cañas Hoyos).



En general, los resultados obtenidos por Cañas-Hoyos *et al.* (2017) demostraron que las hembras de los biotipos de *S. frugiperda* se encontraron estimuladas por la presencia de los machos de su mismo biotipo dentro de la jaula donde fueron mantenidas. Adicionalmente, se encontró que la emisión de compuestos volátiles fue mayor después 6h de escotofase y que ambos biotipos producen 21 compuestos volátiles, donde algunos de ellos son compartidos entre ellos y otros no.

Los resultados de mayor número y abundancia relativa de compuestos a las 6 h de oscuridad, encontrados por Cañas-Hoyos *et al.* (2017) no concuerdan con los resultados relacionados con el aislamiento precigótico temporal evaluado por Velásquez-Vélez *et al.* (2011) quienes encontraron que los biotipos comenzaron a aparearse después de las 2-3 horas de la escotofase, y tampoco apoya los resultados encontrados por Pashley *et al.* (1992) puesto que ellos observaron que los biotipos de poblaciones de Estados Unidos copulan a horas diferentes horas siendo el biotipo de maíz el que cópula 6 horas después de la escotofase y el biotipo de arroz 12 horas después de ésta. Los resultados de Cañas-Hoyos *et al.* (2017) muestran que las hembras de ambos biotipos emiten las feromonas a la misma hora, que es 6h después de empezar la noche (escotofase), por lo que los tiempos de producción de esta emisión no parece influenciar los tiempos de iniciación del apareamiento en los biotipos de *S. frugiperda* del Tolima.

Es importante recalcar que el trabajo realizado por Cañas-Hoyos *et al.* (2017) es único, dado que la mayoría de los trabajos enfocados en polillas y su comunicación se basan principalmente en las feromonas, mientras que estos autores amplían el rango a encontrar compuesto volátiles emitidos por las hembras de los biotipos de *S. frugiperda*. Esto se debe a que los compuestos pueden diferir entre poblaciones de insectos ya que, en algunos insectos, dichos compuestos tienen

origen de la planta hospedera con la que el insecto se encuentra asociado y pueden funcionar como atrayentes de los machos porque pueden actuar en sinergia con las feromonas sexuales (Yang *et al.*, 2004). Este concepto, no se había tenido en cuenta con anterioridad respecto los biotipos de *S. frugiperda* dado que a pesar de que no tienen una asociación exclusiva a una planta hospedera en particular, la abundancia de sus poblaciones es mayor en cultivos de maíz o en cultivos de arroz.

Por otro lado, en el estudio de Cañas-Hoyos *et al.* (2017), se detectaron un total de 27 compuestos en las glándulas de ambos biotipos. Esta cantidad de compuestos es similar a la encontrada en el trabajo de Espinoza *et al.* (2012), en el que se detectaron un total de 33 compuestos en un extracto soluble en diclorometano de las glándulas sexuales de hembras de la polilla plaga del esparrago, *Copitarsia corruda* (Lepidoptera: Noctuidae), por medio de CG-EM. En el estudio de Cañas-Hoyos *et al.* (2017) se evidenciaron diferencias en el contenido de la glándula sexual de ambos biotipos, puesto que, de los compuestos detectados, 10 se hallaron solo en hembras del biotipo de arroz, 8 solo en las de maíz y 9 fueron comunes a ambos. Dentro de los 27 compuestos detectados se incluyen hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y ácidos grasos, algunos de los cuales han sido reportados en otras especies de lepidópteros y coleópteros como feromonas sexuales activas. Entre los compuestos detectados, se destacan el hexadecanal que hace parte de la mezcla de feromonas de la polilla *Manduca sexta* (Tumlinson *et al.*, 1989) y el 1-dodecanol, feromona sexual activa de *Cydia pomonella*, plaga del manzano (Witzgall *et al.*, 1999). Otros compuestos detectados son intermedios en la síntesis de ácidos grasos (Jurenka, 2004) como el ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico o el ácido 4-metiloctanoico. Por otro lado, otros coinciden con metabolitos volátiles de plantas por ejemplo el D-limoneno, el cual es un terpeno común en aceites esenciales de muchas plantas (Zapata, 2007), y a su vez ha sido reportado en *Copitarsia corruda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Espinoza *et al.*, 2012), y en otros insectos como *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) (Muñiz *et al.*, 2014) con potencial atrayente (Urzua *et al.*, 2011). Asimismo, el (E,E)-2,4-decadienal, hace parte de los compuestos volátiles de plantas del género *Cicer*, de la familia de las leguminosas, el cual funciona como kairomona que permite a los individuos de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) ubicar el hospedero e influencia el comportamiento de oviposición de las hembras (Stevenson y Aslam, 2006). Adicionalmente, este compuesto, se ha reportado como sustrato de la enzima glutatión S-transferasa que está implicada en la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos, que a concentraciones altas estimula la actividad de esta enzima (Yu, 2004). Esto es relevante dado que se ha correlacionado la resistencia a insecticidas con niveles incrementados de actividad de esta enzima (Ku *et al.*, 1994; Díaz *et al.*, 2004, Badii y Almanza, 2007) y según Badii y Almanza (2007) las enzimas glutatión transferasas proveen la forma más importante de resistencia metabólica al DDT. Por tanto, todo lo detectado en ambos biotipos de la glándula sexual de *S. frugiperda*, sugiere que otros compuestos diferentes a las feromonas sexuales específicas tienen una función, ya sea como detoxificadores, atrayentes o posiblemente actúan en sinergia con las feromonas, como lo han afirmado otros autores (Yang *et al.*, 2004). En cuanto a las feromonas como tal, se detectaron dos componentes previamente reportados como atrayentes activos para esta especie, el (Z)9-14:Ac y el (Z)7-12:Ac, lo cual

concuerta con lo reportado previamente por varios autores (Groot *et al.*, 2008; Groot *et al.*, 2010; Unbehend *et al.*, 2013; Unbehend *et al.*, 2014). Sin embargo en los estudios de Groot *et al.* (2008) se reportaron cuatro feromonas, las cuales además de las dos reportadas en este estudio, incluyen al (Z)11-16:Ac y al (Z)9-12:Ac. Adicionalmente, en este estudio no se encontraron variaciones en la abundancia de las feromonas ni en los otros compuestos en común de la glándula sexual de los dos biotipos, mientras que otros estudios si han reportado variaciones entre los dos biotipos. En el estudio de Groot *et al.* (2008) encontraron que el (Z)-11-16:Ac está más concentrado en el biotipo de maíz, pero el (Z)9-12:Ac y el (Z)7-12:Ac lo están en el de arroz mientras que el (Z)9-14:Ac tiene concentraciones similares en ambos biotipos. Resultados contrarios encontraron Lima y Mcneil (2009), en el que se determinó que el biotipo de maíz presentaba la feromona (Z)9-14:Ac más concentrada que el biotipo de arroz, pero que presentaba menores concentraciones de las feromonas (Z)7-12:Ac y (Z)11-16:Ac. Tomyo en cuenta que en estos dos estudios se hicieron colectas en diferentes zonas biogeográficas dentro de los Estados Unidos, ya que Lima y Mcneil (2009) muestrearon en Louissiana y Groot *et al.* (2008) en Florida, se sugiere que pueden existir diferencias en los compuestos volátiles o las proporciones de feromonas emitidas por las hembras de los biotipos de *S. frugiperda*, dependiendo de la región en la que se encuentran, ya que las condiciones medio ambientales difieren entre sí. En este trabajo, los resultados de comparación de las feromonas requieren un estudio más detallado, consideró patrones para determinar abundancias y detección inequívoca de cada feromona, pero los resultados preliminares no arrojaron diferencias como si se reportó en estos otros estudios realizados en los Estados Unidos.

Tabla 5.1 Compuestos detectados en los extractos de glándulas de las hembras de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* mantenidas en una colonia 2009-2017. A = arroz y M = maíz (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos).

Compuesto asignado por NIST	Biotipo	TR*	Área relativa en cada biotipo		m/z**	Fragmentos principales
			A	M		
D-Limoneno	A, M	8,025	3,36	8,13	136	68 (99.9), 93 (59.0), 67 (44.6), 79 (22.7), 94 (22.5), 136 (22.5), 121 (19.4), 41 (19.2), 92 (18.7), 107 (17.0)
2-Nonenol	M	9,265	0	0,52	142	57 (99.9), 41 (80.1), 29 (64.7), 43 (56.7), 27 (53.2), 55 (42.1), 39 (39.4), 56 (23.3), 42 (22.6), 67 (22.3)
Nonanal	M	9,295	0	5,03	142	57 (99.9), 41 (89.3), 43 (87.9), 56 (79.7), 44 (71.5), 55 (58.8), 29 (53.9), 70 (42.1), 98 (40.6), 69 (38.9)
Indeterminado	A	11,595	2,64	0	196	
(Z)-2-Decenal	A	11,895	2,82	0	154	43 (99.9), 41 (88.0), 55 (70.0), 70 (70.0), 29 (67.0), 83 (51.0), 27 (50.0), 57 (46.0), 39 (45.0), 69 (32.0)
(E)-3-Nonen-2-ona	A	12,615	4,09	0	140	55 (99.9), 43 (63.7), 125 (47.7), 97 (27.9), 71 (24.4), 41 (21.3), 82 (17.2), 29 (15.2), 69 (14.1), 27 (9.6)

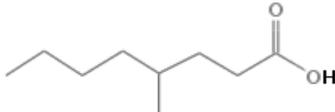
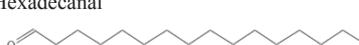
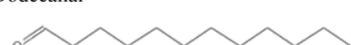
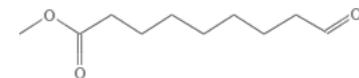
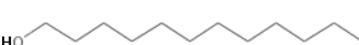
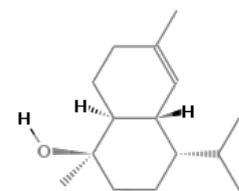
Compuesto asignado por NIST	Biotipo	TR*	Área relativa en cada biotipo		m/z**	Fragmentos principales
			A	M		
(E,E)-2,4-Decadienal	A, M	12,79	2,59	2,7	152	81 (99.9), 41 (41.9), 29 (29.0), 39 (28.6), 27 (24.3), 67 (19.4), 55 (16.4), 53 (13.4), 54 (11.0), 83 (10.3)
Ácido 4-metiloctanoico	A	13,3	2,68	0	158	57 (99.9), 41 (81.1), 55 (78.3), 43 (77.7), 73 (67.6), 29 (51.0), 27 (46.1), 39 (36.5), 60 (35.2), 101 (30.6)
Hexadecanal	A	14,065	2,34	0	240	43 (99.9), 41 (87.9), 57 (84.4), 29 (71.2), 55 (62.7), 82 (52.5), 68 (39.1), 44 (39.0), 69 (35.4), 67 (32.9)
Dodecanal	M	14,07	0	1,81	184	41 (99.9), 43 (93.0), 29 (70.0), 55 (53.0), 57 (48.0), 27 (47.0), 44 (37.0), 82 (30.0), 56 (28.0), 39 (28.0)
Ácido 9-ceto-nonanoico metil ester	A, M	14,365	2,05		186	74 (99.9), 87 (61.3), 55 (60.7), 41 (43.4), 83 (39.3), 43 (39.1), 111 (34.6), 143 (29.1), 59 (28.7), 69 (28.5)
1-Dodecanol	A, M	15,01	3,1	2,6	186	55 (99.9), 43 (96.0), 69 (86.3), 56 (83.9), 70 (75.7), 83 (74.7), 41 (73.3), 57 (68.4), 84 (48.2), 97 (46.1)
Indeterminado	M	15,095	0	1,79	180	
Indeterminado	A	17,31	3,87	0	198	
Tau.-Cadinol	A, M	18,115	5,65	5,34	222	161 (99.9), 43 (94.4), 41 (47.2), 204 (46.5), 105 (39.2), 95 (37.2), 81 (35.8), 79 (28.6), 119 (26.3), 121 (25.6)
1-Undecanol	M	18,42	0	7,22	172	55 (99.9), 69 (89.4), 41 (86.8), 70 (74.6), 56 (71.4), 43 (68.0), 83 (64.9), 57 (51.0), 97 (44.8), 84 (44.0)
Z-9-Tetradecenil acetato	A, M	20,545	3,06	3,01	254	55 (99.9), 82 (92.9), 81(88.9), 43 (88.7), 67 (78.7), 96 (72.3), 95 (58.4), 41 (51.6), 54 (47.0), 68 (43.9)
Z-7-Dodecenil acetato	A, M	20,56	3,06	3,01	254	43 (99.9), 81 (72.6), 166 (62.2), 82 (56.6), 67 (54.8), 226 (53.8), 96 (51.8), 41 (49.8), 95 (48.8), 55 (47.1)
Indeterminado	M	22,065	0	2,88	232	
Indeterminado	A	25,51	5,44	0	242	
Ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico	A, M	26,19	3,81	3,52	280	55 (99.9), 41 (87.5), 69 (74.2), 43 (73.9), 74 (71.3), 83 (53.9), 87 (50.5), 84 (49.4), 97 (48.2), 96 (43.5)
(Z)-13-Octadecenal	A	26,46	3,18	0	266	55 (99.9), 41 (87.9), 69 (66.2), 43 (63.8), 67 (55.4), 83 (53.0), 57 (48.9), 81 (46.1), 82 (41.3), 98 (39.7)
Metil estearato	A, M	26,905	3,91	3,70	298	74 (99.9), 87 (60.4), 43 (43.0), 41 (28.9), 55 (27.8), 75 (21.8), 57 (19.7), 29 (16.9), 69 (14.3), 143 (12.1)
(Z)-7-Tetradecenal	M	27,835	0	3,68	210	55 (99.9), 41 (81.1), 67 (62.2), 69 (52.4), 81 (45.7), 43 (44.9), 83 (38.0), 54 (35.8), 70 (34.7), 79 (34.4)

Compuesto asignado por NIST	Biotipo	TR*	Área relativa en cada biotipo		m/z**	Fragmentos principales
			A	M		
(Z)-9-Hexadecenal	A	31,695	5,06	0	238	55 (99.9), 69 (81.0), 41 (73.9), 67(59.0), 81 (55.2), 83 (53.5), 82 (52.7), 43 (51.0), 95 (42.4), 96 (40.7)
Indeterminado	A	32,595	6,33	0	326	
Heneicosano	M	36,82	0	18,4	296	57 (99.9), 71 (69.5), 43 (58.7), 85 (47.8), 41 (19.6) 99 (16.3), 55 (15.1), 29 (11.1), 113 (10.9), 56 (10.4)

* Tiempos de retención (TR)

**Relación carga-masa de cada metabolito

Tabla 5.2. Compuestos detectados en los extractos de glándulas de hembras de los biotipos de maíz y arroz *S. frugiperda* biológicamente activos en otros lepidópteros (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos)

<p>Ácido 4-metiloctanoico</p> 	2.68	0	Feromona de agregación de machos de escarabajos rinoceronte (género <i>Oryctes</i>)	Angerilli <i>et al.</i> , 1998, Ragoussis <i>et al.</i> , 2007
<p>Hexadecanal</p> 	2.34	0	Feromona sexual de hembras de <i>Scirpophaga nivella</i> . y de myuca sexta	Angerilli <i>et al.</i> , 1998, Tumlinson <i>et al.</i> , 1989
<p>Dodecanal</p> 	0	1.81	Feromona sexual de hembras de <i>Setothosea asigna</i> (Lepidoptera: Limacodidae)	Angerilli <i>et al.</i> , 1998
<p>Ácido 9-ceto-nonanoico metil Ester</p> 	2.05	2.39	Atrayente de insectos	Giunti <i>et al.</i> , 2015
<p>1-Dodecanol</p> 	3.10	2.60	Feromona sexual de hembras de <i>Cydia pomonella</i>	Witzgall <i>et al.</i> , 1999
<p>T-Cadinol</p> 	5.65	5.34	Aceite esencial de plantas. Insecticida	Liu <i>et al.</i> , 2010

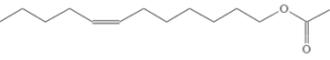
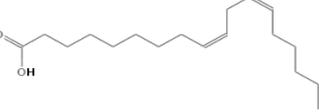
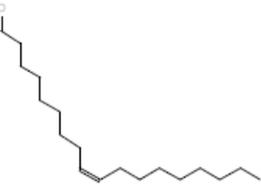
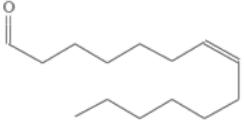
<p>1-Undecanol</p> 	0	7.22	Compuesto volátil de plantas. Insecticida	Kubo, 2006
<p>(Z)-9-Tetradecenil acetato</p> 	3.06	3.01	Feromona sexual de hembras de <i>Spodoptera frugiperda</i>	Groot <i>et al.</i> , 2008
<p>(Z)-7-Dodecenil acetato</p> 	3.06	3.01	Feromona sexual de hembras de <i>Spodoptera frugiperda</i>	Groot <i>et al.</i> , 2008
<p>Ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico</p> 	3.81	3.52	Aceite esencial de plantas del genero <i>Scutellaria</i>	Formisano <i>et al.</i> , 2013
<p>(Z)-13-Octadecenal</p> 	3.18	0	Feromona sexual de hembras de <i>Chilo suppressalis</i>	Nesbitt <i>et al.</i> , 1975
<p>Metil estearato</p> 	3.91	3.70	Feromona de supresión de la oviposición en huevos de <i>Ostrinia nubilalis</i>	Thiéry y Le Quéré, 1991
<p>(Z)-7-Tetradecenal</p> 	0	3.68	Feromona sexual de hembras de <i>Helicoverpa armigera</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2012

Tabla 5.3. Compuestos compartido en las glándulas sexuales de hembras de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* (Tomado de la tesis de Maestría de Norelly Cañas Hoyos)

Compuesto	N Maíz	N Arroz	Kolmogorov -Smirnov	test de Levene	Test comparación
Ácido 9-ceto-nonanoico metil Ester	5	6	p = 0.6520	p = 0.2358	t = -0.9587 p = 0.3627
Ácido (Z. Z) -9-12 octadecanoico	6	10	p = 0.3713	p = 0.1392	t = -0.8459 p = 0.4117
(E.E)-2.4-Decadienal	2	2	p = 0.8438	p<0.0001	Mann Whitney z= 0.3873 p = 0.99854
1 Dodecanol	12	13	p = 0.9090	p = 0.02416	Mann Whitney z= -0.5175 p = 0.9047
D-Limoneno	4	6	p = 0.3572	p = 0.8033	t = -0.2135 p = 0.8370
Metil estearato	6	4	p = 0.8895	p = 0.2496	t = -0.9714 p = 0.3597
(Z)-7-Dodecenil acetato	8	11	p = 0.0613	p = 0.03134	Mann Whitney z= -1.21821 p = 0.1998
(Z)-9-Tetradecenil acetato	15	13	p = 0.3860	p = 0.23	t = -0.3695 p = 0.7147
T-Cadinol	4	6	p=0.8850	p=0.02611	z=0.4290 p=0.6324

5.3 Conclusiones generales del aislamiento químico de *S. frugiperda*

La mayoría de los trabajos que se realizan con insectos del orden Lepidoptera, se enfocan en la evaluación de las feromonas emitidas por sus hembras, ya que son empleadas para el monitoreo y control de plagas de importancia económica (Witzgall *et al.*, 2010; Cañas-Hoyos *et al.*, 2017). En el caso de los insectos que son considerados plagas, las feromonas emitidas por sus hembras (principalmente), han sido empleadas para la realización de varios experimentos, entre ellos: a) la interrupción del apareamiento (ya que la liberación de feromonas en grandes cantidades, en un cultivo, puede prevenir o retrasar los apareamientos entre sus adultos),

b) el aumento del poder atrayente de las feromonas en complemento con extractos de plantas (experimentos de trampas en el campo han demostrado que los extractos de plantas aumenta la atracción que generan las feromonas emitidas por las hembras de los insectos, ya que las plantas emiten compuestos volátiles que ayudan en este proceso), c) atracticida (el uso de feromonas u otro cebo (semioquímico) para atraer a los insectos, en un área manejada con insecticidas) y d) estrategias push-pull (donde las plagas son repelido o disuadido de un recurso (cultivo o granja) (“push”) y sus estímulos que enmascaran la apariencia del huésped o que son repelentes o disuasorios (“pull”)) (Reddy y Guerrero, 2010).

En el trabajo realizado por Cañas-Hoyos *et al.* (2017), se encontró que no solamente las feromonas el (Z)9-14: Ac y el (Z)7-12: Ac estaban presentes en los biotipos de *S. frugiperda*, sino que también deben tenerse en cuenta los compuestos volátiles, para el manejo de este insecto, ya que a pesar de que comparten 9 de los 21 compuestos detectados, ambas difieren en otros componentes volátiles que pueden ser clave en la atracción de los machos de cada biotipo de *S. frugiperda*, donde algunos de éstos compuestos, pudieron originarse de las plantas hospederas que estos biotipos usan con mayor frecuencia (Yang *et al.*, 2004). Este hallazgo podría explicar los resultados contradictorios encontrados por Groot *et al.* (2008) y Lima y McNeil (2009) ya que en ambos trabajos se demostró que las dos feromonas más comúnmente encontrados en los biotipos de *S. frugiperda* se encuentran en diferentes concentraciones por biotipo, pero dado que los resultados de estos estudios no se corroboran, una posible explicación a esta diferencia es el origen de la muestra, ya que los primeros emplearon polillas capturadas en Florida y los segundos en Louisiana. Los biotipos del Tolima presentaron las mismas concentraciones de estas dos feromonas, así que la variación de composición y concentración de éstas al parecer presentan una variación local, es decir depende del lugar donde se colectan las muestras. Esta conclusión se comprueba con los resultados de las evaluaciones en campo realizadas por Unbehend *et al.* (2014) con poblaciones del insecto de Norte y Sur América, donde no se encontraron diferencias en los comportamientos de atracción de las feromonas hacia los machos de *S. frugiperda* y sus biotipos, dependiendo del cultivo, sea maíz o arroz. No obstante, estos autores encontraron que la atracción de los machos hacia las feromonas dependía el hábitat donde se encontraba, así que la atracción de los machos hacia las trampas, es dependiente de la localidad donde se encuentra la población evaluada.

Por otro lado, para el análisis del aislamiento químico, Cañas-Hoyos *et al.* (2017) se enfocaron en identificar el contenido de la glándula sexual de ambos biotipos de *S. frugiperda* y en determinar las diferencias entre los compuestos emitidos por cada uno. Los experimentos realizados para el proceso de extracción del contenido de la glándula, en los que se consideró la hora en la escotofase y el posible estímulo de los machos en la emisión de compuestos fueron fundamentales para determinar la manera óptima de extracción de las glándulas sexuales. De tal forma,

para ambos biotipos los extractos con el mayor número y abundancia relativa de compuestos se observaron luego de 6 horas de la escotofase, estos resultados no apoyan lo observado por Velásquez-Vélez *et al.* (2011) quienes encontraron que los biotipos comenzaron a aparearse después de las 2-3 horas de la escotofase. Adicionalmente, se pudo determinar que la presencia de machos ejerció un estímulo positivo en la emisión de compuestos de la glándula sexual de las hembras de *S. frugiperda*, puesto que, de acuerdo con los cromatogramas mostrados, hay diferencias en la cantidad de picos y sus abundancias, en las muestras obtenidas de hembras en presencia de machos versus hembras sin machos. Esto último no había sido evaluado antes en esta especie, concluyendo que la presencia de machos es esencial en este tipo de estudios.

Además, también es importante mencionar que Cañas-Hoyos *et al.* (2017) detectaron un total de 27 compuestos en las glándulas de ambos biotipos, 10 se detectaron solo en hembras del biotipo de arroz, 8 solo en las de maíz y 9 fueron comunes a ambos. Dentro de los 27 compuestos detectados se incluyen hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y ácidos grasos, algunos de los cuales han sido reportados en otras especies de lepidópteros y coleópteros como feromonas sexuales activas. Entre los compuestos, se destacan el hexadecanal que hace parte de la mezcla de feromonas de la polilla *Manduca sexta* (Tumlinson *et al.*, 1989) y el 1-dodecanol, feromona sexual activa de *Cydia pomonella*, plaga del manzano (Witzgall *et al.*, 1999). Otros compuestos detectados son intermedios en la síntesis de ácidos grasos (Jurenka, 2004) como el ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico o el ácido 4-metiloctanoico. Por otro lado, otros coinciden con metabolitos volátiles de plantas por ejemplo el D-limoneno, el cual es un terpeno común en aceites esenciales de muchas plantas (Zapata, 2007), y a su vez ha sido reportado en *Copitarsia corruda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Espinoza *et al.*, 2012), y en otros insectos como *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) (Muñiz *et al.*, 2014) con potencial atrayente (Urzua *et al.*, 2011). Igualmente, el (E,E)-2,4-decadienal, hace parte de los compuestos volátiles de plantas del género *Cicer*, de la familia de las leguminosas, el cual funciona como kairomona que permite a los individuos de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) ubicar el hospedero e influencia el comportamiento de oviposición de las hembras (Stevenson y Aslam 2006). Este último compuesto, se ha reportado como sustrato de la enzima glutatión S-transferasa que está implicada en la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos, que a concentraciones altas estimula la actividad de esta enzima (Yu, 2004). Esto es relevante porque se ha correlacionado la resistencia a insecticidas con niveles incrementados de actividad de esta enzima (Ku *et al.*, 1994; Días *et al.*, 2004, Badii y Almanza, 2007) y según Badii y Almanza (2007) las enzimas glutatión transferasas proveen la forma más importante de resistencia metabólica al DDT. Por tanto, todo lo detectado en ambos biotipos de la glándula sexual de *S. frugiperda*, sugiere que otros compuestos diferentes a las feromonas sexuales específicas tienen una función, ya sea como detoxificadores, atrayentes o posiblemente actúan en sinergia con las feromonas, como lo han afirmado otros autores (Yang *et al.*, 2004).

En general, se puede decir que el análisis de componentes producidos por las glándulas sexuales de las hembras de los biotipos de este insecto es relevante desde un punto de vista ecológico, considero que para los dos biotipos han presentado diferencias en la concentración de feromonas (Groot *et al.*, 2008; Lima y McNeil 2009). Por otro lado, la diferencia que se ha demostrado entre los dos biotipos, abarca a su vez su sitio de origen, por lo que estudios de una zona no son necesariamente extrapolables a otra. De esta forma, Unbenhend *et al.* (2013 y 2014) encontraron que existen diferencias en el poder atrayente de las feromonas sintéticas de los biotipos de *S. frugiperda* en diversos países de Norte y Sur América.

Finalmente, los resultados encontrados por Cañas-Hoyos *et al.* (2017) son importantes para la mejora del manejo de los biotipos de *S. frugiperda*, en cuanto a su monitoreo y control, puesto que el conocimiento de la composición de los compuestos volátiles pueden ser usados en producción de trampas de mezclas atrayentes efectivas para la captura de los machos de esta polilla, teniendo en cuenta los compuestos exclusivos para el biotipo de maíz y los compuestos para el biotipo de arroz, ya que de esta manera atraerán diferencialmente a los machos de cada población, dependiendo del tipo de trampa empleada, esto conllevaría a la realización de una cuantificación más exacta del número de machos capturados, para el monitoreo del insecto, y una reducción de las densidades poblacionales de los machos en los cultivos que atacan.

5.4 Referencias

- Angerilli, N.P.D., Permana A.D., Sasaerila, Y., Hallett, R., Zilahi-Balogh, R., y Edmonds R. (1998). Prospecting for Insect Pheromones in Indonesia: Finds, Failures y the Future. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 1, 25-33
- Badii, M., y Almanza, V. (2007). Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. *CULCyT// Impacto Ecológico*, 4, 9-25
- Cano-Calle, D., Arango-Isaza R. E., y Saldamando-Benjumea, C.I. (2015). Molecular identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains in Colombia by using a PCR-RFLP of the mitochondrial gene cytochrome oxydase I (COI) y a PCR of the gene FR (For Rice). *Annals of Entomological Society of America*, 108, 172-180
- Cañas-Hoyos, N., Márquez, E.J., y Saldamando, C. I. (2014). Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains from central Colombia: a wing morphometric approach. *Annals Entomological Society of America*, 107, 575–581
- Cañas-Hoyos, N., Lobo-Echeverri, T., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2017). Chemical Composition of Female Sexual Glycs of *Spodoptera frugiperda* Corn y Rice Strains from Tolima, Colombia. *Southwestern Entomologist*, 42, 375-394.
- Díaz, C., Rodríguez, M., Fresneda, M., y Bisset, J. (2004). Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56, 111-116.
- El Sayed, A. M. (2016). *The pherobase, Database of pheromones y semiochemicals*. Recuperada de <http://www.pherobase.com>
- Espinoza, G., Gambetta, J. y Rojas. R. (2012). Identificación de una potencial feromona sexual de *Copitarsia corruda* por cromatografía de gases y electroantenografía con miras al manejo integrado de plagas del espárrago. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78, 225-233.
- Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N.A., Simmonds, M.S., Rosselli, S., y Loziene, K. (2013). Essential oils of three species of *Scutellaria* y their influence on *Spodoptera littoralis*. *Biochemistry Systematics y Ecology* 48, 206-210.
- Groot, A. T., Marr, M., Schölf, G., Lorenz, S., Svatos, A., y Heckel D. G. (2008). Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. *Frontiers in Zoology*, 5, 20.
- Groot, A. T., Marr, M., Heckel, D., y Schölf G. (2010). The roles y interactions of reproductive isolation mechanism in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Ecological Entomology*, 35, 105-118.
- Jurenka, R. (2004). Insect pheromone biosynthesis. *Top Current Chemistry*, 239, 97-132.
- Ku, C. C., Chiang, F.M., Hsin, C.Y., Yao, Y.E., y Sun, C.N. (1994). Glutathione transferase isozymes involved in insecticide resistance of diamondback moth larvae. *Pesticide Biochemistry y Physiology*, 50, 191-197.

- Kubo, I. (2006). New concept to search for alternate insect control agents from plants. *Advanced Phytion*, 3, 61-80.
- Levy, C., García, A., y Maruniak, J. (2002). Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects y cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase c subunit I gene. *Florida Entomologist*, 85, 186-190.
- Lima, E. R., y McNeil, J. N. (2009). Female sex pheromones in the host races y hybrids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemoecology*, 191, 29-36.
- Liu, Z. L., Chu, S.S., y Liu, Q.R. (2010). Chemical composition y insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* of the essential oils of *Artemisia capillaris* y *Artemisia mongolica*. *Molecules*, 15, 2600-2608.
- Moraes, M. C., Pareja, M., Laumann, R.A., y Borges, M. (2008). The chemical volatiles (Semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, 37, 489-505.
- Muñiz, M., Cibrián, J., Hidalgo, C., Bautista, N., Vaquera, H., y Aldama, C. (2014). Compuestos volátiles atraen al picudo (*Anthonomus eugenii* Cano) del chile (*Capsicum* spp.) y presentan sinergia con su feromona de agregación. *Agrociencia*, 48, 819-832.
- Nagoshi, R. N., y Meagher, R.L. (2003). Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes y their distribution in the world indicate limitations in interstrain mating. *Insect Molecular Biology*, 12, 453-456.
- Nagoshi, R. N., y Meagher, R. L. (2004). Seasonal distribution of fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae) host strains in agricultural y turf grass habitats. *Environmental Entomology*, 33, 881-889.
- Nesbitt, B. F., Beevor, P.S., Hall, D.R., Lester, R., y Dyck, V. A. (1975). Identification of the female sex pheromones of the moth, *Chilo suppressalis*. *Journal of Insect Physiology*. 21, 1883-1886.
- Pashley, D.P. (1986). Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) a sibling species complex? *Annals of the Entomological Society of America*, 79, 898-904.
- Pashley, D.P., y Martin. J.A. (1987). Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 80, 731-733.
- Pashley, D. P., Hammond, A.M., y Hardy, T.N. (1992). Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 85, 400-405.
- Patrick, G. (2001). The National Institute of Standards y Technology (NIST), in Webbook de Química del NIST. <http://webbook.nist.gov/>.
- Prowell, D. P., McMichael, M., y Silvain. J.F. (2004). Multilocus genetic analysis of host use, introgression y speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97, 1034-1044.

- QingXing, S., QingHuai, L., Long, Z., ZhengXiang, Z., GuangQuan, H., y Wei. W. (2015). Extraction y identificación de maiz volátiles y cuticular volátiles de larval *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) related to host-habitat location y host location of parasitic wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58, 244-255.
- Ragoussis, V., Giannikopoulos, A., Skoka, E., y Grivas. P. (2007). Efficient synthesis of (\pm)-4-methyloctanoic acid, aggregation pheromone of rhinoceros beetles of the genus *Oryctes* (Coleoptera: Dynastidae, Scarabaeidae). *Journal of Agriculture Food y Chemistry*, 55, 5050-5052.
- Reddy, G. V., y Guerrero, A. (2004). Interactions of insect pheromones y plant semiochemicals. *Trends in Plant Science*, 9, 253-261.
- Reddy, G. V. ,y Guerrero, A. (2010). New pheromones y insect control strategies. *Vitamine Hormone Journal*, 83, 493-519.
- Rembold, H., P. Wallner, Nitz, S., Kollmannsberger, H., y Drawert. F. (1989). Volatile components of chickpea (*Cicer arietinum*) seed. *Journal of Agriculture y Food Chemistry*, 37, 659-662.
- Ríos-Díez, J. D., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2011). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from Central Colombia to two insecticides, methomyl y lambda-cyhalothrin: a study of the genetic basis of resistance. *Journal of Economic Entomology*, 104, 1698-1705.
- Ríos-Díez, J. D., Siegfried, B., y Saldamando-Benjumea, C.I. (2012). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from Central Colombia to Cry1Ac y Cry1Ab. *Southwestern Entomology*, 7, 281-293.
- Saldamando-Benjumea, C.I., Estrada-Piedrahíta, K., Velásquez-Vélez, M. I., y Bailey R. I. (2014). Assortative mating y lack of temporality between corn y rice strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) from central Colombia. *Journal of Insect Behavior*, 27, 555-566.
- Salinas-Hernández, H., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2011). Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains from Colombia. *Neotropical Entomologist*, 40, 421-430.
- Schölf, G., Dill, A., Heckel, D. G., y Groot, A., T. (2011). Allochronic separation versus mate choice nonryom patterns of mating between fall armyworm host strains. *American Naturalist*, 177, 470-485.
- Sarria-Villa, R. A., Gallo, J. A., y Benítez, R. (2021). Extracción de compuestos fenólicos y contenido de catequina en cortezas de tres especies forestales del Cauca-Colombia. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 15, 19-27.
- Stevenson, P. C. y Aslam, S, N. (2006). The chemistry of the genus *Cicer* L. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33, 905-956.
- Thiéry, D., y Le Quéré. J., L. (1991). Identification of an oviposition-detering pheromone in the eggs of the European corn borer. *Naturwissenschaften*, 78, 132-133.

- Tumlinson, J., Mitchell, E., Teal, P., Heath, R., y Mengelkoch, L. (1986). Sex pheromone of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Journal of Chemistry Ecology*, *12*, 1909-1926.
- Tumlinson, J. H., Brennan, M. M., Doolittle, R. E., Mitchell, R., Brabham, A., Mazomenos, B. E., y Jackson, D., M. (1989). Identification of a pheromone blend attractive to *Myuca sexa* (L.) males in a wind tunnel. *Archives of Insect Biochemistry y Physiology*, *10*, 255-271.
- Unbehend, M., Hänniger, S., Meagher, R., Heckel, D., y Groot, A. T. (2013). Pheromonal divergence between two strains of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemistry Ecology*, *39*, 364-376.
- Unbehend, M., Hänniger, S., Vásquez, G. M., Juárez, M. L., Reisig, D., McNeil, J. N., y Groot, A. T. (2014). Geographic variation in sexual attraction of *Spodoptera frugiperda* corn-y rice-strain males to pheromone lures. *PloS One*, *9*, e89255.
- Urzua, A., DiCosmo, D., Echeverria, J., Santander, R., Palacios, S., y Rossi, Y. (2011). Insecticidal effect of *Schinus latifolius* essential oil on the housefly, *Musca domestica* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *10*, 470-475.
- Velásquez-Vélez, M. I., Saldamando-Benjumea, C. I., y Ríos- Díez, J. D. (2011). Reproductive isolation between two populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) collected in corn y rice fields from Central Colombia. *Annals of the Entomological Society of America*, *104*, 826-833.
- Vélez-Arango, A. M., Arango, R. E., Villanueva, D., Aguilera, E. y Saldamando, C. I. (2008). Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*, *34*, 145-150.
- Witzgall, P., Bentgsson, M., El Sayed, A., Bäckman, A. C., Rauscher, S., Borg Karlson, A., K. y Löfqvist, J. (1999.) *Chemical communication in codling moth: towards enviromentally safe control methods Bull. OILB SROP* (France).
- Witzgall, P., Kirsch, P., y Cork, A. (2010). Sex pheromones y their impact on pest management. *Journal of Chemistry Ecology*, *36*, 80-100.
- Yainna, S., Tay, W.T., Dury, K. *et al.*, (2022). The evolutionary process of invasion in the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Scientic Reports*, *12*, 21063
- Yang, Z., Bengtsson, M., y Witzgall, P. (2004). Host plant volatiles synergize response to sex pheromone in codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Chemistry Ecology*, *30*, 619-629.
- Yew, J. Y., y Chung, H. (2015). Insect pheromones: an overview of function, form, y discovery. *Progress in Lipid Research*. *59*, 88-105.
- Yu, H., Zhang, Y., Wu, K., Gao, X. W., y Guo, Y. Y. (2008). Field-testing of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. *Environmental Entomology*, *37*, 1410-1415.

- Yu, S. J. (2004). Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Pesticide Biochemistry y Physiology*, 80, 113-122.
- Zapata, R. B. (2007). Modelado de la epoxidación de limoneno con PW-Amberlita. *Scientia et Technica*, 1, 451-454.
- Zhang, J. P., Salcedo, C., Fang, Y. L., Zhang, R. J., y Zhang, Z. N. (2012). An overlooked component: (Z)-9-tetradecenal as a sex pheromone in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1209-1216.

Capítulo 6. Control químico y biológico en *S. frugiperda*

Autores: Juan Diego Ríos Díez¹, y Clara Inés Saldamando Benjumea²

1. Profesor Asociado, Grupo de Investigación Fitotecnia del trópico, Universidad del Magdalena (<https://orcid.org/0009-0007-1902-1935>).
2. Profesora Titular. Biotecnología Vegetal Grupo UNALMED-CIB, Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos 16-223, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, cisaldam@unal.edu.co <https://orcid.org/0000-0001-9368-8200>)

6.1 Introducción general sobre el control de plagas

Una de las estrategias más comúnmente empleadas para el control de una plaga se ha basado en el uso de controles químicos o insecticidas que tienen un gran impacto en la disminución de las poblaciones de este tipo de insectos, y como consecuencia, el efecto de este tipo de químicos ha reducido al mismo tiempo poblaciones de insectos benéficos y parasitoides (Deguine *et al.*, 2021; Sethuraman *et al.*, 2020). Como alternativa del uso de insecticidas químicos, hoy en día, también se emplean insecticidas o controles biológicos basados en productos esporulados que se esparcen en un cultivo, como es el caso de las esporas del *Bacillus thuringiensis* o, por otro lado, el empleo de cultivos transgénicos que presentan una o diversas endotoxinas del Bt que afectan el intestino de una plaga, generó su muerte (Deguine *et al.*, 2021; Portela-Dusán *et al.*, 2013).

Puesto que *S. frugiperda* ha evolucionado en dos biotipos que presentan barreras de aislamiento pre y postcigótico, dos preguntas de investigación surgieron sobre el método de control que debería ser empleado para su manejo, ya que al encontrar que el flujo genético entre ellos es bajo, se esperaría una reducción de transferencia de genes que confieren resistencia a controles biológicos y químicos entre sus poblaciones (Ríos-Díez y Saldamando; 2011). Particularmente, en el departamento del Tolima, donde el control del insecto ha implicado el uso de cultivos transgénicos desde el año 2005, por lo que las poblaciones de este insecto, se han encontrado bajo la presión de selección de las endotoxinas del *Bacillus thuringiensis*, especialmente Cry1Ac por varios años.

Como es bien sabido, los insectos denominados plagas, han acompañado las actividades agrícolas humanas alrededor del mundo desde hace mucho tiempo. A lo largo de la historia han sido varias las estrategias empleadas para contrarrestar los daños que ellos ejercen sobre los cultivos, ya que, desde la década de 1940, las moléculas más empleadas para tal fin eran de origen natural o compuestos inorgánicos como piedra caliza en polvo o una mezcla de sulfato de cobre, cal y agua (Wu *et al.*, 2022). Por ser la resistencia un fenómeno principalmente de carácter genético, con mutaciones que le confieren un mayor éxito reproductivo a quienes las portan, sumado a las altas tasas de natalidad de los insectos y los tiempos cortos de los ciclos de vida (Moreira *et al.*, 2012; Giménez *et al.*, 2021). Esto implica que, los insectos presentan las condiciones perfectas para que las presiones naturales o artificiales seleccione individuos que evolucionen rápidamente resistencia a compuestos químicos y biológicos (Moreira *et al.*, 2012; Yainna *et al.*, 2021).

Aunque existen muchos estudios donde se buscan alternativas para el control de *S. frugiperda*, como el uso de enemigos naturales, entomopatógenos, material vegetal que produce antibiosis y/o antixenosis (Nuambote-Yobila *et al.*, 2023), los insecticidas siguen siendo la alternativa

más económica para muchos agricultores, por ello los más utilizados en los años 2008 a 2012 para el control de este insecto eran los compuestos organofosforados como Lorsban®, carbamatos como Lannate® (Metomil) y piretroides como Karate® (Lambda-cialotrina) (Morillo y Notz, 2001; Zenner de Polania *et al.*, 2008). Los insecticidas piretroides estimulan las células nerviosas del insecto, debido a que se introducen por los poros, generados por los canales del sodio de las membranas celulares nerviosas (del cerebro), y posteriormente producen parálisis en los insectos, esto ocurre porque este tipo de insecticidas interfieren con los canales de sodio en la membrana nerviosa, interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas (Devine *et al.*, 2008). Los carbamatos, por su lado, entran por contacto con el intestino del insecto o por la piel (dado que bloquean la acción de la enzima acetilcolinesterasa), interrumpiendo la transmisión de impulsos entre las células nerviosas de los insectos (Devine *et al.*, 2008). Insecticidas tales como el Lannate® (Metomil) y piretroides como Karate® (Lambda-cialotrina) han sido empleados en evaluaciones de resistencia de los biotipos de *S. frugiperda* (Ríos-Díez y Saldamando, 2011) y por ello, se enfatiza la acción de los mismos en la fisiología del insecto en este capítulo.

Las evaluaciones del efecto de un insecticida en poblaciones de un insecto en condiciones de laboratorio, particularmente, en el caso de *S. frugiperda*, requiere el uso de larvas de primeros instares que son sumergidas en agua destilada con diferentes diluciones del insecticida con el fin de establecer la concentración letal media CL50 (establece una mortalidad del 50% de la población analizada por el efecto de un insecticida) (Murillo y Notz, 2009). Para ello, se realizan diluciones seriales de cada insecticida (en cajas de petri o en envases de plástico), en las que se sumergen las larvas del insecto durante unas horas, dependiendo del insecticida, para posteriormente realizar una prueba de regresión Probit y calcular las tasas de mortalidad CL50, 60, 70, 80 y 90 (Ríos-Díez y Saldamando, 2011).

En una revisión realizada por Paredes-Sánchez *et al.* (2021) se enfatiza que los insecticidas han sido empleados por el hombre desde 1940, y uno de sus grandes problemas ha sido su mala utilización por su uso excesivo y concentraciones indebidas, ya que, en el caso de *S. frugiperda*, las larvas de este insecto se alimentan de hojas y de cogollos que se encuentran muy internos en la planta, y a su vez se encuentran cubiertas por sus excrementos por lo que el contacto con el insecticida es bajo. Este comportamiento alimenticio hace que los agricultores apliquen excesivamente insecticidas o en épocas tempranas de producción de un cultivo para que sus tejidos se impregnen con estos. En el año 2013, Carvahlo *et al.*, encontraron que las larvas de este insecto eran 18 a 28 veces más resistentes que su línea susceptible en poblaciones de *S. frugiperda* del Brasil. Por esta razón, *S. frugiperda* genero resistencia a insecticidas como el DDT, organofosforados, carbamatos y piretroides, creándose la necesidad del desarrollo de nuevos insecticidas químicos como el metoxyfenocida, el cual mimetiza la función de la hormona 20 del insecto estimulo una muda prematura y una muerte dada su estimulación directa

con los receptores ecdiesteroides. Otro tipo de insecticidas desarrollados, son los derivados de los extractos de plantas como los flavonoides que fueron evaluados por Romanelli *et al.* (2010) en dosis de 2000 mg/kg en larvas de primer instar de *S. frugiperda*, con aplicaciones de los mismos en hojas de maíz de 1.5 cm. Los resultados de estos autores determinaron que estos flavonoides tienen actividad insecticida sobre esta plaga.

Por otro lado, existe una alternativa al manejo de las plagas en la naturaleza, que implica el uso del *B. thuringiensis* (bacilo Gram positivo), que durante su fase de esporulación produce inclusión parasporal, que puede ocupar hasta el 30% de la célula y se produce en la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria (Portela-Dusán *et al.*, 2013). Esta inclusión está conformada por estructuras proteicas, denominadas Cry y Cyt (Bravo *et al.*, 1998) que son el principal factor de virulencia de esta bacteria. Los pesos de estas proteínas, se encuentran entre los ~60 y 140 kDa y en un ambiente reductor (pH del intestino del insecto), modifican su estructura volviéndose altamente tóxicas contra insectos de los órdenes Lepidoptera, Díptera, Coleoptera, Himenóptera, Homoptera, Ortoptera y Malofaga (Portela-Dusán *et al.*, 2013). Respecto a las proteínas Cry, su forma estructural está constituida por tres dominios determinantes para su actividad biológica contra insectos. Según Portela-Dusán *et al.* (2013), el dominio I, consiste en un paquete de siete α -hélices antiparalelas, donde la hélice 5 está rodeada por las demás; el dominio II está constituido por tres láminas antiparalelas β distribuidas en una topología de “llave griega”, acomodada en lo que se ha llamado un β -prisma y el dominio III consiste de 2 láminas β antiparalelas formó un β sándwich (Vachon *et al.*, 2012; Pardo -López *et al.*, 2013). El dominio I es el responsable de la formación del poro (en el intestino del insecto que consume la proteína Cry). En consideración de la estructura de tres dominios funcionales de la proteína Cry, el dominio II es una zona altamente variable, y se considera que es el principal determinante de la especificidad ya que está encargado de reconocer al receptor del insecto (Schnepf *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001). Finalmente, se tiene evidencia de que la estructura de β -sándwich del dominio III, mantiene la estructura de la toxina, principalmente hacia el ataque de proteasas, reconoce al receptor (conjuntamente con el dominio II) y tiene funcionalidad en la formación del poro lítico (Schnepf *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001).

Portela-Dusán *et al.* (2013) mencionan que, respecto al mecanismo de acción de las endotoxinas ocurre cuando el insecto consume la proteína Cry, su larva presenta cese de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, descompensación osmótica, parálisis total y finalmente muerte (Maduell *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2012). Para que se lleve a cabo la muerte del insecto, la protoxina debe estar presente en un ambiente reductor que desestabilice sus puentes disulfuros y pueda ser activada. Dependiendo de la naturaleza de la proteína Cry, se puede realizar la solubilización y activación de la misma, ya que se ha demostrado que las proteínas Cry1 presentan mayor cantidad de aminoácidos básicos por lo cual los cristales se solubilizan a un pH alcalino presente en el intestino medio del insecto, si es una proteína Cry3 existen

cuatro puentes salinos intercatenarios que estabilizan el cristal por lo que se puede solubilizar en pH ácidos (pH 5–6), aunque pueden estar activadas naturalmente (Vachon *et al.*, 2012). No obstante, con el fin de que sean activadas, también se requiere de la acción de las enzimas proteasas presentes en el intestino medio del insecto, que desdoblan una sección de aminoácidos en la región N- terminal y en el extremo C- terminal dependiendo de la naturaleza de la proteína Cry, dejó una toxina activa de un peso molecular oscilante de 49 a 70kDa. (Vachon *et al.*, 2012). Las enzimas digestivas que predominan en los lepidópteros y dípteros son las tripsinas, quimiotripsinas, serino-proteasas y termolisinas; mientras que en los coleópteros predominan la quimiotripsina, cisteíno y aspartato proteasas (Vachon *et al.*, 2012).

Las formulaciones realizadas con Bt, según Portela-Dusán *et al.* (2013), requieren emplear cepas debidamente caracterizadas, que no sean productoras de β -exotoxina (Roh *et al.* 2007; Rosas-García 2009; Buitrago, 2004) y su producción se realiza principalmente con el método de fermentación sumergida a una temperatura entre 27-35°C y un pH de 6.8 a 7.2, bajo una regulación de nutrientes, cinética y transferencia de oxígeno adecuada para una buena recuperación de biomasa y proteína insecticida para su posterior formulación y envase (Buitrago 2004; Icgén *et al.*, 2002). Adicionalmente, los bioinsecticidas a base de Bt se clasifican en productos de primera, segunda y tercera generación (Portela-Dusán *et al.*, 2013). Los productos de primera generación, están constituidos por esporas y cristales, presentan varios inconvenientes dados su estrecho rango de actividad en diversas plagas, poca persistencia en campo debido a la radiación solar, y no alcanzan insectos que atacan raíces o partes internas del vegetal. Estos problemas, se lograron mejorar con el empleo de productos de segunda generación, que contienen como ingrediente activo esporas y toxinas de cepas con introducción de genes de otras cepas la cual es de gran utilidad al mejorar la acción frente al insecto generó un sinergismo, además de disminuir las posibilidades de resistencia. Los biopesticidas Bt de tercera generación, que contienen como ingrediente activo bacterias recombinantes, especialmente *Pseudomonas fluorescens* o *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, son capaces de llegar hasta tejidos vegetales y crecer en la rizosfera. La cuarta generación de estos bioinsecticidas la constituyen quimeras de proteínas (Buitrago, 2004). La compañía Abbott tiene, productos Dipel a base de la serovariedad *kurstaki* (genes Cry1Aa, Cry1Ab1, Cry1Ac1, Cry2Aa1, Cry2Ab1) y Xentari (Bt *aizawai* con genes Cry1Aa1, Cry1Ab1, Cry1Ba1, Cry1Ca1, Cry1Da1) que poseen letalidad hacia insectos lepidópteros. Ecogen Inc. Ha promocionado los biopesticidas Lepinox (a base de Bt *kurstaki*) y Crymax (cepa Bt ED7826 con genes Cry1Ac, Cry2A y Cry1C) de letalidad hacia lepidópteros (Buitrago, 2004).

Los ensayos biológicos con las endotoxinas del Bt implican la medición de la potencia del agente activo sobre un estado específico del organismo y permiten, evaluar la actividad tóxica de una cepa, producto activo u organismo recombinante sin que los resultados se vean afectados por las variaciones propias de los sistemas biológicos del insecto (Martínez, 2004;

Portela-Dusán *et al.*, 2013). Para el suministro de las endotoxinas Bt al insecto, se utiliza un sustrato alimenticio (dieta), que permite estimar la actividad de una cepa microbiana (Portela-Dusán *et al.*, 2013). Las dietas pueden ser naturales si implica la utilización de los mismos materiales que el insecto consume en campo, artificiales si los componentes naturales son suplementados con otro tipo de nutrientes que se suponen suplen las necesidades de la plaga o son reemplazados totalmente por materiales diferentes a los naturales; artificiales-merídicas si incluyen a la vez elementos de composición conocida (ácido ascórbico, vitaminas, colesterol, etc.) y desconocida (harinas, levaduras, aceites, etc.) y oligídicas si tienen elementos de composición desconocida o materiales crudos (Martínez, 2004; Portela-Dusán *et al.*, 2013). Para adicionar el producto microbiano (esporas, cristales, protoxinas, toxinas activadas u otros) en la dieta del insecto, se pueden realizar mezclas con el agua de preparación de la dieta, o contaminar superficialmente (el bioproducto se esparce y se deja secar), aplicar microgoteo de la muestra a evaluar a manera de atrayente (generalmente sacarosa), la contaminación del alimento natural (hojas, tubérculos o tallos) con la suspensión de la muestra por aspersión, barnizado o inmersión. El bioensayo se realiza con pruebas que consisten en amplios rangos de concentración de producto activo, para determinar su concentración letal media (CL50) y otras concentraciones, un control negativo que debe contemplarse agua o soluciones buffer (si el bioproducto lo contiene), y en algunos casos se emplea, un control positivo (en general una cepa o toxina de la cual ya se reconozca su efecto). En ocasiones se puede usar un control absoluto que puede ser una sustancia letal para el insecto, aunque no esté relacionada con el bioproducto a evaluar (Martínez, 2004). Los ensayos biológicos se realizan comúnmente sobre larvas de primer o segundo instar ya que son los estados más susceptibles del insecto, dan una respuesta más exacta del nivel de actividad de la cepa bacteriana, generalmente son los instares a controlar en campo, está disponible en un número más grande que otros instares, el periodo de bioensayo es generalmente corto y la precisión es más alta ya que la mortalidad es uniforme y los intervalos de confianza son más pequeños (Navon, 2000). Para evaluar efectos a largo plazo y daños intestinales se puede utilizar instares avanzados. Es conveniente monitorear el peso, tamaño y describir el instar larval, se deben utilizar neonatos de 0 a 12 horas de eclosión y con privación de alimento, la mortalidad se evalúa entre 48 a 96 horas.

Por otro lado, para realizar un control biológico en una plaga, los investigadores se han enfocado en la producción de plantas transgénicas, constituídas por endotoxinas del Bt, y en poblaciones de *S. frugiperda* del Argentina, Brasil, Puerto Rico y Sur de Estados Unidos, este insecto ya ha desarrollado resistencia a las proteínas Cry1 (Paredes-Sánchez *et al.*, 2021). La implementación de plantas transgénicas de maíz con la endotoxina Cry1A ha demostrado la habilidad del insecto a desarrollar tolerancia rápidamente por lo que su empleo no debería ser extendido dadas las observaciones realizadas en estos países según Paredes-Sánchez *et al.* (2021). Estos autores también mencionan que la susceptibilidad de *S. frugiperda* a las endotoxinas Cry1Ab, Cry2Ab, Cry1Fa, y Vip3Aa también han sido evaluadas en varios países (Lemes *et al.*, 2014;

Soares *et al.*, 2019) ya que en los últimos años, se han producido cultivos con combinaciones de varias endotoxinas del Bt, algunos de ellos involucran las endotoxinas Cry y Vip y también se ha estudiado el sinergismo entre las endotoxinas entre Cry1Ab y Cry1Fa y cadherina (SG-Cad) empleó la técnica CRISPR/Cas9 y la tecnología de edición genómica en ensayos de líneas celulares de *S. frugiperda* por lo cual nuevas metodologías se están utilizó para la mejora del manejo de este insecto.

Respecto a los estudios relacionados con la respuesta de los biotipos de *S. frugiperda* ante las endotoxinas del *B. thuringiensis* Ríos-Díez *et al.* (2012) produjeron de los pocos trabajos en los que se comparan las poblaciones de este insecto, en condiciones de laboratorio, para determinar si los biotipos de maíz y arroz, difieren en sus respuestas ante las endotoxinas Cry1Ac y Cry1Ab. Por ello, el propósito principal de este capítulo es mostrar los estudios realizados por Juan Diego Ríos Díez en su tesis de maestría (Ríos-Díez, 2011) y en la continuación de un proyecto de MinCiencias enfocado en establecer si existen diferencias en las respuestas de tolerancia de los biotipos de *S. frugiperda* ante los insecticidas lambdacialotrina y metomil y las endotoxinas del Bt Cry1Ac y Cry1Ab. Estos análisis conllevaron a la publicación de dos artículos cuyos autores fueron Ríos-Díez y Saldamando-Benjumea (2011) y Ríos-Díez *et al.* (2012) que se explicarán a continuación.

6.2 Análisis de la respuesta de resistencia de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* a insecticidas y endotoxinas del *Bacillus thuringiensis*

Para realizar las evaluaciones de respuesta de *S. frugiperda* y sus biotipos a dos insecticidas y dos endotoxinas del Bt, se llevaron a cabo salidas de campo en el mes de abril de 2009, y colectaron al azar larvas en todos los instar de este insecto, en cultivos de maíz y arroz en el departamento de Tolima, las del biotipo de maíz fueron colectadas en el municipio de Mariquita Vereda San Felipe (N 05° 06' 42.08" WO 74° 53' 35.03" con una precisión de 7 mts), en el municipio de San Luis Corregimiento de Payyé (N 04° 12' 48.2" WO 75° 06' 29" con una precisión de 7 mts), las del biotipo de arroz fueron colectadas en el municipio de Ambalema (N 04° 42' 26.8" WO 74° 50' 47.9" con una precisión de 9 mts), en el municipio de Ibagué vereda Buenos Aires (N 04° 20' 46.6" WO 75° 05' 43.3" con una precisión de 8 mts). Las muestras colectadas se llevaron al cuarto de cría ubicado en la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín con el objeto de establecer un pie de cría con estos individuos.

Una vez las larvas se ubicaron en el insectario, se separaron con base a su origen de colección, y posteriormente fueron rotuladas por localidad y tipo de cultivo en vasos de 15 Oz. Después

de la emergencia de las larvas, sus adultos fueron cruzados para mantener una línea parental de maíz, una de arroz con sus respectivas generaciones filiales. Los huevos que se obtuvieron de sus hembras, fueron recolectados diariamente y aislados para evitar la contaminación, cuyo emergencia las larvas se alimentaron con una variación de la dieta meridica en base a frijol, reportada por Arévalo-Maldonado *et al.* (2009).

Una vez establecida la colonia de *S. frugiperda*, sus poblaciones se separaron en tres grupos de cada biotipo de acuerdo al tipo de tratamiento: el primer grupo fue sometido a presión de selección con el insecticida lambdacihalotrina, el otro con metomil y el tercer grupo constituyó la colonia control que no fue expuesta a ningún tipo de tratamiento. Los bioensayos para la estimación de las concentraciones letales medias CL_{50} de los insecticidas, se realizaron con el método de inmersión de larvas del tercer instar en dosis previamente seleccionadas para cada compuesto químico, durante un tiempo de 30 segundos (Morillo y Notz, 2001). Estas dosis fueron preparadas a partir de una solución madre para cada insecticida. En la inmersión se utilizaron grupos de 5 larvas y se realizaron 10 repeticiones por cada dosis. Como tratamiento control se emplearon larvas de la misma edad en agua destilada. Transcurrido el tiempo de inmersión, las larvas fueron colocadas sobre papel absorbente y se mantuvieron separadas en vasos de 15 Oz, sin alimento y 24 horas después de la inmersión. Posterior a ello, se cuantificó el número de larvas vivas y muertas. Para las evaluaciones de las concentraciones letales, se utilizaron las concentraciones de las CL_{50} , CL_{60} , CL_{70} y CL_{80} para las generaciones parentales P_0 , F_1 , F_2 y F_3 respectivamente.

Los resultados de mortalidad se sometieron al análisis de varianza mediante un análisis de regresión de Probit (Morillo y Notz, 2001) para determinar las concentraciones letales medias estimadas CL_{50} . La resistencia de *S. frugiperda* a los insecticidas se determinó mediante la comparación (razón) de las CL_{50} de las colonias sometidas a los insecticidas separadamente en cada generación, con los datos de la concentración CL_{50} respectiva de colonias venezolanas enfrentadas a los mismos tratamientos y de la “colonia GV” del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA) con sede en Gainesville, Florida cuyo dato se encuentra en el artículo de los autores Morillo y Notz (2001), puesto que esta colonia ha permanecido por más de doce (12) años sin ningún tipo de exposición a insecticidas, por ello, dicha colonia, se tuvo en cuenta como una línea susceptible a los insecticidas evaluados en el presente proyecto. La tasa de desarrollo de resistencia (r) en las generaciones sometidas a presión de selección para cada insecticida, se calculó mediante la fórmula: $r = (\log CL_{50FX} - \log CL_{50P_0}) / (\log N_0G)$, donde: CL_{50FX} es la concentración letal media de la generación seleccionada, CL_{50P_0} es la concentración letal media de la generación parental y N_0G el número de generaciones (Morillo y Notz, 2001).

Los resultados obtenidos por Ríos-Díez y Saldamando -Benjumea (2011) sugirieron que, bajo las mismas condiciones de laboratorio, ambos biotipos de *S. frugiperda* presentan una respuesta diferente a cada insecticida. Esta respuesta se ve reflejada en la viabilidad de los huevos de ambos biotipos ya que la mortalidad fue del 68% en el biotipo de arroz y de 57% en el biotipo de maíz (Tabla 6.1). Además, los resultados muestran que los insecticidas no solamente afectan las larvas tratadas sino también la fertilidad de su progenie.

Tabla 6.1. Efectos en el ciclo biológico del insecto a causa de los tratamientos con insecticidas. L = lambdacialotrina, M = metomil. (Tomado de la Maestría de Juan Diego Ríos Díez)

Individuos	Tiempo De incubación	Desarrollo larva	Desarrollo pupa	Desarrollo de adultos		Peso en gr pupas		% Huevos* no viables
				Machos	Hembras	Machos	Hembras	
ARROZ	3.10	23.97	11.57	11.96	11.73	0.21	0.22	14.14
ARROZ F1 (L)	3.40	25.40	10.75	4.50	11.50	0.21	0.21	24.19
ARROZ F2 (L)	3.50	35.50	11.00	9.00	17.50	0.24	0.22	68.18
ARROZ F3 (L)	3.50	24.20	10.40	10.00	14.50	0.23	0.22	35.52
ARROZ F1 (M)	3.50	35.33	12.00	23.00	12.00	0.24	0.20	65.30
ARROZ F2 (M)	3.50	38.17	11.60	16.80	15.75	0.23	0.21	57.69
ARROZ F3 (M)	3.20	36.00	10.00	10.00	10.50	0.23	0.21	25.49
MAÍZ	3.34	24.56	11.15	11.39	11.88	0.22	0.23	22.00
MAÍZ F1 (L)	4.00	37.20	25.80	10.25	10.75	0.22	0.23	67.41
MAÍZ F2 (L)	3.70	33.00	11.50	7.80	7.20	0.21	0.22	56.32
MAÍZ F1 (M)	3.67	26.00	9.50	17.00	15.50	0.22	0.22	55.55
MAÍZ F2 (M)	4.25	27.00	11.50	15.00	7.00	0.19	0.20	51.35

El tiempo corresponde a los días en los que el insecto permanecía en un estado para pasar al siguiente. Los huevos no fueron contabilizados individualmente, se tomaron por masas de huevos depositados en cada oviposición.

Los resultados de la tabla de contingencia muestran que el efecto de la lambdacialotrina no es significativamente diferente entre las masas de huevos evaluadas en presencia y ausencia del insecticida, mientras que, por el contrario, el efecto del metomil si es significativo (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Tabla de contingencia de viabilidad de huevos de los biotipos de *S. frugiperda* en presencia de los insecticidas evaluados. Sin = sin tratamiento, Con = con tratamiento. (Tomado de la Maestría de Juan Diego Ríos Díez)

		METOMIL					LAMBDAHALOTRINA		
		Sin	Con				Sin	Con	
Arroz	Observado	488	51	539	Arroz	Observado	488	76	564
	Esperado	499.86	39.14			Esperado	492.57	71.43	
Maíz	Observado	636	37	673	Maíz	Observado	636	87	723
	Esperado	624.14	48.86			Esperado	631.43	91.57	
Total		1124	88	1212	Total		1124	163	1287
Chi-cuadrado = 6.985, GL = 1, p = 0.008					Chi-cuadrado = 0.596, GL = 1, p = 0.440				

Por otro lado, los resultados de los caracteres del ciclo de vida de los biotipos, muestran que en general existen diferencias significativas para la mayoría de ellos, por ejemplo: el aumento del tiempo de desarrollo de los huevos, larvas y adultos y a su vez en el aumento de la mortalidad en las líneas sometidas a los insecticidas, sobre todo a las generaciones F_1 y F_2 , esto sugiere que los insecticidas tienen un efecto en el fitness de estas líneas híbridas en este insecto (Tabla 6.3).

La respuesta de cada biotipo a los insecticidas mostró que su tolerancia varía de generación en generación. En el caso del metomil, ambos biotipos presentan una progresiva pero lenta respuesta de resistencia, mientras que en el caso de lambdacialotrina, la respuesta es más rápida, sobre todo para el biotipo de arroz (Tabla 6.4). Adicionalmente, para el caso del metomil, la CL50 para el biotipo de maíz fue de 380.01 ppm mientras que la CL50 para el biotipo de arroz fue de 445.14 ppm, esto sugiere que el biotipo de maíz es más susceptible a este insecticida que el biotipo de arroz. Para el insecticida lambdacialotrina, el valor de la CL50 fue de 45.01 ppm para el biotipo de maíz y de 31.16 ppm para el biotipo de arroz. Respecto a la susceptibilidad a los insecticidas, se puede notar un incremento de la misma en los dos biotipos para la lambdacialotrina en la generación F_1 . Sin embargo, el desarrollo de tolerancia al insecticida lambdacialotrina fue más rápido para el biotipo de arroz que para el biotipo de maíz (Tabla 6.4). Por otro lado, la respuesta al metomil fue mayor para el biotipo de arroz en su generación F_1 ya que tolero una concentración de 483.02 ppm mientras que biotipo de maíz tolero 409.19 ppm.

Respecto al desarrollo de resistencia (r) de los biotipos de *S. frugiperda*, estos autores encontraron que el biotipo de arroz desarrolló mayor resistencia a la lambdacialotrina comprado con el biotipo de maíz dado que el valor de $r = 0.47$ para el biotipo de maíz (generación F_3) y de 1.21 para el biotipo de arroz (generación F_3). De manera similar, la resistencia al metomil fue de 0.25 para el biotipo de maíz y de 0.55 para el de arroz (Tabla 6.4).

Ambos biotipos de *S. frugiperda* mostraron que en condiciones de laboratorio ellos desarrollan una rápida respuesta a la presión de selección generada por la lambda-cialotrina comparado con el metomil. Resultados parecidos al encontrado por Díez-Rodríguez y Omoto (2001) en Brasil. Un aspecto interesante respecto a *S. frugiperda* del Tolima, es que los valores de la CL50 encontrados para los biotipos fueron mucho más altos que los valores obtenidos para la misma especie de poblaciones de Venezuela y de Gainesville usadas por Morillo y Notz (2001). Esto sugiere que el control químico del insecto que se realiza en Colombia es mucho más severo que en Venezuela. Adicionalmente, cuyo el desarrollo de resistencia fue analizado, se encontró que el biotipo de arroz presenta una resistencia mayor con el insecticida lambda-cialotrina desde la generación parental hasta la tercera generación comparado con la colonia de Gainesville estudiada por Morillo y Notz (2001). No obstante, el desarrollo de resistencia al metomil no fue tan diferente entre estas poblaciones. Adicionalmente, la resistencia a la lambda-cialotrina del biotipo de maíz del departamento del Tolima, muestra un incremento de 50 a 80 veces superior a la colonia de Gainesville que pertenecía a un cultivo de maíz, mientras que el incremento al metomil aumentó de 3 a 3.98 veces.

Ríos-Díez y Saldamando-Benjumea (2011), consideran que la variación en la respuesta a insecticidas entre su estudio y los trabajos realizados por otros autores se debe a: a) la región (país) donde el insecto se encuentra ya que el manejo del mismo difiere por cultivo y por localidad dado que hay países tropicales y otros templados, b) la acción del insecticida en la fisiología del insecto, c) en el biotipo del insecto, sea de maíz o arroz y d) los métodos usados por distintos autores, para evaluar la susceptibilidad y el desarrollo de resistencia. Por todas estas razones, existieron diferencias entre el trabajo realizado en Colombia y las poblaciones analizadas por Adamczyk *et al.* (1997) de los Estados Unidos. Aunque, en este trabajo los autores no realizaron una comparación de los biotipos de *S. frugiperda* ni utilizaron diferentes insecticidas como en el trabajo realizado en Colombia.

Posterior al trabajo con insecticidas, en el mismo laboratorio de Ecología y Evolución de insectos, se continuó con el estudio de la respuesta de los biotipos de *S. frugiperda* a las endotoxinas Cry1Ac y Cry1Ab, en un trabajo publicado por Ríos-Díez *et al.* (2012). Este trabajo se llevó a cabo puesto que la resistencia de este insecto al Bt había sido analizado previamente con las endotoxinas Cry 1AC (Buntin *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2010), y Cry1F (Storer *et al.*, 2010) en poblaciones del insecto de los Estados Unidos, México y Puerto Rico, pero este tipo de estudios jamás se habían realizado en Colombia, particularmente con los biotipos de maíz y arroz del insecto.

Ríos-Díez *et al.* (2012) realizaron su investigación con la misma colonia de *S. frugiperda* colectada en abril de 2009 que fue utilizada para la evaluación de los insecticidas y los biotipos de esta polilla. El mantenimiento de la cría fue idéntico al realizado por Ríos-Díez y

Saldamando-Benjumea (2011). La diferencia consistió en que, en la dieta basada en frijol usada para la alimentación de las larvas, se realizaron experimentos se adicionó la proteína de las endotoxinas Cry a la dieta. Ríos-Díez *et al.* (2012) establecieron las concentraciones CL50 en una colonia del insecto que se separó en tres grupos: un grupo control, un grupo tratado con la endotoxina Cry1Ac y otro con la endotoxina Cry1Ab. Para examinar el efecto de estas endotoxinas en los biotipos de *S. frugiperda*, neonatos de primer instar se ubicaron en vasos de 1.5 onzas con dietas artificiales que contenían las proteínas purificadas de las endotoxinas Cry1Ac y Cry1Ab por separado y una solución de Tween 20 al 0.01%. Diferentes concentraciones de las endotoxinas (62.5 ng/cm², 250 ng/cm², 500ng/cm², 700 ng/cm² y 1000 ng/cm²) fueron colocadas en los vasos de 1.5 onzas (Santoso *et al.*, 2004). Para cada tratamiento, ellos usaron entre 60 y 100 larvas a las que se les evaluó la mortalidad después de las 72h de exposición a la dieta. Para las evaluaciones de las concentraciones letales, se utilizaron las concentraciones de las CL50, CL60, CL70 y CL80 para las generaciones parentales P₀, F₁, F₂ y F₃ respectivamente (Ríos-Díez y Saldamando Benjumea 2011). Los resultados de la mortalidad de las larvas se evaluaron con una prueba de regresión Probit y la resistencia a ambas proteínas se analizó por separado, siguiendo la metodología de Ríos-Díez y Saldamando Benjumea (2011).

Los resultados obtenidos mostraron que, se requieren concentraciones mucho más altas de la endotoxina Cry1Ac que de Cry1Ab para producir una mortalidad del 50% en las larvas de *S. frugiperda*. Además, observaron que el biotipo de maíz es mucho más resistente a las endotoxinas que el biotipo de arroz, esto dado que la concentración letal media para el biotipo de maíz fue de 193.42 ng/cm³ y para el biotipo de arroz fue de 139 ng/cm³ para la endotoxina Cry1Ab y de 1359.23 ng/cm³ para el biotipo de maíz y de 790.24 ng/cm³ para el biotipo de arroz con la endotoxina Cry1Ac (Tabla 6.4).

De todas formas, se puede notar que, en la tercera generación, ambos biotipos toleraron concentraciones mas bajas de las endotoxinas compradas con las generaciones previas, sobre todo el biotipo de maíz (Tabla 6.4). Respecto al desarrollo de resistencia (*r*) al Bt se encuentra que la mayoría de los valores son negativos para el biotipo de maíz y estos resultados no se esperaban en este tipo de tratamientos.

Esto indica que este tipo de experimentos deben realizarse de nuevo en el futuro. No obstante, los resultados del trabajo de Ríos -Díez *et al.* (2012) corroboran lo encontrado por Zenner de Polania *et al.* (2008), en el Tolima y por Adamczyk *et al.* (1997) en Estados Unidos ya que el biotipo de maíz es mas resistente a las endotoxinas del Bt que el biotipo de arroz y este tipo de resultados no debe ser sorprendente dado que las poblaciones de *S. frugiperda* que atacan el cultivo de maíz, se encuentran controladas con cultivos transgénicos en Colombia, por lo que han tenido mucho tiempo de interacción con estos cultivos, a diferencia de las poblaciones del biotipo de arroz. Como se ha mencionado antes, otros trabajos relacionados con la respuesta

de esta polilla al Bt se han llevado a cabo en México, Estados Unidos y Puerto Rico con las endotoxinas Cry1Ac y Cry1F (Buntin *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2010; Storer *et al.*, 2010, Zhu *et al.*, 2015; Gimenez *et al.*, 2020). Sin embargo, hasta ese entonces solo las poblaciones, de este insecto, de Puerto Rico eran resistentes a la endotoxina Cry1F, lo que significa que la resistencia al Bt es el resultado de la adaptación local del insecto a este tipo de control (Storer *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2015; Giménez *et al.*, 2020).

Tabla 6.3. Respuesta de la presión de selección de las líneas evaluadas de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio en presencia de los insecticidas lambdacialotrina y metomil. (Tomado de la de maestría de Diego Ríos Díez) (GV) colonia susceptible de Gainesville, Florida. *a* La concentración letal 50 está expresada en partes por millón (ppm). Probit Analysis Program (Raymond, 1985). *b* Error Estándar. *c* Intervalo de confianza. *d* Pendiente de la curva. *e* Razón de resistencia, CL50 de las líneas tratadas / Lc₅₀ de la colonia susceptible de Gainesville, Florida (GV). *f* Razón de resistencia, CL50 de las líneas tratadas / Lc 50 de colonias Venezuela evaluadas en la Po y F₃. *g* *r*, tasa de desarrollo de resistencia. (Tomado de la tesis de Maestría de Juan Diego Ríos -Díez)

Linea	Tratamiento	Generación	cl ₅₀ ^a	E.S ^b	i ^c		b ^d	rr ₅₀ ^e	rr ₅₀ ^f		r ^g		
					Inferior	Superior			Po	F3			
G.V.	Lambdacialotrina	—	0.90	—	0.60	1.20	1.37	—	—	—	—		
G.V.	Metomil	—	124.40	—	98.80	154.70	1.64	—	—	—	—		
Ven.	Lambdacialotrina	Po	17.50	—	9.60	32.50	1.31	19.44	—	—	—		
		F3	13.00	—	7.00	18.40	0.91	14.44	—	—	—		
		Po	396.20	—	322.10	466.00	1.9	3.18	—	—	—		
Ven.	Metomil	F3	558.10	—	442.90	679.50	1.44	4.49	—	—	—		
		Arroz	Lambdacialotrina	Po	31.16	3.66	25.43	37.94	4.10	34.62	1.78	2.40	—
				F1	28.38	2.15	24.28	32.82	—	31.53	1.62	2.18	—
F2	96.68			11.91	78.18	128.73	—	107.42	5.52	7.44	1.63		
Arroz	Metomil	F3	117.52	13.06	97.17	152.23	4.14	130.58	6.72	9.04	1.2		
		Po	445.14	40.31	355.97	547.00	4.14	3.58	1.12	0.80	—		
		F1	483.02	38.45	411.66	565.60	—	3.88	1.22	0.87	—		
	Lambdacialotrina	F2	508.45	36.87	439.98	587.67	—	4.09	1.28	0.91	0.19		
		F3	811.41	68.70	684.65	960.04	4.14	6.52	2.05	1.45	0.55		
		Po	45.01	7.17	33.10	62.97	4.84	50.01	2.57	3.46	—		
Maíz	Lambdacialotrina	F1	27.61	2.65	22.75	33.35	—	30.68	1.58	2.12	—		
		F2	72.29	3.33	66.20	79.42	5.00	80.33	4.13	5.56	0.68		
	Metomil	Po	380.01	55.21	275.10	355.97	2.29	3.05	0.96	0.68	—		
		F1	409.19	39.99	334.61	493.71	—	3.29	1.03	0.73	—		
		F2	495.24	21.01	455.95	539.53	2.26	3.98	1.25	0.89	0.38		
		F3	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

Como lo mencionan Ríos -Díez *et al.* (2012), la resistencia al Bt de *S. frugiperda* difiere entre países ya que depende de la manera como el insecto es manejado de manera local y por ello se encontró que en México distintas poblaciones del mismo país respondieron diferentemente en su resistencia a esta endotoxina según López-Edwards *et al.* (1999) y como se observó en Estados Unidos por Adamczyk *et al.* (1997) en los Estados Unidos. Por lo tanto, es importante considerar no solamente la existencia de los biotipos, sino también las diferencias del manejo del insecto a nivel local, sobre todo el hecho de que el biotipo de maíz resiste más al Bt que el biotipo de arroz, por la exposición de sus poblaciones a cultivos transgénicos (Zhu *et al.*, 2015; Gimenez *et al.*, 2020).

Según los resultados obtenidos por Ríos-Díez *et al.* (2012), los autores sugieren que para el manejo de *S. frugiperda* en el departamento del Tolima es más adecuado utilizar la endotoxina Cry1Ab que la Cry1Ac dado que el desarrollo de resistencia tomó más tiempo para la primera endotoxina. No obstante, ellos reconocen que solo analizaron 3 generaciones del insecto por lo que más estudios de este tipo deberán realizarse en el futuro.

Tabla 6.4. Respuesta de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* expuestos a dos endotoxinas del Bt. (Tomado maestría de Diego Ríos Díez). ^a CL50 (en ppm). Análisis Probit (Raymond 1985). ^b S. E. ^c Intervalo de confianza. ^d Pendiente. ^e CL50 proporción de resistencia (Tomado del informe a MinCiencias proporcionado por Juan Diego Ríos-Díez).

Línea	Tratamiento	Generación	CL50 ^a	S. E. ^b	<i>i</i> c ^c	χ^2	SD	P	<i>b</i> ^d	<i>r</i> ^e	
Arroz	Ab	Po	139.00	11.69	115.83	162.17	3.09	3.09	0.38	3.88	—
		F1	150.20	12.61	125.34	175.40	0.16	0.15	0.98	4.09	0.11
		F2	168.66	16.91	135.63	203.44	0.34	0.34	0.95	4.25	0.18
		F3	122.98	29.75	62.64	180.23	4.67	4.60	0.19	14.04	-0.09
	Ac	Po	790.24	57.39	684.78	914.76	85.10	89.16	***	3.89	—
		F1	874.79	66.67	754.89	1023.36	78.70	90.74	***	4.09	0.15
		F2	960.36	93.99	797.72	1184.45	51.84	63.84	***	4.25	0.18
		F3	1249.18	189.72	919.69	1740.71	62.25	85.16	***	14.04	0.33
Maíz	Ab	Po	193.42	22.70	155.52	250.05	1.98	1.95	0.57	8.13	—
		F1	192.64	21.52	156.44	245.54	3.05	3.01	0.38	4.04	-0.01
		F2	196.63	25.65	154.49	263.11	3.18	3.15	0.36	6.56	0.01
		F3	119.33	17.46	85.16	155.05	4.44	4.60	0.22	8.75	-0.35
	Ac	Po	1359.23	174.55	1080.36	1820.13	5.75	5.93	0.12	8.13	—
		F1	1310.86	157.83	1054.87	1717.15	6.15	6.36	0.10	4.04	-0.05
		F2	1300.71	181.02	1013.52	1791.93	5.03	5.26	0.17	6.56	-0.04
		F3	763.61	105.83	558.38	983.53	1.57	1.60	0.66	8.75	-0.42

6.3 Conclusiones generales del control de *S. frugiperda*

Uno de los más importantes hallazgos del trabajo realizado en este capítulo radica en el hecho de que los biotipos de *S. frugiperda*, difieren en su respuesta de resistencia a los insecticidas y a las endotoxinas del *B. thuringiensis* en condiciones de laboratorio. Esto significa que el flujo de genes que confiere resistencia a un control químico o biológico entre estas dos poblaciones es muy reducido y por lo tanto las estrategias de control del insecto, deben tener en cuenta la existencia de sus biotipos.

Otro aspecto importante, es que el biotipo de arroz, responde más rápido y con mayor eficacia a los insecticidas lambdacialotrina y metomil que el biotipo de maíz, y esto muy probablemente se deba a que, en Colombia, el cultivo de arroz es controlado extensivamente con controles químicos, por lo que la resistencia hacia los mismos generados por los insectos se produce más fácilmente dada su constante exposición.

Por otro lado, el biotipo de maíz es más tolerante a las endotoxinas Cry1Ac y Cry1Ab que el biotipo de arroz, puesto que su respuesta ante estos controles biológicos es más rápida y a su vez tolera más su cambio de concentración con el tiempo comparado con el biotipo arroz. La respuesta que ha producido el biotipo de maíz con las endotoxinas del Bt, no es sorprendente ya que desde el año 2004 se han venido cultivando, en el departamento del Tolima, productos de maíz y algodón transgénicos, por lo que el tiempo de exposición hacia los mismos por parte de plagas como *S. frugiperda* ha sido largo y además este insecto nunca mostró una susceptibilidad hacia éstos, implicó un aumento de las densidades poblacionales de este insecto afectó más gravemente estos cultivos.

Desde el punto de vista genético y la resistencia a insecticidas y al Bt, es conocido que las poblaciones de *S. frugiperda* de Puerto Rico han sido ampliamente estudiadas debido a que se ha comprado la resistencia de éstas ante diversos insecticidas y endotoxinas del *B. thuringiensis*, particularmente la endotoxina Cry1F, por el uso exagerado de éstos (Zhu *et al.*, 2015, Giménez *et al.*, 2020). Las poblaciones de Puerto Rico han mostrado tener resistencia a varias endotoxinas del Bt, entre ellas: Cry1Ac y Cry1Fa. Estudios comparativos entre líneas resistentes y susceptibles de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio realizados por Zhu *et al.* (2015) mostraron que las poblaciones de Puerto Rico presentaron una tolerancia muy alta la endotoxina Cry1Fa, puesto que fueron, 7.717 veces superiores a la línea susceptible y 42 veces más resistentes a la endotoxina Cry1Ac. Estos autores también evaluaron la actividad de las enzimas digestivas en las larvas y encontraron que estas poblaciones de Puerto Rico presentaron una reducción en las actividades de las enzimas alcalina fosfatasa (ALP), aminopeptidasa (APN), 1 NA y 2NA esterases, tripsina y quimiotripsina e incrementos significativos en las enzimas PNPA esterases y glutatión – transferasa (GTS) comparado

con las larvas susceptibles. Estos experimentos demostraron que las poblaciones de *S. frugiperda* de Puerto Rico, no solamente presentan resistencia a endotoxinas del Bt, sino también al insecticida acetato, el cual se caracteriza por ser un organofosforado. Estas poblaciones evaluadas provienen de cultivos de maíz de Puerto Rico y de una aislina de Monsanto que es caracterizada por ser susceptible al Bt e insecticidas.

Posterior a este trabajo con las poblaciones de *S. frugiperda* de cultivos de maíz de Puerto Rico, Giménez *et al.* (2020) realizaron un análisis comparativo genómico entre las poblaciones de Puerto Rico resistentes a Bt y a insecticidas vs poblaciones del insecto de Mississippi, teniendo en cuenta evaluaciones de sus larvas en condiciones de laboratorio en bioensayos con el insecticida deltametrina, que es un piretroide. Este estudio lo realizaron para determinar si la variación en la copia de genes de desintoxicación (CNV) se asociaban a efectos de selección natural positiva (que es una selección direccional ante poblaciones bajo presión artificial generada por insecticidas). Los genes de desintoxicación involucran al gen del citocromo P450, los genes de las esterasas, de las glutatión- S- transferasas, (GST), de los genes de la UDP o gluconosil transferasas y los genes del estrés oxidativo. En su análisis, ellos compararon los genomas de larvas de Puerto Rico (resistentes) vs larvas de Mississippi (susceptibles, de la línea de Monsanto) y compararon poblaciones de maíz y arroz. En este estudio, Giménez *et al.* (2020) evidenciaron que la genética de poblaciones de estas larvas se diferenció más geográficamente, que, por el hospedero, indicó que los genes que confieren resistencia a insecticidas son diferentes a los genes que confieren adaptación al hospedero. Estos autores, habían planteado una hipótesis sobre la cual argumentaban que los genes que controlan la asociación de los biotipos a sus hospederos, debieron evolucionar antes que los genes que confieren resistencia, pero las poblaciones de Puerto Rico mostraron que el insecto evoluciono una rápida resistencia al Bt y a insecticidas por la presión ejercida por los humanos. En este estudio, compararon las secuencias del genoma de ambas poblaciones con un genoma de referencia de *S. frugiperda* encontró un tamaño de 384.455.365 bp, un número de secuencias de 125, y un N50 de 13.151.234, sus scaffolds fueron de 31 aproximándose al número total de cromosomas del insecto que se ha determinado que varía entre 29 y 31. Los biotipos de *S. frugiperda* fueron identificados por medio de la secuenciación de todo su mitogenoma y encontraron que las poblaciones de Mississippi consistían en 9 individuos del biotipo de maíz y 8 del biotipo de arroz y las de Puerto Rico por 11 individuos de. biotipo de maíz y 4 de arroz. Al llevar a cabo un análisis de PCA y de Fst encontraron que la diferenciación genética entre las poblaciones se explica más entre los países (ósea el método de manejo del insecto) que entre los biotipos. Además, encontraron que los genes CNV, se encuentran bajo selección natural positiva, ya que el número de copias fue superior en las poblaciones de Puerto Rico que en las poblaciones de Mississippi. Resultados similares se han evidenciado con insectos como *S. exigua*, *S. litura* y *Helicoverpa armigera*.

En otro trabajo, también basado en los análisis de genomas con secuenciación de nueva generación de *S. frugiperda* realizado por Guan *et al.* (2021), los autores encontraron que mutaciones puntuales en las proteínas de la acetilcolinesterasa, la proteína del canal de sodio, las proteínas del canal de sodio (VGSC) y del receptor de la rianodina explicación la resistencia del insecto a insecticidas organofosforados, para ello, compararon genomas de 150 individuos colectados en China, Malawi, Ugya y Brasil. Las mutaciones puntuales fueron a nivel de tres sustituciones aminoacídicas (A201S, G227A y F290V) que hacen parte de un mismo gen: acetilcolinesterasa. Estudios de resistencia de *S. frugiperda* a compuestos organofosforados ya se habían realizado con anterioridad por Carvalho *et al.* (2013) en poblaciones del insecto de Brasil, pero este tipo de trabajos no se había realizado en poblaciones del insecto del hemisferio oriental y estos autores aseguran que las poblaciones que llegaron a este hemisferio ya presentaban los genes que confieren resistencia a insecticidas en esta plaga que desde el año 2016 fue reportada por primera vez en esta parte del mundo.

Más adelante, Gui *et al.* (2022), realizaron un análisis transcriptómico y genómico de poblaciones de *S. frugiperda* de este estudio, los autores demostraron que las poblaciones del insecto de China, se originaron del África. Que las poblaciones analizadas incluyeron los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* en Estados Unidos, pero que, en los demás países evaluados, solo encontraron al biotipo de maíz. Además, ellos identificaron una familia de genes de resistencia a 23 insecticidas denominada CYP (genes CYP4, CYP6, CYP9, CYP12 y CYP49) o del citocromo P450 al comparar poblaciones del insecto de Estados Unidos, China (Yunan, Guangxi), Sur África y Etiopía. Para ello, compararon los cromosomas de individuos de estas poblaciones y encontraron alrededor de 8 genes de resistencia distribuidos en los cromosomas 2, 6, 12, 18, 22 y 24 del insecto. También, compararon las proporciones de los genes que confieren resistencia, entre ellos los genes de Casete de unión a ATP (ABC), carboxilesterasa (CES), citocromo P450 (CYP), glutatión S-transferasa (GST), glucuronosil transferasa UDP (UGT), aldehído oxidasa (AOX), quitinasa ácida (CHIA), epóxido hidrolasa (EPHX), ADN de 5' a 3' de PIF1 helicasa (PIF), Dominio parcheado (PTCHD) y genes de proteína tirosina fosfatasa (PTP) entre diferentes especies de lepidópteros (*Spodoptera litura*, *Helicoverpa armigera*, *Bombyx mori*, *Myuca sexta*, entre otros) y *Drosophila melanogaster*. Estos autores encontraron que los genes del citocromo P450 se encuentran más expresados en *S. frugiperda*.

Por otro lado, Yainna *et al.* (2021) también realizaron análisis comparativos genómicos de poblaciones de *S. frugiperda* de poblaciones del insecto que llaman nativas (poblaciones de Estados Unidos, México, Guyana Francesa, Brasil y Guadalupe) y poblaciones invadidas por el insecto (Ugya, Malawi, India, China y Benin) e identificaron diferencias mutacionales entre las poblaciones invasoras e invadidas el insecto en los genes que confieren resistencia a insecticidas y Bt. Entre ellos, los autores encontraron al gen de la acetilcolinesterasa (AChE) relacionado con la resistencia del insecto, a compuestos organofosforados y carbamatos, al gen

ABCC2 que confiere resistencia al Bt, al gen de la rionodina (RyR) que confiere resistencia a los insecticidas de las diamidas, y al gen VGSC (del canal de sodio) que confiere resistencia a insecticidas de piretroides. Ellos además demostraron que los genes que generan resistencia al Bt, que son los genes ABCC2, solo se encontraron en las poblaciones nativas, además encontraron una mayor cantidad de copias del gen del citocromo P450 en estas poblaciones nativas y mayores proporciones de mutaciones de resistencia de los genes de la acetilcolinesterasa en estas. Esto se explica por a alta presión de selección generada en las poblaciones nativas y explica la susceptibilidad hacia el Bt e insecticidas en las poblaciones invadidas de China, un país donde la invasión de *S. frugiperda* es reciente.

Estos últimos estudios de la respuesta de resistencia de *S. frugiperda* en otras partes del mundo es concordante con los resultados obtenidos en este capítulo, en los trabajos publicados de Ríos-Díez y Saldamando (2011) y Ríos-Díez *et al.* (2012) con los insecticidas y endotoxinas y los biotipos de *S. frugiperda* ya que el biotipo de arroz fue más tolerante a los insecticidas y el de maíz a las endotoxinas, reflejó el tipo de manejo que se ha dado al insecto a nivel mundial, ya que los insecticidas son ampliamente empleados en cultivos de arroz y los cultivos transgénicos en maíz. Es más, Ríos-Díez y Saldamando-Benjumea (2011) y Ríos-Díez *et al.* (2012) en sus artículos, emplearon el uso de la genética cuantitativa para calcular el número de genes que confieren resistencia a los biotipos de *S. frugiperda* a insecticidas y Bt y encontraron un bajo número de genes, lo cual también concuerda con los estudios genómicos mencionados con anterioridad. No obstante, es importante recalcar que la gran mayoría de los estudios de resistencia, se han enfocado en el biotipo de maíz, por lo que las evaluaciones con el biotipo de arroz son escasas. Es recomendable que, en futuras investigaciones, se analice la genómica de poblaciones de los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* de Colombia para lograr obtener hallazgos mas importantes para la mejora de su manejo, como lo han logrado los estudios mencionados anteriormente por diversos autores que han demostrado la necesidad de emplear la secuenciación de nueva generación para ampliar el conocimiento de la genética de resistencia de este insecto.

6.4 Referencias

- Adamczyk, J. R., Holloway, J. W., Leonard, B. R., y Graves, J. B. (1997). Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides y transgenic Bt cotton. *Journal of Cotton Science*, *1*, 21-28.
- Arévalo-Maldonado, H., y De Polanía I. Z. (2009). Evaluation of meridic diets for rearing *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, *12*, 91-100.
- Blanco, C. A., Portilla, M., Jurat-Fuentes, J. L., Sánchez, J. F., Viteri, D., Vega-Aquino, y P. Jackson, R. (2010). Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac y Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*, *35*, 409–415.
- Bravo A., Gill S.S., y Soberón M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry y Cyt toxins y their potential for insect control. *Toxicon*, *49*, 423-435
- Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Rodríguez-Almazan C, Pardo L, Soberón M. (2013). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, *6*, 17-26.
- Buitrago G. (2004). La producción de ingredientes activos con *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis en el control biológico*. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Editorial Buena Semilla. Bogotá, Colombia. pp. 233-273.
- Buntin, G. D., Lee, B. D. Wilson, D. M., y R. M. McPherson. (2001). Evaluation of Yieldgard transgenic resistance for control of fall armyworm y corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. *Florida Entomologist*, *84*, 37-42.
- Carvalho, R.A., Omoto, C., Field, L.M., Williamson, M.S., y Bass, C. (2018). Investigating the molecular mechanisms of organo-phosphate y pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS ONE* *8*, e62268
- Deguine, J. P., Aubertot, J. N., Flor, R. J., Lescourret F., Wyckhuys, K. A. y Ratnadass, G.A. (2021). Integrated pest management: good intentions, hard realities. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *41*, 1-38.
- De Maagd R.A., Bravo A., y Crickmore N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, *17*, 193-199.
- Devine, G.J., y Furlong, M.J. (2008). Insecticide use: context y ecological consequences. *Agric Human Values*, *24*(3), 281-306
- Díez-Rodríguez, G. I., y Omoto, C. (2001). Heranca da resistencia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacialotrina. *Neotropical Entomology*, *30*, 311-316.
- Ferrer, A (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. *26*(1), 155-17
- Gimenez, S., Abdelgaffar, H., Goff, G. Le, Hilliou, F., Blanco, C. A., Hänniger, S... y Nam, K. (2020). Adaptation by copy number variation increases insecticide resistance in the fall armyworm. *Communications Biology*, *3*, 664.

- Guan, F., Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Padovan, A., Walsh... y Wu, Y. (2021). Whole-genome sequencing to detect mutations associated with resistance to insecticides y Bt proteins in *Spodoptera frugiperda*. *Insect Science*, 28(3), 627–638.
- Gui, F., Lan, T., Zhao, Y., Guo, W., Dong, Y., Fang, D... y Kang, L. (2022). Genomic y transcriptomic analysis unveils population evolution y development of pesticide resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Protein y Cell*, 13, 513–531.
- Hayes WJ. (1991). *Chlorinated hydrocarbons insecticides*. En: Hayes WJ, Lawes ER, editors. *Pesticides studied in Man*. San Diego: Academic Press 731-868.
- Icgen Y., Icgen B., y Özcengiz, G. (2002). Regulación de crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon y nitrogen sources. *Research in Microbiology*. 153, 605-609.
- Jin, M-h., Tao, J-h., Li, Q, Cheng, Y., Sun, X-x., Wu K-M., y Xiao, Y-t. (2021). Genome editing of the SfABCC2 gene confers resistance to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Integrative Agriculture*, 20, 815-820.
- Lauwerys R. (1990). *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. 3ª ed. Paris: Masson 563.
- López-Edwards, M., Hernández-Mendoza, J. L., Pescador-Rubio, A., Molina-Ochoa, J., Lezmagutierrez, R., Hamm, J. J., y Wiseman, B. R. (1999). Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in México. *Florida Entomologist*, 82, 254-262.
- Martínez, W. (2004). Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis en el control biológico*. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 207-232.
- Morillo, F. y Notz, A. (2001). Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacihalotrina y metomil. *Entomotropica*, 16, 79 -87.
- Navon, A. (2000). *Bioassays of Bacillus thuringiensis products used against agricultural pests*. CAB International. Bioassays of entomopathogenic microbes y nematodes (eds. A. Navon y K.R.S. Ascher). pp. 1-24.
- Nuambote-Yobila, O., Bruce, A. Y., Okuku, G. O., Marangu, C., Makumbi, D., Beyene, et al. (2023a). Assessment of Resistance Mechanisms to Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* in Tropical Maize Inbred Lines. *Agronomy*, 13, 203.
- Pardo-López L., Soberón M., y Bravo A. (2012). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance y consequences for crop protection. *Fems microbiology reviews*, 37(1),3-22.
- Pigott C.R., y Ellar D.J. (2007). Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 71, 255-281.
- Raymond, M. (1985). Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour mocrodinnateur. *Cah. Orthoms. Se`r. Entomolog. Med. Et Parasitol*, 22, 117-121.

- Ríos-Díez, J. D. (2011). *Análisis de resistencia de los biotipos de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera, noctuidae) a dos insecticidas (Lambdacihalitronina y Metomil) usados para su control*. Tesis de Maestría en Ciencias Entomología. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. P68.
- Ríos-Díez, J. D., y C. I. Saldamando-Benjumea. (2011). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from Central Colombia to two insecticides, methomyl y lambda-cyhalothrin: a study of the genetic basis of resistance. *Journal of Economic Entomology*, 104, 1698-1705.
- Ríos-Díez, J. D., Siegfried, B., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2012). Susceptibility of *spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from central Colombia to Cry1Ab y Cry1Ac entotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*, 37, 281–293.
- Roh J.Y., Choi J.Y., Li M.S., Jin B.R., y Je Y.H. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, y Effective Tool for Insect Pest Control. *Journal of Microbiology y Biotechnology*, 17, 547-559.
- Romanelli, G., Virla, E., Duchowicz, P., Gaddi, A., Ruiz, D., Bernardi, D., Del Valle, E., y Autino, J. (2010) Sustainable synthesis of flavonoid derivatives, QSAR study y insecticidal activity against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). *Journal of Agriculture y Food Chemistry*, 58, 6290–6295
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* y Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 62, 775-806
- Sethuraman, A., Janzen, F. J., Weisrock, D. W., y Obrycki, J. J. (2020). Insights from Population Genomics to Enhance y Sustain Biological Control of Insect Pests. *Insects*, 22, 11(8):462.
- Storer, N. P., Babcock, J. M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G. D., Bing, J. W., y Huckaba, R. M. (2010). Discovery y characterization of field resistance to Bt maize *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103, 1031–1038
- Taylor P. (1996). Anticholinesterase agents. En: *Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB*, editors. *Goodmann y Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics*, 9ª edición. New York: Macmillan 161-176.
- Tiewisiri K., y Angsuthanasombat C. (2007) Structurally conserved aromaticity of Tyr249 y Phe264 in helix 7 is important for toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Journal of Biochemical Molecular Biology*, 40,163-171
- Vachon V., Laprade R., y Schwartz J.L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15 (111),1-12.
- Wu, Y., Han, L., Wu, X., Jiang, W., Liao, H., Xu, Z., y Pan, C. (2022). Trends y perspectives on general Pesticide analytical chemistry. *Advanced Agrochemistry*, 1, 113–124.

- Yainna, S., Nègre, N., Silvie, P. J., Brévault, T., Tay, W. T., Gordon, K... y Nam, K. (2021). Geographic Monitoring of Insecticide Resistance Mutations in Native y Invasive Populations of the Fall Armyworm, *Scientific Reports*, 12, 468.
- Zhang, L., Liu, B., Zheng, W., Liu, C., Zhang, D., Zhao, S... y Xiao, Y. (2020). Genetic structure y insecticide resistance characteristics of fall armyworm populations invading China. *Molecular Ecology Resources*, 20, 1682–1696.
- Zener de Polania I., Arévalo, H.A., y Mejía, A. (2007). El gusano cogollero de maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1, 103-113.
- Zener de Polania I., Alvarez –Rodríguez, J.A., Arévalo-Maldonado, H. A., Mejía-Cruz, R., y Bayona, M. A. (2008). Susceptibilidad de cuatro noctuidos plaga (Lepidoptera) al gene Cry1Ac del *Bacillus thuringiensis* incorporado al algodón. *Revista Colombiana de Entomología*, 34, 41-50

CAPÍTULO 7. ANÁLISIS DE LAS RELACIONES EVOLUTIVAS DE LOS TRIPS DEL AGUACATE

Autores: Daniela Cano-Calle¹, Claudia Ximena Moreno Herrera², Rafael Eduardo Arango Isaaza³ y Clara Inés Saldamando Benjumea⁴

1. Posdoctora. Biotecnología Vegetal Grupo UNALMED-CIB, Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos 16-223, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, dacanoca@unal.edu.co (<https://orcid.org/0000-0002-6399-0190>)
2. Profesora Titular. Grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, cxmoreno@unal.edu.co (<https://orcid.org/0000-0002-8132-5223>)
3. Profesor Asociado. Biotecnología Vegetal Grupo UNALMED-CIB, Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos 16-223, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, rearango@unal.edu.co (<https://orcid.org/0000-0001-9368-8200>)
4. Profesora Titular. Biotecnología Vegetal Grupo UNALMED-CIB, Laboratorio de Ecología y Evolución de Insectos 16-223, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín 050034, Colombia, cisaldam@unal.edu.co(<https://orcid.org/0000-0001-9368-8200>)

7.1 Trips del aguacate introducción general

Los trips son insectos muy pequeños, con un ciclo de vida corto, que evolucionan rápidamente resistencia a insecticidas y presentan una fácil dispersión (dada por el viento o plantas infectadas) (Brunner *et al.*, 2002; Monje *et al.*, 2012; Moudén *et al.*, 2017). Estos insectos, pertenecen al orden Thysanoptera que se divide en dos subórdenes: Terebrantia y Tubulifera (Morse y Hoddle, 2006). Tenebrantia es el suborden más reconocido puesto que más del 95% de sus especies son plagas de diversos cultivos de plantas, mientras que aproximadamente el 60% de las especies de Tubulifera son frugívoros (Mound, 2005).

Estos insectos, se caracterizan porque dañan las plantas al insertar su aparato bucal en forma de aguja en las hojas y las flores para retirar los fluidos de la planta. Ellos, tienden a alimentarse de las células mesófilas y epidérmicas de tejidos de las hojas utilizó un único estilete en la boca para perforar las células, y luego insertar un conjunto de estiletos emparejados, los cuales laceran y dañan el tejido de una planta, principalmente sus hojas (Cloyd, 2010). Las plantas ornamentales como las flores, y ciertos cultivos de hortalizas, son más susceptibles a las lesiones graves de la alimentación de los trips y los virus que estos transmiten, especialmente cuando las plantas son jóvenes (Bethke *et al.*, 2014). La alimentación de los trips puede retrasar el crecimiento de las plantas ya que pueden distorsionar sus hojas con su aparato bucal, además, en estas desarrollan un tipo de manchas con apariencia punteada, aunque también puede producirse un tipo de agalla. Si la infestación se presenta en el área terminal de la hoja, podría exhibir una decoloración y el enrollamiento de la misma. Por otro lado, cuando la infestación se presenta en las flores, en los pétalos se pueden observar decoloración por zonas, así como también un tipo de manchas oscuras producto de la fenolización del tejido y de la alimentación de los trips (Bethke *et al.*, 2014; Cloyd y Sadof, 2011). Varias de sus especies, se han reconocido por ser vectores de tospovirus, no obstante, las especies de trips que atacan el cultivo de aguacate no transmiten esta enfermedad (Camberro -Cabrera *et al.*, 2021).

En Colombia, especialmente en el departamento de Antioquia, el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill), ha presentado un incremento en su producción nacional de 19,96 toneladas y con un rendimiento de 11,60 Ton/ha a nivel nacional (Ministerio de Agricultura, 2018). Esto se debe a que esta zona de Colombia presenta características del suelo y clima óptimas para su producción (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2019). Dado el aumento progresivo de su producción y su exportación, se requiere un mejoramiento en la calidad de su fruto y la reducción en el uso de agroquímicos. No obstante, esta fruta es afectada por diversos problemas de tipo fitosanitario entre los que se encuentran el patógeno *Phytophthora cinnamomi* (Zapata y Leal 2018), y los trips como insectos plaga (Thysanoptera, Thripidae) (Cambero-Campos

et al., 2010). A pesar de la importancia de la identificación morfológica y molecular de los trips, en nuestro país, no hay muchos estudios que describan las especies de trips que afectan al cultivo de aguacate. Sin embargo, existe un estudio realizado en 2004, que se basó en la caracterización morfológica de adultos de trips recolectados de hojas y flores de aguacate en los departamentos de Caldas y Risaralda (Centro de Colombia). Este trabajo, permitió la identificación de las especies fitófagas: *Selenothrips rubrocinctus* Giard y *Frankliniella gardeniae* Moulton, e individuos del género *Leptothrips* sp. y *Karnyothrips* sp. con hábitos de depredadores (Echeverri-Florez *et al.*, 2004).

En el cultivo de aguacate, los trips representan unas plagas invasoras de gran importancia económica ya que afectan su fruto al producir cicatrices en su superficie, lo cual hace que el fruto sea rechazado en su proceso de exportación (Cambero-Campos *et al.*, 2011). Otra característica de estos insectos, es su difícil control, su distribución es cosmopolita, su alta tasa reproductiva, su carácter polífago e invasivo (en campo e invernadero), además presentan un bajo número de enemigos naturales (Brunner *et al.*, 2002; Monje *et al.*, 2012; Moudén *et al.*, 2017). Por todas estas razones, muchas de sus especies son consideradas cuarentenarias en diversos países. Además, el uso excesivo de insecticidas ha producido un problema de resistencia en estos insectos, y problemas residuales generados por los insecticidas (Moudén *et al.*, 2017).

Existen una gran cantidad de especies de trips en una diversidad alta de cultivos, no obstante, su tamaño pequeño dificulta su correcta identificación basada en caracteres morfológicos (Mound, 2013). Usualmente los trips tienen una longitud 1 mm de largo, tienen cuerpos alargados, que a menudo se aplanan de manera leve a fuerte dorsoventralmente. Además, sus antenas tienen 4 a 9 segmentos, la mandíbula derecha es vestigial y la mandíbula izquierda está desarrollada. A su vez, presentan dos pares de alas alargadas que están bordeadas de cilios largos y su abdomen es de 10 segmentos (Nakahara, 1991). Una alternativa al uso de estos caracteres morfológicos, radica en el uso de marcadores moleculares, puesto que pueden ser empleados en conjunto con la morfología para mejorar la identificación taxonómica de los trips y el mejoramiento de sus análisis filogenéticos (Brunner *et al.*, 2004; Buckman *et al.*, 2013; Iftikhar *et al.*, 2016). Varios marcadores moleculares han sido utilizados para la identificación molecular de los trips dentro de los que se encuentran la secuenciación del gen del citocromo oxidasa I y la región intergénica *ITS* (Asokan *et al.*, 2007; Buckman *et al.*, 2013; Iftikhar *et al.*, 2016; Tyagi *et al.*, 2017). Un trabajo reciente, realizado en México, se basó en la identificación molecular de los géneros *Neohydatothrips*, *Scirtothrips*, *Frankliniella*, *Aorathrips*, *Caliothrips* y *Leptothrips* utilizó 44 muestras de estos insectos, colectados en cultivos de aguacate, para el análisis molecular se realizó la secuenciación del gen mitocondrial

COI (unidad de citocromo oxidasa I) demostró la utilidad de este marcador para identificar las especies de estos géneros (Bravo-Pérez *et al.*, 2018).

En nuestro país, el cultivo de aguacate ha forjado una nueva alternativa de producción agrícola, particularmente en el departamento de Antioquia, donde el aguacate Hass ha incrementado su producción enormemente ya que después de la realización de estudios de la genética de poblaciones de este cultivo, se estableció la facilidad de injertación de esta variedad con los cultivos criollos de este fruto dada su cercanía genética (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2019). Puesto que este cultivo genera buenos ingresos y los trips representan unas de las plagas que más afectan la calidad de sus frutos, el propósito de la investigación realizada por Daniela Cano Calle, en su tesis de doctorado, fue identificar las especies de trips que atacan a este cultivo con el uso de marcadores moleculares y morfológicos. Para ello, se tomaron 93 muestras, se identificaron taxonómicamente por caracteres morfológicos y se analizaron por amplificación por PCR y secuenciación del gen del citocromo oxidasa I (*COI*) y la región interna transcrita (*ITS*) de cada muestra. Los resultados obtenidos en este trabajo son útiles ya que ampliaron la información sobre las especies de trips que afectan al aguacate ya que de esta manera se establece el tipo de manejo que debe emplearse para cada una de ellas, este estudio origina el artículo publicado por Cano-Calle *et al.* (2021) y uno de los capítulos de la tesis de doctorado en Biotecnología de Daniela Cano Calle y establece la base del presente capítulo.

7.2 Análisis filogenético de las especies de trips del aguacate

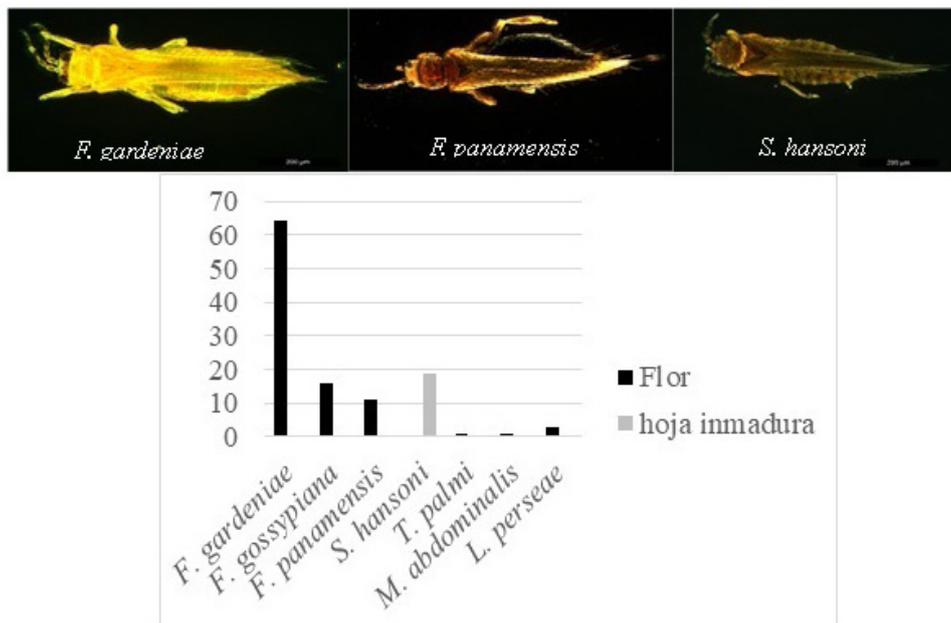
Como se mencionó anteriormente, dado que los trips son insectos de un tamaño muy pequeño y la identificación de sus especies es complicada (Calle-Cano *et al.*, 2021). Daniela Cano, separó los especímenes colectados de acuerdo al patrón de color de su cuerpo, en morfos cafés, negros y amarillos y posteriormente envió 62 especímenes a ser clasificados por su taxonomía por un experto en el grupo. Adicionalmente, realizó estudios moleculares en 93 especímenes, utilizó una secuenciación del gen Citocromo Oxidasa I (*COI*) del ADN mitocondrial y secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (*ITS*).

Calle-Cano *et al.* (2021) realizaron colectas de adultos en siete fincas ubicadas en el en el norreste de Colombia en cultivos comerciales de aguacate durante 2016 y 2017, en los municipios de Amagá, Carmen de Viboral, La Ceja, Marinilla, El Retiro, Rio Negro y San Vicente. Estos insectos fueron colectados golpeó la vegetación en una tabla blanca. Los insectos en estado adultos fueron aspirados y depositados a un tubo Falcon con etanol al 96%. La extracción de

ADN se baso en el protocolo de (Rugman-Jones *et al.*, 2006), con modificaciones. Respecto a la amplificación parcial del gen del citocromo oxidasa I, se emplearon los cebadores LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGAC-CAAAAAATCA-3 ') que produjo un amplicon de 600 pb (Folmer *et al.*, 1994) y respecto a la amplificación de la región *ITS* de 1000 a 1200 pb se realizó con los cebadores 18SMP / 28SMP: 5'-TGAACCTGCGGAAGGAT-3 ', 5'-TCTCACCTBAACTGAGG-3 ') (de Grazia *et al.*, 2016). Las secuencias obtenidas de los 93 especímenes escogidos fueron comparados con las bases de datos del GenBank y BOLD utilizó "BLASTn" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) y <http://www.barcodinglife.org> respectivamente. Posteriormente, se realizaron análisis de filogeografía para obtener redes haplotípicas y filogenias bayesianas para los dos genes analizados. Adicionalmente, se realizaron análisis de genética de poblaciones, con un análisis de la genética molecular (AMOVA) entre las muestras de *F. gossypiana* y *F. gardeniae* dada su similitud morfológica.

En uno de los resultados más interesantes de su trabajo, Cano-Calle *et al.* (2021) encontraron que las especies de trips más abundantes del cultivo de aguacate fueron *F. gardenieae*, *F. panamensis* y *S. hansonii* y que las tres se muestrearon en diferentes partes del árbol del aguacate, puesto que las dos primeras especies se colectaron fácilmente de las hojas y la ultima de los frutos del cultivo (figura 7.1). Por lo que por competencia interespecífica se ubicaron en diferentes órganos del hospedero.

Figura 7.1 Especies de trips encontradas en árboles de aguacate antioqueño y su distribución por órgano de la planta (Tomado de la tesis de Doctorado de Daniela Cano).



Por otro lado, la filogenia obtenida por Cano -Calle *et al.* (2021) con el gen *COI* (figura 7.2a), mostró que el clado de *Frankliniella* agrupó a todas las especies encontradas para este género. Además, este género presenta una gran cercanía filogenética con *Microcephalothrips*, compuesto únicamente la especie *M. abdominalis*. El género *Thrips*, por su lado, se encuentra estrechamente relacionado con los dos géneros mencionados y estuvo compuesto por las especies: *T. trehernei*, *T. palmi* y *T. simplex*. El género *Scirtothrips* se agrupó separadamente de los otros tres géneros en un grupo compuesto por *S. hansonii*, *S. perseae* y *S. dorsalis*. Adicionalmente, la filogenia obtenida con la región *ITS* (figura 7.2b) también mostró un distanciamiento genético entre el género *Scirtothrips* y los géneros *Frankliniella* y *Thrips*, la agrupación cercana entre estos dos géneros y la dificultad del establecimiento de un ancestro común sugiere que la relación filogenética entre estos grupos no está clara ya que se necesitan más secuencias para realizarla.

Según Cano-Calle *et al.* (2021), los marcadores moleculares empleados por ellos fueron adecuados para la identificación de especies de trips, pero no fueron los mejores marcadores para identificar las especies de *F. gardeniae* y *F. gossypiana* puesto que a nivel morfológico se pudo evidenciar que son dos especies, pero a nivel molecular no se lograron diferenciar genéticamente.

Posterior al análisis filogenético, Cano- Calle *et al.* (2021) obtuvieron redes haplotípicas para cada gen analizado. Estas redes también separaron los haplotipos de las especies de trips evaluadas en los tres géneros principales encontrados (figura 7.3 a, b). En la red de haplotipos del gen *COI*, se puede observar que los haplotipos más abundantes están compuestos por la especie *F. gardeniae* y a su vez, es notorio que existen diferencias genéticas entre *F. gardeniae* de Colombia y México, puesto que se encuentran distanciados. H11 fue el haplotipo más abundante y agrupó a las especies *F. gardeniae* y *F. gossypiana* colectadas en Antioquia (Colombia), lo que sugiere que no hay diferenciación genética entre ellos. El género *Scirtothrips* no se agrupó cercanamente con el género *Frankliniella* y se ubicó más cerca de *L. perseae*. La red de haplotipos obtenida para el gen *ITS* mostró casi las mismas relaciones genéticas entre los géneros mencionados de los trips estudiados por estos autores. Sin embargo, esta red incluyó menos secuencias, por lo que es menos informativa.

7.3 Análisis de la genética de poblaciones de dos especies del género *Frankliniella*

Finalmente, los resultados de AMOVA obtenidos entre *F. gardeniae* y *F. gossypiana* mostraron un valor F_{ST} que no fue significativo (Tabla 7.1), lo cual sugiere que no hay diferenciación

genética entre estas dos especies a nivel del gen *COI*, por lo que ambos constituyen una misma especie según este análisis.

Los resultados de Cano -Calle *et al.* (2021) indican que, aunque los trips son plagas importantes en el cultivo de aguacate, la información sobre la diversidad de las especies en este cultivo es escasa en Colombia, por lo que su trabajo amplió la información sobre las especies de trips asociadas a este cultivo, especialmente en el departamento de Antioquia. Estas especies fueron: *Frankliniella gardeniae*, *F. gossypiana*, *F. panamensis*, *Thrips trehernei*, *T. simplex*, *T. palmi*, *Microcephalothrips abdominalis*, *Scirtothrips hansonii* y *Liothrips perseae* (Tubulifera). Las especies *M. abdominalis*, *S. hansonii* y *F. panamensis* nunca se habían reportado en aguacate antes de este estudio, según nuestro conocimiento. Además, estos resultados muestran que *Frankliniella gardeniae* es la especie de trips más abundante que se encuentra en el aguacate en todos los sitios de muestreo.

Tabla 7.1. AMOVA. Resultados de AMOVA obtenidos de comparaciones genéticas entre individuos de las especies *F. gardeniae* y *F. gossypiana* recolectadas de aguacate (Tomado de la tesis de Doctorado de Daniela Cano).

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de varianza	F _{ST}	P
Entre	1	18.70	0.1280 Va	7.6%	0.00756	0.308
Dentro	69	1130.88	16.39 Vb	99.24%		
Total	70	1149.60				

Cano -Calle *et al.* (2021) adicionalmente encontraron que la predominancia de tres especies de trips en diferentes órganos del aguacate es muy notoria puesto que *F. gardeniae*, *F. gossypiana* y *F. panamensis* están asociados a las flores del aguacate. Mientras que, *S. hansonii* se encontró principalmente en hojas jóvenes. Mound y Teulon (1995) describieron que el género *Frankliniella* se encuentra principalmente en flores y hojas, pero *Scirtothrips* está presente solo en hojas jóvenes. Otro aspecto importante de sus hallazgos radica en que las especies encontradas en el diente de león fueron: *Thrips trehernei* y *T. simplex*, esta planta también fue muestreada puesto que se pensó que compartían las mismas especies de trips con el cultivo de aguacate, pero resultó que no son su reservorio ecológico.

Las filogenias obtenidas con los genes *COI* e *ITS* mostraron que los géneros *Frankliniella*, *Microcephalothrips* y *Thrips* se encuentran *más cercanos genéticamente*, mientras que

Scirtothrips está separado de estos tres géneros. La topología de la filogenia obtenida en este estudio para el gen *COI* coincidió con los resultados de Iftikhar *et al.* (2016) y Liu *et al.* (2017) (figura 5.2, 5.3). Estos autores, demostraron que los géneros *Scirtothrips* y *Thrips* están estrechamente relacionados y comparten un ancestro común a *Frankliniella*, al igual que en este estudio el género *Scirtothrips* y *Thrips* estaban más estrechamente relacionados, mientras que *Frankliniella* y *Microcephalothrips* se encuentran más alejados. Del mismo modo, Rebijith *et al.* (2014) también encontraron la misma topología. Los valores estimados de probabilidad y nuestros valores de bootstrap sugieren que se necesitan más secuencias para mejorar la robustez del árbol. Sin embargo, la concordancia con estudios anteriores demuestra la fuerza de la filogenia. Además, estos resultados sugieren que se requieren más especies para mejorar filogenia. Una filogenia más reciente obtenida por Bravo-Pérez *et al.* (2018) de México se basó en la secuenciación del gen *COI*. Esta investigación mostró que seis especies del género *Frankliniella* fueron identificadas en este cultivo, incluyendo: *F. borinquen*, *F. brunnea*, *F. rostrata* y *F. insularis*, además, encontraron que los especímenes de *F. occidentalis* también podrían constituir un grupo de especies crípticas.

Adicionalmente, se encontró agrupamiento dentro del mismo grupo entre las especies *Frankliniella gardeniae* y *F. gossypiana* con el marcador molecular *COI*, lo que sugiere la posible existencia de especies crípticas en el aguacate, ya que difieren en la morfología, pero no difieren en su genética. Además, es la primera vez que la información sobre la variación genética de estas especies se registra a nivel genético. Cano-Calle *et al.*, (2021) argumentan que, *F. gardeniae* de Colombia está genéticamente distante de la misma especie de México, ya que, el haplotipo de México se encuentra muy alejado de los haplotipos de Colombia. Además es importante mencionar que, la red de haplotipos del gen *COI* agrupo secuencias de *F. gardeniae* y *F. gossypiana*, lo que sugiere que son la misma unidad genética. Adicionalmente, los resultados de las redes de haplotipos *COI* e *ITS* también sugieren que los tres géneros estudiados aquí: *Frankliniella*, *Thrips* y *Scirtothrips* son genéticamente diferentes (figura 7.4). Sin embargo, se necesitan incluir más secuencias para el gen *ITS*. En general los autores indican que sus resultados sugieren que: a) se requieren más secuencias de *F. gossypiana* para mejorar su relación filogenética con *F. gardeniae*, b) las diferencias morfológicas entre *F. gossypiana* y *F. gardeniae* no están muy bien definidas, c) se deberían incluir más loci para diferenciar estas dos especies (Meyer y Paulay, 2005) y d) se debería estudiar el aislamiento reproductivo entre estas dos especies en condiciones de laboratorio para establecer si son especies verdaderas.

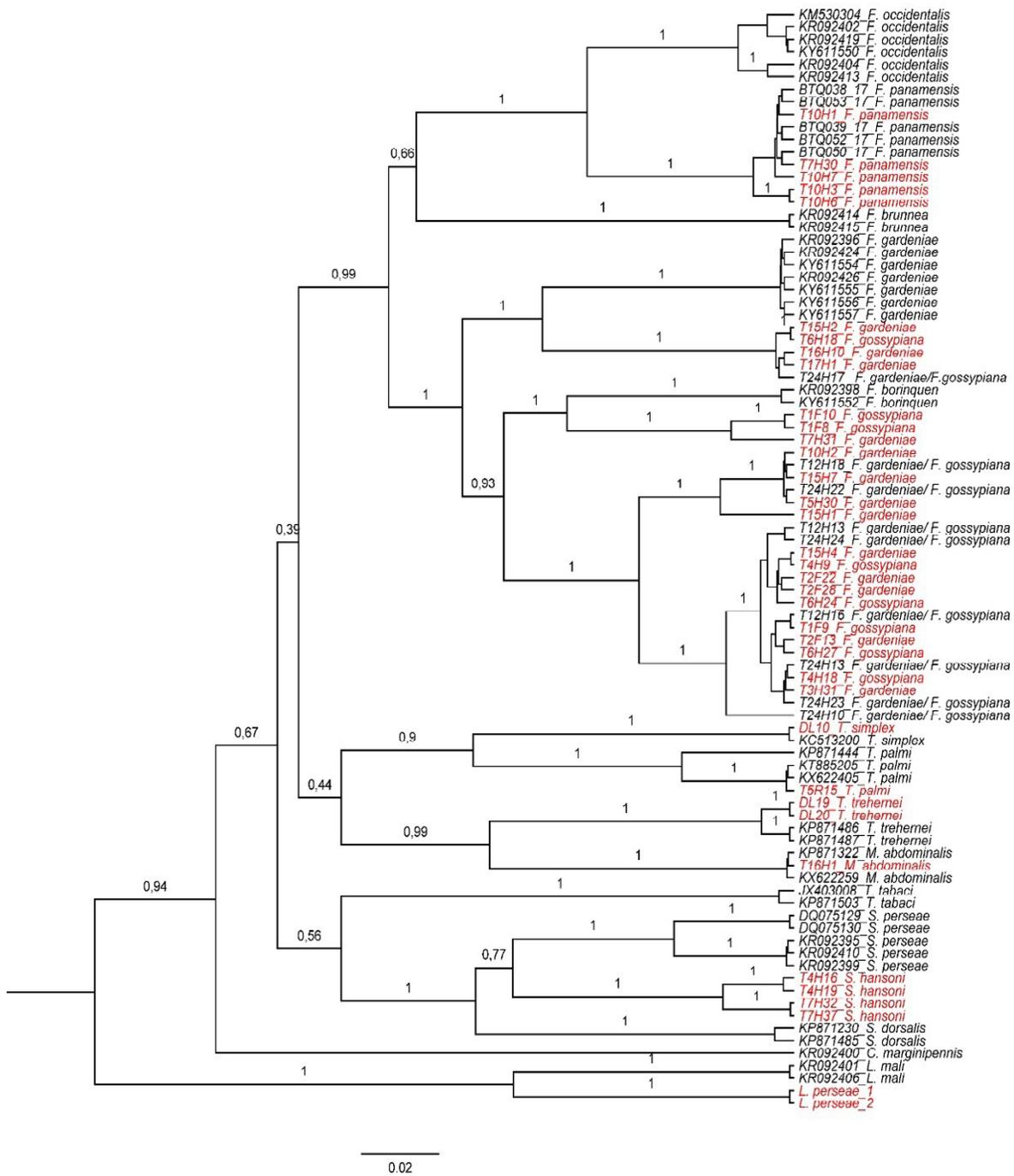
Finalmente, sus resultados AMOVA tampoco mostraron diferenciación genética entre *F. gardeniae* y *F. gossypiana* con un $F_{ST} = 0.0076$, $p > 0.05$. Todos estos resultados sugieren que, a nivel

del gen *COI*, estas dos especies representan la misma unidad genética, a pesar de que difieren ligeramente a nivel morfológico esto corrobora los resultados obtenidos en nuestra filogenia. Brunner *et al.* (2004) realizaron un análisis similar entre las 10 especies que estudiaron, encontraron un F_{ST} alto = 0.9713 entre *Thrips angusticeps* y *T. tabaci* y valores bajos de F_{ST} de 0.16 entre *Echinothrips americanus* y *T. palmi*. Brunner *et al.* (2004) encontraron una diferenciación de población significativa entre las 10 especies involucradas, lo que sugiere que este gen identificó con éxito especies de trips de diferentes orígenes geográficos (Inglaterra, América del Norte, Israel, entre otros). Estudios genéticos de población realizados con *Thrips tabaci*, una especie de trips considerada una plaga relevante en la cebolla de Australia, Westmore *et al.* (2013) mostraron que la especie divergió en diferentes biotipos de acuerdo con las diferencias genéticas del gen *COI* (secuencias) encontradas en sitios de muestreo de trips. Estos dos biotipos se encontraron principalmente asociados a la cebolla (no transmite virus) y al tabaco (transmite virus) y solo difieren en 6 posiciones de nucleótidos. Por el contrario, *F. gardeniae* y *F. gossypiana* difieren en 41 nucleótidos, lo que significa que *F. gossypiana* podría representar un biotipo o una subespecie de *F. gardeniae*. Sin embargo, según Hebert *et al.* (2003) si dos poblaciones difieren del 2% de las distancias de K2, representan diferentes especies, y los resultados obtenidos aquí para *F. gardeniae* y *F. gossypiana* mostraron $K2 = 6\%$ (resultados no mostrados en trabajo), lo que significa que estas dos especies de trips nominalmente deben diferenciarse con este gen de código de barras.

Cano -Calle *et al.*, (2021) también mencionan que la taxonomía clásica basada en caracteres morfológicos no siempre se puede emplear en todas las especies de trips en todas sus etapas de la vida, ya que la variación fenotípica puede ser insuficiente y puesto que representan especies crípticas (Brunner *et al.*, 2004; Rebijith *et al.*, 2014). La presencia de formas morfológicas inusuales en diferentes huéspedes, pequeño tamaño, coexistencia en el mismo huésped, ciclos de vida complejos, reproducción partenogenética, entre otros rasgos, disminuye la identificación precisa en este grupo (Iftikhar *et al.*, 2016; Rebijith *et al.*, 2014). Como alternativa, el concepto propuesto de códigos de barras de ADN resulta una herramienta poderosa para identificar todas las especies de metazoos que emplean un fragmento de 658 pb del extremo 5' del locus mitocondrial de *COI* (Hajibabaei *et al.*, 2007). Este código de barras de ADN se ha empleado para discriminar especies crípticas, biotipos, haplotipos, plagas asociadas al huésped. Por lo tanto, la secuenciación de este gen juega un papel importante para los programas integrados de manejo de plagas (Hajibabaei *et al.*, 2007; Iftikhar *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Rebijith *et al.*, 2014).

Figura 7.2 Filogenia bayesiana obtenida con a) *COI* y b) secuencias *ITS* de trips de aguacate. Las secuencias utilizadas como referencias están con sus códigos de acceso del GenBank y Bold, respectivamente. Las especies de trips encontradas en este trabajo fueron: *F. gardeniae*, *F. gossypiana*, *F. panamensis*, *T. palmi*, *T. simplex*, *T. trehernei*, *Microcephalotrips abdominalis* y *S. hansonii*. Outgroup = *L. perseae* para el árbol *COI* y *Leptothrips mali* para el árbol de *ITS* (Tomado de la tesis de Doctorado de Daniela Cano).

a)



b)

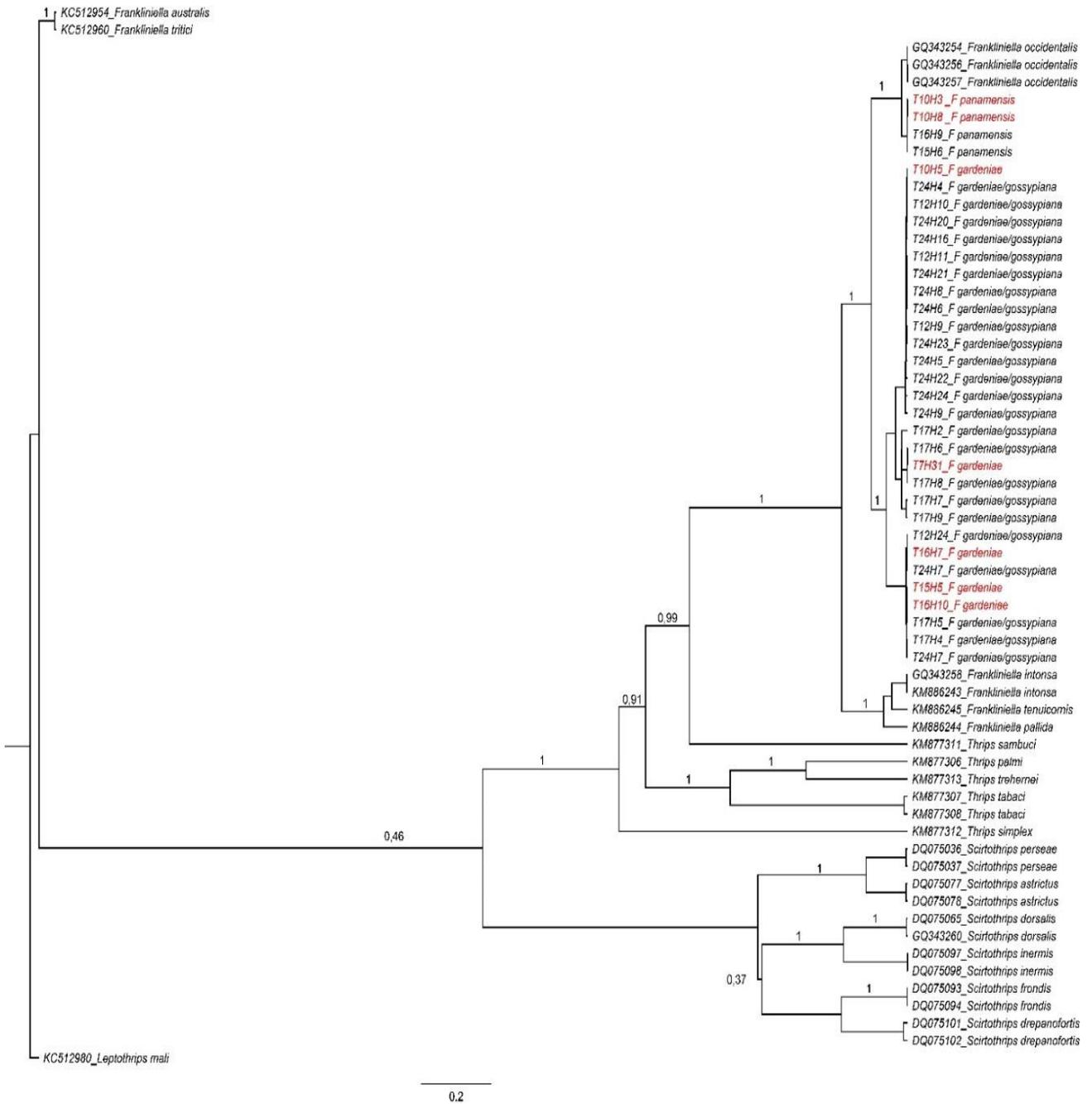
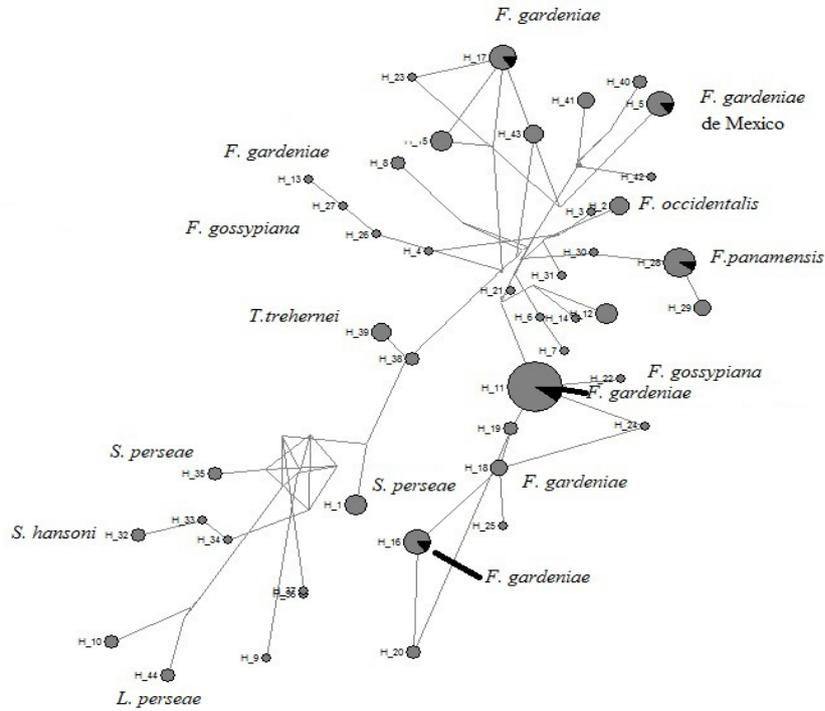
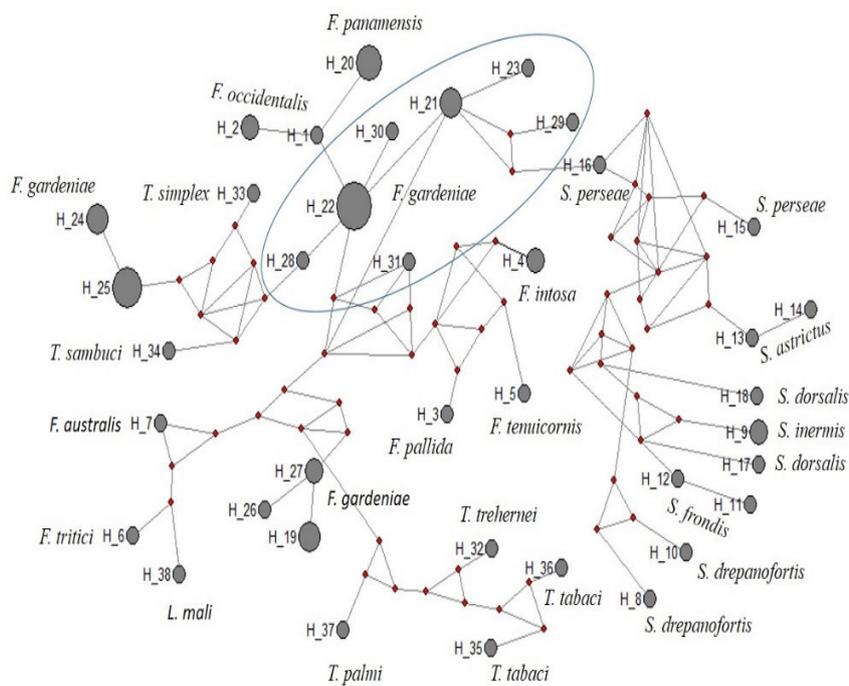


Figura 7.3 Red de haplotipos para especímenes de *Frankliniella gardeniae* y *F. gossypiana* (Thysanoptera: Thripidae) para los diecinueve haplotipos encontrados usando a) secuencias *COI* e *ITS*. En gris: *F. gardeniae*, en negro = *F. gossypiana*. Cada línea en la red representa un cambio mutacional único. (Tomado de la tesis de Doctorado de Daniela Cano).

a)



b)



7.4 Conclusiones generales de los trips del Aguacate

Los trips del aguacate son insectos pequeños, que son difíciles de capturar, de criar en condiciones de laboratorio y muy difíciles de clasificar taxonómicamente puesto que representan especies crípticas y por ello no solamente la morfología es útil para su identificación, sino también el uso de marcadores moleculares como la secuenciación del gen mitocondrial *COI* y la región *ITS* (Cano-Calle *et al.*, 2021). En el estudio de Cano-Calle *et al.* (2021) se demostró que el cultivo de aguacate colombiano se encuentra afectado por siete especies de trips de la familia Tenebrantia y de los géneros *Thrips* sp, *Microcephalothrips* sp. y *Scirtothrips* sp, siendo este último más alejado filogenéticamente. Otro aspecto importante que mostró este trabajo radica en que la taxonomía clásica que usa caracteres morfológicos no siempre se puede emplear en especies de trips en todas las etapas de la vida, ya que la variación fenotípica puede ser insuficiente (Brunner *et al.*, 2004; Rebijith *et al.*, 2014). Como alternativa, el concepto propuesto de códigos de barras de ADN resulta una herramienta poderosa para identificar las especies de trips del aguacate, ya que este código de barras de ADN se ha empleado para discriminar especies crípticas, biotipos, haplotipos, plagas asociadas al huésped. El uso de la secuenciación del gen mitocondrial *COI* produjo mejores resultados que la secuenciación de la región *ITS*, esto se debe a que el primero, permite esclarecer mejor la diferenciación genética entre las especies de trips analizadas en este estudio. No obstante, ninguno de estos genes logró esclarecer las relaciones filogenéticas entre las especies *F. gardeniae* y *F. gossypiana* ya que muy posiblemente su evolución es reciente.

Hasta el momento, no se han realizado estudios de genética molecular antes de este trabajo en Colombia. El código de barras de ADN se empleó en este estudio, ya que representa un método eficaz para la identificación a nivel de especie. Las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (*COI*, *cox1*) de una muestra desconocida se pueden comparar con el código de barras de referencia en bases de datos como GenBank y BOLD derivada de individuos con estatus taxonómico conocido (Hajibabaei *et al.*, 2007). Esto implica que con el uso de secuencias de genes como el caso del gen *COI*, se puede llegar a una identificación rápida y precisa de plagas invasoras, como los trips, lo cual es importante y desafiante, ya que estos insectos pueden causar daños directos a los cultivos y la transmisión de virus, por lo que en muchos cultivos su efecto es doble pues implica daño mecánico y transmisión de enfermedades (Rebijith *et al.*, 2014). Bravo-Pérez *et al.* (2018) usaron los mismos loci para identificar varias especies de trips en aguacate de México al usar solo 44 especímenes recolectados de frutas y hojas. Estos autores mencionaron que la identificación de especies fue muy clara en *Frankliniella borinquen*, *F. brunnea*, *F. rostrata* y *F. insularis*.

Inicialmente, en el estudio realizado por Cano-Calle *et al.* (2021) se realizó una caracterización morfológica y se logró identificar 9 especies de trips en 62/93 especímenes recolectados en aguacate y diente de león, dentro de los cultivos de aguacate se encontraron 7 especies de trips y 2 en diente de león. Estas especies fueron: *Frankliniella gardeniae*, *F. gossypiana*,

F. panamensis, *Thrips trehernei*, *T. simplex*, *T. palmi*, *Microcephalothrips abdominalis*, *Scirtothrips hansonii* y *Liothrips perseae* (Tubulifera). Las especies *M. abdominalis*, *S. hansonii* y *F. panamensis* se reportaron en este estudio con el uso de marcadores moleculares y morfológicos. Además, estos resultados muestran que *Frankliniella gardeniae* es la especie de trips más abundante que se encuentra en el aguacate en todos los sitios de muestreo.

Al determinar la presencia de las especies de trips en los cultivos de aguacate que fueron muestreados en el departamento de Antioquia, se analizó la abundancia de cada especie por órgano de la planta y se observó que *F. gardeniae*, *F. gossypiana* y *F. panamensis* estaban predominantemente asociadas a órganos florales, lo que sugiere que este género se alimenta principalmente de flores, mientras que *S. hansonii* se encontró principalmente en hojas jóvenes del cultivo de aguacate. Mound y Teulon (1995) describieron que el género *Frankliniella* se encuentra principalmente en flores y hojas, pero *Scirtothrips* está presente solo en hojas jóvenes. En otros estudios, se informa que algunas especies de trips prefieren diferentes órganos de plantas, por ejemplo, Marullo (2009), descubrió que *Heliothrips haemorrhoidalis* en cítricos Rutaceae y *Quercus fagaceae* prefieren las hojas en su mayoría hojas viejas. En un estudio previo en Colombia, una caracterización morfológica realizada por Echeverri Florez *et al.* (2004) permitió la identificación de las especies: *Selenothrips rubrocinctus* Giard, *Frankliniella gardeniae* Moulton y *Leptothrips* sp. y *Karnyothrip* sp con hábitos de depredadores en aguacate en los departamentos de Caldas y Risaralda. Estos investigadores también encontraron una predominancia de *F. gardeniae* con respecto a las demás especies mayormente en estructuras florales. En el estudio de Cano-Calle *et al.* (2021) no se encontró ninguna especie de trips potencialmente depredadora.

Es importante anotar que el trabajo de Cano-Calle *et al.* (2021) muestra por primera vez el reporte de la especie *Scirtothrips hansonii* en el cultivo de aguacate, lo cual es importante para el manejo del cultivo puesto que presenta un alto número de especies de trips que en posteriores investigaciones se comprobó que presentan diferentes especies de bacterias en su microbiota asociada, por ejemplo en el caso de *S. hansonii*, el endosimbionte *Wolbachia* sp. se encontró en un 90% de la microbiota de esta especie de trips.

Es importante tener en cuenta que hoy en día, el uso de la secuenciación de alto rendimiento, ha permitido realizar estudios de la filogenia de los trips con el uso de la información obtenida de sus genomas mitocondriales, ya que éstos presentan una gran cantidad de genes, entre los que se encuentran *NAD4*, *NAD5*, *COI*, *COII*, *CYTB*, *RNAr*, *RNAt* entre otros (Ramírez-Ríos *et al.*, 2016). Todos ellos permiten esclarecer mejor las relaciones filogenéticas de los trips, ya que muchas de sus especies difieren en el número y orden de los genes mitocondriales (Tyagi *et al.*, 2020). Dados los hallazgos encontrados con los análisis de mitogenomas, es importante realizar investigaciones futuras en las especies de trips del aguacate colombiano con el uso de esta tecnología ya que una correcta identificación de un insecto permite una mejora en su manejo.

7.5 Referencias

- Bravo-Pérez, D., Santillán-Galicia, M. T., Johansen-Naime, R. M., González-Hernández, H., Segura-León, O. L., Ochoa-Martínez, D. L., y Guzman-Valencia, S. (2018). Species diversity of thrips (Thysanoptera) in selected avocado orchards from México based on morphology y molecular data. *Journal of Integrative Agriculture*, 17, 2509–2517.
- Brunner P. C., Fleming G, C., Frey J. E. (2002). A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing y a PCRFLP-based approach. *Agricultural y Forest Entomology*, 4, 127-136.
- Brunner, P. C., Chatzivassiliou, E. K., Katis, N. I., y Frey, J. E. (2004). Host-associated genetic differentiation in Thrips tabaci (Insecta, Thysanoptera), as determined from mtADN sequence data. *Heredity*, 93, 364–370.
- Camberro-Campos J., Johansen-Naime, R, García-Martínez, O., Cantu-Sifuentes, M., Cerna-Chavez, E.; Renata-Salazar, A. (2011). Especies depredadoras de trips (Thysanoptera) asociadas a huertas de aguacate en Nayarit, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 27(1),115-121
- Cano-Calle D., Saldamando-Benjumea C.I., Moreno-Herrera C, Arango-Isaza, Rafael Eduardo. 2021. Morphological y molecular analysis of thrips (Thysanoptera: Thripidae) diversity on avocado y dyelion: New species records for Colombia and limitations for molecular differentiation of two species. *Revista Colombiana de Entomología*. 47, 1-13.
- Cañas-Gutiérrez, G. P., Alcaraz, L., Hormaza, J. I., Arango-Isaza, R. E., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2019). Diversity of avocado (*Persea americana* mill.) cultivars from antioquia (Northeast Colombia) y comparison with a worldwide germplasm collection. *Turkish Journal of Agriculture y Forestry*, 43, 437–449.
- Echeverri Florez, F. E., Loaiza Marín, C. E., y Cano Ortiz, M. del P. (2004). Reconocimiento e identificación de trips fitófagos (Thysanoptera: Thripidae) y depredadores (Thysanoptera: Phlaeothripidae) asociados a cultivos comerciales de aguacate *Persea* spp. en los departamentos de Caldas y Risaralda (Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 57(1), 2178–2189
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., y Hickey, D. A. (2007). ADN barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23, 167–172
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., y deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through ADN barcodes. *Proceeding of the Royal Society of Science*, 270, 313–321.
- Iftikhar, R., Ashfaq, M., Rasool, A., y Hebert, P. D. N. (2016). ADN Barcode Analysis of Thrips (Thysanoptera) Diversity in Pakistan Reveals Cryptic Species Complexes. *PLoS ONE*, 11(1), 1–21.
- Liu, H., Li, H., Song, F., Gu, W., Feng, J., Cai, W., y Shao, R. (2017). Novel insights into mitochondrial gene rearrangement in thrips (Insecta: Thysanoptera) from the grass thrips, *Anaphothrips obscurus*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–7.

- Marullo, R. (2009). Host-plant ranges y pest potential : habits of some thrips species in areas of southern Italy. *Bulletin of Insectology*, 62(2), 253–255
- Meyer, C. P., y Paulay, G. (2005). ADN barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), 1–10.
- Mound, L., y Teulon, D. (1995). Thysanoptera as Phytophagous Opportunist. *Thrips Biology y Management*, 276, 3–19.
- Mound, L. (2005). THYSANOPTERA : Diversity y Interactions. *Annual Review of Entomology*, 50, 247–269.
- Mound, L. A., Nielsen, M., y Hastings, A. (2017). Thysanoptera Aotearoa – Thrips of New Zealy. Retrieved March 3, 2020, from Lucidcentral.org, Identific Pty Ltd website:
- Mound, L., y Hoddle, M. (2016). The *Scirtothrips perseae* species-group (Thysanoptera), with one new species from avocado, *Persea americana*. *Zootaxa*, 4079(3), 388–392.
- Mound, L., y Marullo, R. (1996). The Thrips of Central y South America: AN INTRODUCTION (INSECTA: THYSANOPTERA). *Memoirs on Entomology, International*, 6, 1–488.
- Mound, L., y Teulon, D. (1995). Thysanoptera as Phytophagous Opportunist. *Thrips Biology y Management*, 276, 3–19.
- Mound, Laurence A. (2013). Homologies y Host-Plant Specificity : Recurrent Problems in the Study of Thrips. *Florida Entomologist*, 96(2), 318–322.
- Nakahara, S. (1991). *Systematics of Thysanoptera, Pear thrips y other economic species*. In B. Parker, M. Skinner, Lewis, y Trevor (Eds.), *Towards Understying Thysanoptera* (pp. 41–59). U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station
- Rebijith, K. B., Asokan, R., Krishna, V., Ranjitha, H. H., Krishna Kumar, N. K., y Ramamurthy, V. V. (2014). ADN Barcoding y Elucidation of Cryptic Diversity in Thrips (Thysanoptera). *Florida Entomologist*, 97, 1328–1347.
- Ramírez-Ríos, V., Franco-Sierra, N. D., Álvarez, J. C., Saldamando-Benjumea, C. I., y Villanuev-Mejía, D. F. (2016). Mitochondrial genome characterization of *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) y its phylogenetic relationship with other lepidopteran insects. *Gene*, 581, 107–116.
- Rugman-Jones, P., Hoddle, M., Mound, L., y Stouthamer, R. 2006. Molecular Identification Key for Pest Species of *Scirtothrips* (Thysanoptera : Thripidae) Molecular Identification Key for Pest Species of *Scirtothrips* (Thysanoptera : Thripidae). *Molecular Entomology*, 99, 1813–1819.
- Tyagi, K., Kumar, V., y Mound, L. A. (2008). Sexual dimorphism among Thysanoptera Terebrantia , with a new species from Malaysia y remarkable species from India in Aeolothripidae y Thripidae. *Insect Systematics y Evolution*, 39, 155–170.
- Westmore, G., Poke, F., Allen, G., y Wilson, C. 2013. Genetic y host-associated differentiation within Thrips tabaci Lindeman (Thysanoptera:Thripidae) y its links to Tomato spotted wilt virus-vector competence. *Heredity*, 111, 210–215.

Capítulo 8. Conclusiones finales y recomendaciones

A lo largo de este libro se mostraron los diferentes trabajos realizados en Colombia sobre la micro y macro evolución de plagas de importancia económica. El libro ha demostrado que una especie modelo como *S. frugiperda* ha sido muy útil para realizar diversas investigaciones puesto que la especie ha sido ampliamente estudiado en todo el mundo. Las primeras investigaciones sobre los biotipos de esta polilla se originan desde el año 1986 cuyo Pashley Prowell analiza el comportamiento de alimentación de poblaciones de este insecto colectadas en cultivos de maíz y arroz de Louisiana, notó que muestran preferencia por estos dos hospederos y a su vez una diferenciación genética entre sus poblaciones con el uso de aloenzimas. Posterior a ello, en 2004 se realizaron análisis con marcadores AFLP y genes mitocondriales como *NAD4*, *COI*, entre otros que marcaron las diferencias poblacionales de este insecto en los Estados Unidos. Estos trabajos fueron la base de investigación realizada en Colombia, desde la publicación de Vélez-Arango *et al.* (2008) en la que usaron marcadores diagnósticos del gen *COI* y gen *FR* para identificar los biotipos en Tolima y posterior en Colombia en un trabajo producido por Cano-Calle *et al.* (2015). Hoy en día los métodos de secuenciación, particularmente del gen *TPI* y la secuenciación de todo el mitogenoma y genoma del insecto proveen mejor información al investigador para la identificación molecular de los biotipos de *S. frugiperda* (Nagoshi *et al.*, 2020; Yainna *et al.*, 2022).

Los trabajos con marcadores moleculares en *S. frugiperda* realizados en el grupo de investigación de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB mostraron que el biotipo de maíz esta asociado a cultivos de maíz, algodón, sorgo y caña de azúcar y el biotipo de arroz a cultivos arroz y pastos principalmente. No obstante, la asociación no es exclusiva ya que hay especímenes del biotipo de maíz en arroz y del biotipo de arroz en maíz, y por ello se identificaron poblaciones híbridas entre ellos (Vélez-Arango *et al.*, 2008; Cano-Calle *et al.*, 2015). Estos resultados fueron las primeras publicaciones realizadas en el insecto, en nuestro país que se basaron en el uso de la teoría de especiación y biología evolutiva para explicar que este insecto pudo haber evolucionado sus barreras de aislamiento reproductivo en simpatria ya que no se encontró que existieran barreras geográficas que influyeran en su diferenciación (Saldamando, 2016).

Puesto que se encontró un bajo número de híbridos entre los biotipos, una siguiente pregunta de investigación en *S. frugiperda* era establecer si sus biotipos presentan aislamiento reproductivo y los trabajos realizados por Velásquez-Vélez *et al.* (2011), Saldamando *et al.*, (2014) y Cañas-Hoyos *et al.* (2017) demostraron que si existe aislamiento postcigótico dado que los híbridos de las generaciones F1 y F2 mostraron una reducción en el fitness en cuanto su longevidad, viabilidad y éxito reproductivo con sus poblaciones parentales. Además, la propensión de apareamiento es 3 veces mayor en machos del biotipo de maíz respecto al biotipo de arroz puesto que las hembras del biotipo de maíz mostraron preferencias de apareamiento con machos de su mismo biotipo. Finalmente, este apareamiento se debe a las diferencias en la composición de componentes volátiles que emiten las hembras de estos biotipos ya que presentan

compuestos en común, pero también compuestos exclusivos para cada biotipo. El hallazgo de individuos con baja fertilidad en las poblaciones híbridas entre los biotipos de *S. frugiperda* puede ser útil para la mejora del manejo del insecto, si las hembras híbridas son liberadas en el campo, ya que, si se aparean con machos de *S. frugiperda* encontrados en la naturaleza, el fitness de sus generaciones sería bajo por lo que su adaptabilidad sería baja y su posibilidad de sobrevivir cada vez menor.

Por otro lado, los estudios de Cañas Hoyos *et al.* (2017) mostraron evidencia que demuestra que los compuestos volátiles pueden ser empleados para la elaboración de trampas de feromonas que atraigan a los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* diferencialmente de poblaciones naturales, al emplear los compuestos propios para cada biotipo y ubicar dichas trampas en diferentes cultivos, por ejemplo la trampa de feromona para los machos del biotipo de maíz en cultivos de maíz, algodón, sorgo y caña de azúcar y la trampa para los machos del biotipo de arroz, en cultivos de arroz y pastos. El uso de trampas puede ser usado para la mejora del MIP de la especie puesto que el método de monitoreo usado hoy en día en la especie no tiene en cuenta la existencia de los biotipos, y a su vez para reducir poblaciones de machos que se encuentren en la naturaleza dependiendo del biotipo al que pertenecen. Es más, dichas trampas podrían ser ubicadas en otros cultivos o en bosques cercanos a cultivos de maíz y arroz para atrapar machos de la especie y posteriormente identificar los biotipos con el uso de herramientas moleculares, hasta el momento no se conoce los otros hospederos de los biotipos del insecto y esta información urge para el manejo de sus poblaciones.

Respecto a la morfometría geométrica, se demostró que es una herramienta útil para la diferenciación de poblaciones de adultos de los biotipos de *S. frugiperda*, por lo que también podría ser empleada en el MIP de la especie ya que solo requiere fotografías de las alas y el uso de estereomicroscopios para analizar la forma y el tamaño del ala del insecto con el uso de análisis multivariados (Cañas-Hoyos *et al.*, 2014; Cañas-Hoyos *et al.*, 2016).

Adicionalmente, los estudios comparativos de la respuesta de tolerancia de los biotipos de maíz y arroz frente a insecticidas y endotoxinas del *B. thuringiensis* demostraron que cada biotipo responde de manera diferente a ambos según los resultados de Ríos-Díez y Saldamando (2011) Ríos-Díez *et al.* (2012). Esto sugiere que el insecto puede evolucionar rápidamente respuesta de resistencia al Bt en cultivos de maíz y algodón transgénico por lo que las poblaciones del biotipo de maíz son más propensas al respecto y a su vez las poblaciones del biotipo de arroz a los insecticidas.

Actualmente hay una investigación relacionada con la microbiota intestinal asociada a los biotipos de *S. frugiperda* en la que se evalúa la microbiota intestinal presente bajo la presión selectiva del *B. thuringiensis* y de insecticidas y la evaluación de los aislados bacterianos ante insecticidas como alternativas de manejo del insecto. El empleo de endosimbiontes como es

el caso de *Wolbachia* sp, *Arsenophonus* sp, entre otros, junto con la manipulación de la microbiota intestinal podrían ser nuevas alternativas promisorias para el manejo de este insecto en la naturaleza (Paddock *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). Esto dado que se ha demostrado que la microbiota puede estar relacionada con la mortalidad de larvas de lepidóptera en presencia de endotoxinas del *B. thuringiensis* (Li *et al.*, 2021).

Por otro lado, para la realización de estudios en genética de poblaciones y de la filogeografía de una especie, el uso de los marcadores moleculares empleados por Vélez -Arango *et al.* (2008) y Cano -Calle *et al.* (2015) fueron útiles para la identificación de los biotipos pero es importante tener en cuenta que el análisis de una secuencia de ADN genera aun más información genética de una plaga puesto que más estimadores de la diversidad son generados, como se observó en el trabajo de Salinas-Hernández y Saldamando (2011) con *S. frugiperda* y el trabajo de Villanueva -Mejía *et al.* (2015 a) con *T. solanivora*, entre ellos la diversidad nucleotídica, polimorfismo nucleotídico, sitios segregantes, número de haplotipos y lo más importante permite el uso de la teoría de coalescencia para llevar a cabo análisis de cambios demográficos de las poblaciones, al estimar el tamaño efectivo de una población (N_e) y el test de neutralidad de Tajima (Nei y Kummar, 2000).

Un aspecto importante que se debe tener en cuenta es el uso de las nuevas tecnologías de secuenciación del ADN y ARN como lo es la secuenciación de nueva generación, la cual permite obtener la información total de un genoma puesto que se obtiene la información de todos los genes que se encuentran dispersos en un genoma y a partir de la misma evaluar todos los genes relacionados con la genética de las poblaciones de una especie, los genes que confieren resistencia a insecticidas o controles biológicos, entre otros (Black *et al.*, 2001). Con el uso de la secuenciación de un genoma, nace la genómica de poblaciones, con ella, al igual que con la secuenciación SANGER, un gen esta representado por un sitio polimórfico que puede estar constituido por máximo 4 alelos que se representan con los 4 nucleótidos (A, T, C, G) (Black *et al.*, 2001; Nei y Kummar 2000). El uso de la genómica de poblaciones por lo tanto permite el uso de menos especímenes colectados en la naturaleza para realizar un estudio poblacional dado que provee información más amplia de la genética por individuo, ya que se tiene todo su genoma (Black *et al.*, 2001). Adicionalmente, puesto que, con los análisis de los genomas, una de las secuencias más fáciles de detectar es el genoma mitocondrial (ya que por medio del ensamblaje, la primera molécula que se detecta es la mitocondria). El empleo de la secuenciación de nueva generación o de alto rendimiento a generado mucho progreso en el conocimiento genético de una especie, debido a que no solamente se estudia el ADN, sino también el ARN por lo que de la genómica se originó la transcriptómica. Además, la genómica ha permitido la obtención de muchos mitogenomas de varias especies, permitiendo la realización de filogenias con una mayor resolución y análisis evolutivo ya que con los análisis de los mitogenomas, se comparan los genes que constituyen la mitocondria, su orden, su dirección y la presencia/

ausencia de éstos entre diferentes especies, además se han encontrado genes mitocondriales relacionados con la resistencia de insectos a insecticidas químicos (Ommut *et al.*, 2023).

Las especies presentadas en este libro presentan distintos modos de asociación a su planta hospedera ya que son monófagas, como es el caso de la polilla Guatemalteca, *Tecia solanivora*. Sin embargo, se demostró en las investigaciones de Villanueva *et al.*, (2015 a y b) que la polilla, también se encuentra asociada a los cultivos de papa criolla (*S. phureja*). En su tesis doctoral Diego Villanueva comprobó que las poblaciones de esta polilla se encuentran genéticamente diferenciadas entre los departamentos de Antioquia, Boyacá, Nariño y Norte de Santander y que por los movimientos de papa contaminada del centro del país a los demás departamentos produjo un flujo genético del insecto, entre ellos (Villanueva *et al.*, 2015 b). Respecto al hallazgo de *T. solanivora* en cultivos de papa criolla o *S. phureja*, su clasificación como insecto monófago debería cambiar a oligófago. Adicionalmente del trabajo de Villanueva, se encontró que la especie migra de Guatemala a Sur América y de allí a Islas Canarias y que, en Colombia, la diversidad genética de la especie es mayor de lo que se referenció anteriormente, pues sus poblaciones no han sufrido un cuello de botella (Villanueva *et al.*, 2015 a, b). Estudios de la biología evolutiva de este insecto son escasos y por ello, el trabajo de genética de poblaciones y de filogeografía de *T. solanivora* que se realizó en la Universidad Nacional de Colombia, son los primeros de ellos, en nuestro país.

Por otro lado, la mayoría de las investigaciones realizadas en *T. solanivora* relacionadas con su control químico o biológico, implican el uso de poblaciones provenientes de Cundinamarca principalmente, por lo que con los trabajos de Villanueva se demuestra la necesidad de emplear poblaciones del insecto de Norte de Santander (donde el insecto fue reportado por primera vez) y Nariño (donde la diversidad de especies de papa es la más amplia del país) (Villanueva *et al.*, 2015 b). Hoy en día, Agrosavia ha liberado un producto de *Baculovirus* para el manejo de *T. solanivora*, en el que afirman que genera un control del 80% de sus poblaciones en cultivos de papa (Villamizar *et al.*, 2005; Espinel *et al.*, 2010) y otros métodos de control se han querido emplear, entre ellos, el uso de plantas transgénicas de papa con la endotoxina Cry1Ac del *B. thuringiensis*, el uso de entomopatógenos de *Beuveria bassiana* y *Metarhizium* sp y el empleo de los parasitoides de huevos *Trichogramma achaeae* (Nagaraja y Nagarkatti) y *T. cacoeciae* (Marchal) (Granados-Ferrer y Giraldo -Vanegas 2020), demostró que en Colombia todavía persisten estudios de manejo del insecto con controles biológicos para evitar el uso de insecticidas, ya que en nuestro país se emplean insecticidas químicos organofosforados y carbamatos que generan problemas de salud pública (Granados-Ferrer y Giraldo -Vanegas 2020).

Se recomienda en el caso de *T. solanivora* determinar si la respuesta de susceptibilidad al *B. thuringiensis*, a entomopatógenos, parasitoides y baculovirus es menor en poblaciones del insecto con alta variabilidad genética, como lo son Nariño y Norte de Santander, puesto que la

respuesta de tolerancia puede deberse a una adaptación local. Adicionalmente, es importante establecer si el insecto también se encuentra asociado a otros hospederos de la familia Solanaceae productora de tubérculo en una locación como el departamento de Nariño, donde se ha establecido que existen al menos 13 especies de papa silvestre y tradicional, por lo que en este departamento, el insecto se podría propagar con mayor facilidad (Villanueva *et al.*, b).

Finalmente, un último estudio sobre la identificación de los trips del aguacate por medio de la taxonomía tradicional y la sistemática molecular, permitieron diferenciar siete especies asociadas a este cultivo, por lo que todas podrían ser categorizadas como especies monófagas. En un principio se pensó que estas especies, podrían ser poblaciones polimórficas de una misma especie, pero gracias al uso de la secuenciación de los genes *COI* y la región *ITS*, se identificaron siete especies crípticas que se diferenciaban principalmente por la coloración del cuerpo (Cano-Calle *et al.*, 2021). Estos dos marcadores moleculares fueron utilizados para obtener filogenias bayesianas y se logró reconstruir la filogenia para los géneros *Frankliniella*, *Thrips* y *Scirtothrips*. No obstante, no se logró diferenciar las especies *F. gardeniae* y *F. gossypiana*. Adicionalmente, en la tesis de Daniela Cano, se realizaron investigaciones sobre la microbiota asociada a las especies más abundantes de estos insectos en este cultivo y se encontró que en la especie *S. hansonii* el 90% de su microbiota estaba compuesta por el endosimbionte *Wolbachia*. La otra microbiota encontrada, fue evaluada para pruebas de patogenicidad contra hongos fitopatógenos como *Fusarium*, *Ralstonia*, *Phytophthora* (este último es un oomicete) entre otros. Los resultados de este trabajo generan recomendaciones para avanzar con los estudios del endosimbionte *Wolbachia* en la especie mencionada, en caso de que pueda ser empleado como una alternativa para su control.

8.1 Referencias

- Black, W.C, Baer, C.F., Antolin, M.F., DuTeau N.M. 2201. Population Genomics: Genome-Wide Sampling of Insect Populations. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 441-469
- Cano-Calle, D. 2021. *Caracterización Molecular de trips (Thysanoptera: Thripidae) procedentes de cultivos comerciales de aguacate (Persea americana Mill) del oriente antioqueño y estudio de la diversidad microbiana asociada*. Tesis de doctorado en Biotecnología. P213.
- Cañas-Hoyos, N., Márquez, E. J., y Saldamando-Benjumea, C. I. (2014). Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn y rice strains from central Colombia: A wing morphometric approach. *Annals of the Entomological Society of America*, 107, 575-581.
- Cañas-Hoyos, N., Márquez, E.J. y Saldamando-Benjumea, C.I. (2016). Heritability of Wing Size y Shape of the Rice y Corn Strains of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, 45, 411-9.
- Cañas-Hoyos, N., Lobo-Echeverri, T. y Saldamando-Benjumea, C. I. (2017). Chemical Composition of Female Sexual Glycs of *Spodoptera frugiperda* Corn y Rice Strains from Tolima, Colombia. *Southwestern Entomologist*, 42, 375-394.
- Díaz-Montilla A. E. 2015. *ASPECTOS ECOLÓGICOS Y EVOLUTIVOS DEL PERFORADOR DEL FRUTO Neoleucinodes elegantalis (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) (2015). Un enfoque para orientar las estrategias de manejo en cultivos de solanáceas*. Tesis de doctorado en Ciencias Agrarias. P.222.
- Díaz-Montilla AE, Suarez-Barón H, Gallego -Sánchez G, Viera-Arroyo WF. Saldamando-Benjumea CI. 2017. Variation in the capture of *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae) males using commercial sex pheromones on three solanaceous hosts. *Corpoica Ciencia Tecnología Agropecuaria*, 18, 583–597
- Díaz-Montilla, A. E., Baena-Bejarano, N., Saldamando, C. I., MontoyaLerma, J., 2018. Reproductive incompatibility y fitness components in *Neoleucinodes elegantalis* races (Lepidoptera, Crambidae) from three Solanaceae hosts. *Caldasia*, 40(2), 199-215.
- Granados-Ferrer, E. A., Giraldo-Vanegas, H. 2020. Alternativas biológicas para el manejo de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Povolny), como contribución a la producción limpia de la papa, en Suramérica: Biological alternatives for the management of the Guatemalan moth *Tecia solanivora* (Povolny), as a contribution to the clean production of potatoes, in South America. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5, 79–82
- Hartl, D.L. y Clark, G.C. (1997) *Principles of Population Genetics*. Editorial Sinauer Associates, Sunderlandy.
- Li, S., Xu, X., De Myal, S., Shakeel, M., Hua, Y., Shoukat, R.F., Fu, D., Jin, F. 2021. Gut microbiota mediate *Plutella xylostella* susceptibility to Bt Cry1Ac protoxin is associated with host immune response. *Environmental Pollution*, 271, 116271.

- Omuut, G., Mollel, H.G., Kanyesigye, D. *et al.*, 2023, Genetic analyses y detection of point mutations in the acetylcholinesterase-1 gene associated with organophosphate insecticide resistance in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) populations from Ugya. *BMC Genomics*, 24, 22.
- Paddock, K. J., Pereira, A.E., Finke, D.L., Ericsson A.C., Hibbard, B.E, Shelby, K.S. 2021. Host resistance to *Bacillus thuringiensis* is linked to altered bacterial community within a specialist insect herbivore. *Molecular Ecology*, 30, 5438-5453.
- Nei, M. y Kummar S. (2000). *Molecular evolution y phylogenetics*. Editorial Oxford University Press, New York.
- Ríos-Díez, J. D. y C. I. Saldamando-Benjumea. (2011). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from Central Colombia to two insecticides, methomyl y lambda-cyhalothrin: a study of the genetic basis of resistance. *Journal of Economic Entomology*, 104, 1698-1705.
- Ríos-Díez, J. D., Siegfried, B. y Saldamando-Benjumea, C. I. (2012). Susceptibility of *spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from central Colombia to Cry1Ab y Cry1Ac endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*, 37, 281–293.
- Saldamando-Benjumea, C. I., Estrada-Piedrahíta, K., Velásquez-Vélez, M. I. y Bailey R. I. (2014). Assortative mating y lack of temporality between corn y rice strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) from Central Colombia. *Journal of Insect Behavior*, 27, 555–566.
- Saldamando, C. I. (2016). Biología Evolutiva de Tres Insectos de Importancia Económica de Colombia: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera, Crambidae), *Tecia solanivora* (Lepidopetera, Gelechiidae). *Boletín del Museo de Entomología Francisco Luis Gallego*, 8, 6-28
- Velásquez-Vélez, M. I. C. I. Saldamando y J. D. Ríos-Díez. 2011. Reproductive Isolation between Two Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Collected in Corn y Rice Fields from Central Colombia. *Annals of the Entomological Society of America*, 104, 826-833.
- Vélez-Arango, A. M., Arango R. E., Villanueva D., Aguilera E., y Saldamando, C. I. (2008). Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*, 34, 145-150.
- Villanueva-Mejía, D. F., Ramírez-Ríos, V., Arango-Isaza, R. E., y Saldamando-Benjumea, C. I. 2015 a. Phylogeography of *Tecia solanivora* from Colombia Based on Cytochrome Oxydase I y Cytochrome b Mitochondrial Genes. *Southeastern. Entomologist*, 40, 775–788.
- Villanueva-Mejía, D. F., Ramírez-Ríos, V., Arango-Isaza, R. E., y Saldamando-Benjumea, C. I. 2015 b. Microsatellite Analysis Reveals Population Structure y Population Expansion of *Tecia solanivora* in *Solanum tuberosum* in Colombia. *Southeastern. Entomologist*, 40, 37-52

Índice temático

A

adaptación 19, 25, 32, 45, 68, 108, 146, 149
 aislamiento comportamental 24, 47, 94, 100, 105, 106, 114
 aislamiento químico 24, 47, 114, 116, 125, 126
 aislamiento reproductivo postcigótico 93
 aislamiento reproductivo precigótico 22, 91, 94, 95, 96, 105
 aislamiento temporal 24, 96, 100, 106
 alelos 18, 19, 41, 45, 69, 72, 74, 76, 78, 79, 82, 175

B

Bacillus thuringiensis 47, 66, 86, 88, 135, 140, 152, 153, 154, 155, 179
 biotipos 8, 9, 21, 22, 23, 24, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46,
 47, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 91, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 102,
 106, 107, 108, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 125, 126, 127, 128,
 132, 135, 136, 140, 142, 143, 144, 145, 147, 148, 149, 150, 151, 154, 164, 168, 173,
 174, 175, 179

C

coalescencia 41, 79, 175
 cuello de botella 19, 23, 40, 42, 67, 69, 70, 71, 78, 82, 176

D

deriva genética 20, 56, 82
 diversidad haplotípica 40, 41

E

endotoxinas 24, 47, 115, 135, 137, 138, 139, 140, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 151, 174,
 175
 especiación 17, 18, 19, 25, 27, 32, 46, 91, 92, 93, 94, 95, 105, 106, 107, 108, 173
 especie 6, 7, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 32, 33, 34, 40, 43, 44, 45, 47, 52, 54, 58,
 59, 61, 62, 67, 68, 69, 70, 72, 76, 77, 78, 79, 81, 84, 91, 92, 94, 95, 100, 106, 108, 114,
 115, 120, 127, 144, 161, 162, 163, 164, 168, 169, 173, 174, 175, 176, 177
 evolución 6, 17, 18, 20, 32, 34, 41, 44, 46, 47, 67, 69, 91, 94, 106, 168, 173

F

fenotipo 45, 56

filogenia 8, 9, 25, 64, 67, 68, 69, 161, 163, 164, 169, 177

filogeografía 7, 23, 31, 33, 40, 41, 43, 45, 46, 68, 70, 71, 160, 175, 176

flujo genético 6, 17, 19, 22, 23, 24, 33, 41, 69, 82, 83, 84, 91, 94, 100, 105, 106, 107, 135, 176

G

genética de poblaciones 6, 7, 17, 18, 23, 24, 25, 34, 45, 46, 47, 54, 67, 68, 70, 72, 76, 149, 159, 160, 161, 175, 176

genómica 18, 32, 44, 107, 108, 140, 151, 175

genotipo 20

H

haplotipos 19, 31, 33, 40, 41, 42, 44, 46, 67, 69, 78, 82, 83, 161, 163, 164, 167, 168, 175

heredabilidad 54, 55, 56, 58, 60, 61

I

insecticidas 16, 17, 20, 23, 24, 47, 66, 82, 115, 120, 126, 127, 135, 136, 137, 140, 141, 142, 143, 144, 146, 148, 149, 150, 151, 154, 157, 158, 174, 175, 176

M

Manejo Integrado de Plagas 86. *Véase también* MIP

MIP 16, 17, 18, 19, 174

microsatélites 20, 31, 37, 67, 69, 76, 77, 78, 83, 84

morfometría geométrica 7, 21, 23, 25, 45, 52, 53, 54, 59, 60, 62, 114, 174

mutaciones 69, 135, 150, 151

N

Neoleucinodes elegantalis 8, 9, 21, 26, 27, 85, 112, 178, 179

número de sitios segregantes 19, 40

P

partial warps 52, 53. *Véase también* PW

PW 53, 54, 56, 133

PCR 26, 30, 31, 32, 34, 35, 37, 42, 45, 48, 49, 67, 76, 109, 129, 130, 159
 plaga 7, 8, 9, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 30, 32, 43, 44, 46, 61, 66, 67, 68, 70, 73, 81, 82, 83,
 118, 120, 127, 135, 137, 139, 150, 155, 157, 164, 175
 polimorfismo nucleotídico 40, 44, 175
 puntos de referencia 52, 53, 54, 55. *Véase también* Landmarks; *Véase también* LM
 landmarks 53, 54, 60
 LM 52, 53, 55

S

secuencias 19, 20, 23, 30, 32, 39, 40, 41, 43, 68, 70, 71, 72, 73, 76, 83, 84, 149, 160, 161,
 163, 164, 165, 167, 168, 175
 selección natural 6, 19, 20, 45, 61, 69, 91, 106, 149
 sistemática filogenética 17, 18, 21
Spodoptera frugiperda 6, 8, 9, 20, 26, 27, 28, 30, 33, 48, 49, 50, 63, 64, 67, 87, 88, 90, 91,
 96, 97, 106, 109, 110, 111, 112, 124, 129, 130, 131, 132, 133, 152, 153, 154, 155, 178,
 179
 Structure 26, 28, 87, 89, 179

T

tabla de contingencia 35, 37, 98, 142
 tamaño centroide 52, 54, 58. *Véase también* CS
 CS 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61
 tamaño efectivo de la población 41
Tecia solanivora 7, 8, 9, 21, 23, 27, 28, 52, 61, 66, 68, 72, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 112, 171,
 176, 178, 179
 test de Tajima 40, 41, 71

Biología evolutiva y control de plagas de
importancia económica
Escuela de Biociencias - Facultad de Ciencias

Noviembre de 2023

Diagramador Hernán Leal Rodríguez
Las fuentes tipográficas empleadas son
Times New Roman en cuerpo de texto y
Montserrat en títulos, 12 puntos.

BIOLOGÍA EVOLUTIVA Y CONTROL DE PLAGAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA

Este libro consta de ocho capítulos basados en las investigaciones realizadas por la autora principal y por sus estudiantes de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. La mayoría de los capítulos se enfocan en trabajos de investigación realizados en la polilla *Spodoptera frugiperda*. No obstante, otras plagas también hacen parte de esta publicación. Los capítulos se basan en estudios sobre la genética de poblaciones y filogeografía de las polillas *Spodoptera frugiperda*, conocida como el gusano cogollero del maíz y *Tecia solanivora*, reconocida como la polilla Guatemalteca de la papa y filogenia de los trips del aguacate de Antioquia. Adicionalmente, existen capítulos sobre la morfometría geométrica y su importancia en la diferenciación de poblaciones crípticas, el aislamiento reproductivo entre los biotipos de maíz y arroz de *S. frugiperda* y sobre su respuesta ante controles químicos y biológicos. El propósito del libro es mostrar de manera resumida los resultados de investigación de diversos estudiantes de la Universidad, que lograron ser publicados en revistas nacionales e internacionales y actualizar cada tema investigado para que el lector pueda comprender la importancia de la aplicación de la biología evolutiva en insectos de importancia económica de nuestro país.

