



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización poblacional de *Dalbulus* sp. (Hemiptera: Cicadellidae) insecto vector de Mollicutes en maíz, en el departamento del Huila

Isda Sánchez Reinoso

Universidad Nacional de Colombia
Facultad Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía
Bogotá D.C, Colombia

2021

Caracterización poblacional de *Dalbulus* sp. (Hemiptera: Cicadellidae) insecto vector de Mollicutes en maíz, en el departamento del Huila

Isda Sánchez Reinoso

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director: Augusto Ramírez Godoy Ph.D.

Codirectora: Angela María Vargas Berdugo MSc.

Línea de Investigación:

Entomología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento Agronomía

Bogotá D.C, Colombia

2021

(Dedicatoria o lema)

A mi madre, quien me inspira a entregar siempre lo mejor de mí y a mi hija Ópige, mi motivo personal para seguir adelante y luchar por lo que quiero.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Isda Sánchez Reinoso

Fecha 04/05/2021

Agradecimientos

Quiero agradecer sinceramente a todas aquellas personas que compartieron conmigo diferentes experiencias y conocimientos en el desarrollo de esta tesis. A la Universidad Nacional de Colombia, donde desarrolle mis estudios de posgrado. Al profesor Augusto Ramírez Godoy por su apoyo y consejos durante el trabajo en la maestría. A la investigadora máster Ángela María Vargas por su acompañamiento, la dedicación y el compromiso que tuvo para orientarme en la ejecución del proyecto; además, de todos los conocimientos que me enseñó. Al investigador máster Buenaventura Monje Andrade, por su apoyo y acompañamiento en el estudio morfológico. Al ingeniero Camilo Ignacio Jaramillo, por su apoyo y enseñanzas en el campo de la estadística. Al biólogo Edgar Mauricio Rico, por su ayuda y orientación en la ejecución de los procesos de biología molecular. Finalmente, a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, donde se llevó a cabo la ejecución de la tesis y al Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural quien financió todo el proyecto.

Resumen

Caracterización poblacional de *Dalbulus* sp. (Hemiptera: Cicadellidae), insecto vector de Mollicutes en maíz, en el departamento del Huila.

Dalbulus maidis es un insecto de importancia agrícola por ser considerado uno de los vectores de los patógenos *Spiroplasma kunkelii* y *Candidatus phytoplasma asteris*, patógenos que hacen parte del grupo de los Mollicutes, causantes de la enfermedad conocida como achaparramiento del maíz. En los últimos años, se ha observado un incremento en la incidencia de la enfermedad en diferentes zonas productoras de maíz, asociada al aumento de las poblaciones de *Dalbulus* sp. El departamento del Huila ha presentado afectación desde el año 2015. Con base en la problemática planteada, el presente trabajo tuvo como objetivos, corroborar la especie del género *Dalbulus* asociada a la problemática sanitaria de maíz en municipios del departamento del Huila, determinar su abundancia y evaluar la presencia de posibles morfotipos. Además, dentro de estas poblaciones determinar la frecuencia de infección con mollicutes causantes del achaparramiento. A partir de los muestreos insectiles se recolectaron 6,722 individuos del género *Dalbulus* que en su totalidad pertenecieron a la especie *D. maidis*. La mayor abundancia se concentró en el municipio de Garzón. A través de la caracterización morfológica se identificaron cuatro morfotipos. Las detecciones de los agentes causales del achaparramiento evidenciaron un porcentaje de infección del 34% de *Spiroplasma kunkelii*, 15% de *Candidatus phytoplasma asteris* y 8% de infecciones mixtas dentro del vector. Este trabajo es el primero en caracterizar morfotipos de *D. maidis*, así como determinar la frecuencia de infección con mollicutes en Colombia y se puede considerar la base para futuras investigaciones de interacción mollicutes - vector, que permitan una mejor comprensión del vector desde el punto de presencia, abundancia y porcentaje de infección con mollicutes.

Palabras clave: *Dalbulus maidis*, vector, achaparramiento del maíz, mollicutes, *Spiroplasma kunkelii*, *Candidatus phytoplasma asteris*.

Abstract

Population characterization of *Dalbulus* sp. (Hemiptera: Cicadellidae) vector insect of Mollicutes in corn, in Huila department.

Dalbulus maidis is an insect of agricultural importance because it is considered one of the vectors of the pathogens *Spiroplasma kunkelii* and *Candidatus phytoplasma asteris*, pathogens that are part of the Mollicutes group, causing the disease known as corn stunting. In recent years, an increase in the incidence of the disease has been observed in different corn producing areas, associated with the increase in populations of *Dalbulus* sp. The department of Huila has been one of the regions most affected since 2015. Based on the problem posed, the present work had as objectives, to corroborate the species of the genus *Dalbulus* associated with the sanitary problem of maize in municipalities of the department of Huila, to determine their abundance and within the collected populations to evaluate the presence of possible morphotypes. Likewise, within these populations, to determine the frequency of infection with the mollicutes that cause corn stunting. From the insect samples, 6.722 individuals of the genus *Dalbulus* were collected, all of which belonged to the species *D. maidis*. The greatest abundance of this species was concentrated in the municipality of Garzón. Four morphotypes were identified through morphological characterization. The detections of the causal agents of corn stunt showed an infection percentage of 34% of *Spiroplasma kunkelii*, 15% of *Candidatus phytoplasma asteris* and 8% of mixed infections within the vector. This work is the first to characterize morphotypes of *D. maidis*, as well as to determine the frequency of infection with mollicutes in Colombia and can be considered the basis for future research on mollicutes-vector interaction, which will allow a better understanding of the vector from the point of view of presence, abundance, and percentage of infection with mollicutes.

Keywords: *Dalbulus maidis*, vector, corn stunt, mollicutes, *Spiroplasma kunkelii*, *Candidatus phytoplasma asteris*.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	1
1. Justificación	3
2. Planteamiento del problema	4
3. Hipótesis.....	6
4. Marco teórico	7
4.1 El cultivo del maíz	7
4.2 <i>Dalbulus maidis</i> (DeLong y Wolcott).....	8
4.3 Agentes causales del complejo del achaparramiento del maíz	11
4.4 Interacción vector – patógeno	12
4.5 Estudios poblacionales de <i>D. maidis</i>	13
4.6 Morfotipo y biotipo	13
4.7 Objetivos.....	15
4.7.1 Objetivo general	15
4.7.2 Objetivos específicos	15
5. Capítulo 1: Caracterización morfológica de poblaciones de <i>Dalbulus</i> sp. de individuos colectados en cultivos de maíz del departamento del Huila.	16
5.1 Metodología	16
5.1.1 Muestreo de campo	16
5.1.2 Determinación taxonómica.....	16
5.1.3 Abundancia <i>Dalbulus maidis</i>	18
5.1.4 Evaluación de morfotipos.....	18
5.1.5 Análisis de datos	19
5.2 Resultados.....	21
5.2.1 Evaluación de los caracteres morfológicos diagnóstico para la determinación de la especie <i>Dalbulus maidis</i>	21
5.2.2 Abundancia de <i>Dalbulus maidis</i> en las localidades de muestreo	22
5.2.3 Morfotipos determinados.....	24

5.2.4	Evaluación de los individuos por localidad	32
5.2.5	Evaluación de los individuos por morfotipo.....	34
5.2.6	Evaluación de los individuos por sexo	38
5.2.7	Análisis factorial para datos mixtos.....	40
5.3	Discusión	44
5.3.1	Abundancia <i>Dalbulus maidis</i>	44
5.3.2	Morfotipos determinados	46
5.3.3	Evaluación de individuos por localidades	46
5.3.4	Evaluación de los individuos por morfotipo.....	47
5.3.5	Evaluación de los individuos por sexo	48
6. Capítulo 2: Correlación entre presencia de Mollicutes en morfotipos de poblaciones de <i>Dalbulus maidis</i> colectadas en el departamento del Huila.....		51
6.1	Metodología.....	51
6.1.1	Extracción de ADN insectil.....	51
6.1.2	Detecciones del <i>Spiroplasma kunkelii</i> (CSS).....	52
6.1.3	Detecciones del fitoplasma (MBSP)	53
6.1.4	Estadística descriptiva, análisis de frecuencia de CSS y MBSP en <i>D. maidis</i> . 54	
6.2	Resultados.....	55
6.2.1	Análisis de coinfecciones e infecciones individuales	55
6.2.2	Detecciones individuales de CSS	55
6.2.3	Detecciones individuales de MBSP	57
6.3	Discusión	59
6.3.1	Detecciones del CSS	60
6.3.2	Detecciones de MBSP	61
7. Conclusiones y recomendaciones.....		63
7.1	Conclusiones	63
7.2	Recomendaciones.....	64
A. Anexo: Capítulo uno: descripción y variaciones morfológicas de <i>Dalbulus maidis</i>.....		65
B. Anexo: Capítulo dos: detección de patógenos		77
C. Anexo: Síntomas de la enfermedad del achaparramiento del maíz.....		81
Bibliografía		83

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Banner del Clúster generado a partir de los análisis en R de la separación de cinco especies de <i>Dalbulus</i> : <i>D. elimatus</i> , <i>D. longulus</i> , <i>D. guevarai</i> , <i>D. gelbus</i> y <i>D. maidis</i>	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-2: Abundancia de <i>Dalbulus maidis</i> en ocho localidades del departamento del Huila.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-3: Banner del Clúster generado a partir de los análisis en R de la separación de los cinco morfotipos de las poblaciones de <i>Dalbulus maidis</i> del departamento del Huila.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-4: Caracteres morfológicos del Morfotipo I: A. color de la cabeza, manchas ocelares (moc), antena (ant), pigmentación del abdomen. B. celdas apicales alas anteriores. C. tarsomero pectinado de la pata posterior. D. Aedeagus con procesos apicales divergentes.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-5: Localidades con presencia del morfotipo I de <i>Dalbulus maidis</i> en el departamento del Huila.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-6: Caracteres morfológicos del Morfotipo II. A. color de la cabeza, manchas ocelares (moc), antena (ant), pigmentación del abdomen. B. celdas apicales alas anteriores. C. tarsomero pectinado de la pata posterior. D. Aedeagus con procesos apicales divergentes.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-7: Localidades con presencia del morfotipo II de <i>Dalbulus maidis</i> en el departamento del Huila.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-8: Caracteres morfológicos del Morfotipo III. A. color de la cabeza, manchas ocelares (moc), antena (ant), pigmentación del abdomen. B. celdas apicales alas anteriores. C. tarsomero pectinado de la pata posterior. D. Aedeagus con procesos apicales divergentes.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-9: Localidades con presencia del Morfotipo III de <i>Dalbulus maidis</i> en el departamento del Huila.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-10: Caracteres morfológicos del Morfotipo IV. A. color de la cabeza, manchas ocelares (moc), antena (ant), manchas cercanas a los ocelos (man). B. pigmentación del abdomen, C. celdas apicales alas anteriores. D. tarsomero pectinado de la pata posterior. E. Aedeagus con procesos apicales divergentes.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1-11: Localidades con presencia del Morfotipo IV de <i>Dalbulus maidis</i> en el departamento del Huila.	¡Error! Marcador no definido.

Figura 1-12: Caracteres morfológicos del Morfotipo V. **A.** color de la cabeza, manchas ocelares (moc), antena (ant). **B.** pigmentación del abdomen. **C.** celdas apicales alas anteriores. **D.** tarsomero pectinado de la pata posterior..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 1-13: localidades con presencia del morfotipo V en el departamento del Huila. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 1-14: Mapa de factores análisis factorial de datos mixtos generado a partir de los análisis en R de los individuos por localidad, morfotipo y sexo de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 1-15: Contribuciones de las variables cuantitativas y cualitativas en las dimensiones uno, dos y tres para el análisis factorial de datos mixtos. **A.** Dimensión uno. **B.** Dimensión dos. **C.** Dimensión tres..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 1- 16: Circulo de correlación de las variables cuantitativas en el análisis factorial de datos mixtos generado a partir de los análisis en R de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 1-17: Dendograma de separación de los individuos generado a partir de los análisis en R por localidad y morfotipo de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2-1: Visualización en gel de agarosa de los productos de la PCR realizada para detección del patógeno CSS en individuos de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila (pozos del 1 al 10: muestras de ADN de *D. maidis*, 11: control positivo, 12: blanco PCR). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2-2: Visualización en gel de agarosa de los productos de la PCR realizada para detección del patógeno MBSP en individuos de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila (pozos del 1 al 10: muestras de ADN de *D. maidis*, 11: control positivo, 12: blanco PCR). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2- 3: Detecciones de CSS, MBSP y CSS + MBSP en *Dalbulus maidis* provenientes de las cuatro localidades del departamento del Huila. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2-4: Detecciones del patógeno CSS en *Dalbulus maidis* recolectados de las cuatro localidades del departamento del Huila. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2-5: Detecciones del patógeno CSS en morfotipos de *Dalbulus maidis* caracterizados en el departamento del Huila..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2-6: Detecciones del patógeno MBS en individuos de *Dalbulus maidis* recolectados en cuatro localidades del departamento del Huila. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2-7: Detecciones del patógeno MBSP en individuos de *Dalbulus maidis* separados por su procedencia por localidad del departamento del Huila. 58

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Caracteres morfológicos para la separación de especies del género <i>Dalbulus</i> (<i>D. elimatus</i> , <i>D. guevarai</i> , <i>D. gelbus</i> , <i>D. longulus</i> y <i>D. maidis</i>).	17
Tabla 1-2: Caracteres morfológicos evaluados para la determinación y separación de morfotipos de las poblaciones de <i>Dalbulus maidis</i>	19
Tabla 1-3: Abundancia de individuos de <i>Dalbulus maidis</i> de ocho localidades del departamento del Huila.	23
Tabla 1-4: Medidas resumen de los siete caracteres morfométricos evaluados en individuos de <i>Dalbulus maidis</i> de cuatro localidades del departamento del Huila.	32
Tabla 1-5: Análisis de varianza con prueba de LSD-Fisher de siete caracteres morfométricos de poblaciones de <i>Dalbulus maidis</i> de cuatro localidades del departamento del Huila.	33
Tabla 1-6: Medidas resumen de los siete caracteres morfométricos evaluados en los cuatro morfotipos de poblaciones de <i>Dalbulus maidis</i> del departamento del Huila.	35
Tabla 1-7: Análisis de varianza con prueba LDS- Fisher de siete caracteres morfométricos de los morfotipos de poblaciones de <i>Dalbulus maidis</i> del departamento del Huila.	36
Tabla 1-8: Análisis de varianza y prueba LSD-Fisher de longitud del ovipositor, longitud del aedeagus y la distancia entre los procesos apicales divergentes de hembras y machos de cuatro morfotipos de poblaciones de <i>Dalbulus maidis</i> del departamento del Huila.	37
Tabla 1-9: Abundancia de los individuos de <i>Dalbulus maidis</i> por localidad y morfotipo en poblaciones del departamento del Huila.	38
Tabla 1-10: Medidas resumen de los siete caracteres morfométricos evaluados en machos y hembras de poblaciones de <i>Dalbulus maidis</i> del departamento del Huila.	39
Tabla 1-11: Análisis de varianza con prueba de LSD-Fisher de siete caracteres morfométricos de machos y hembras de poblaciones de <i>Dalbulus maidis</i> de cuatro localidades del departamento del Huila.	39

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
<i>h</i>	hectárea	m ²	
<i>D</i>	diámetro	mm	
<i>t</i>	tonelada	kg	
<i>l</i>	longitud	mm	DF
<i>T</i>	temperatura	°C	

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>CSS</i>	<i>Corn stunt spiropasma</i>
<i>MBSP</i>	Maize bushy stunt phytoplasma
<i>MRFV</i>	Maize rayado fino virus
<i>Ca_amo</i>	Cabeza color Amarillo opaco
<i>Ab_osc</i>	Abdomen de color oscuro
<i>Ab_bla</i>	Cuerpo de color blanco a amarillo claro
<i>N_moc</i>	Número pares de manchas ocelares
<i>M_ant</i>	Un par de manchas anteriores a las manchas ocelares
<i>long_ant</i>	Longitud antenal
<i>dia_man</i>	Diámetro de mancha ocelar
<i>dis_ojo</i>	Distancia entre ojos compuestos
<i>long_cab</i>	Longitud de la cabeza
<i>long_ader</i>	Longitud de ala derecha
<i>long_aizq</i>	Longitud de ala izquierda
<i>long_tot</i>	Longitud total del cuerpo
<i>moc</i>	Manchas ocelares
<i>ant</i>	Antenas
<i>mp</i>	Marcador de peso molecular
<i>G</i>	Garzón
<i>N</i>	Neiva
<i>CA</i>	Campoalegre
<i>T</i>	Tarqui

Introducción

Insectos de la familia Cicadellidae son reportados como vectores de virus y bacterias causantes de enfermedades en plantas (Triplehorn y Jhonson, 2005). Específicamente, *Dalbulus maidis* es simultáneamente el vector de los mollicutes *Candidatus* phytoplasma asteris ó Mayze Bushy Stunt Phytoplasma (MBSP) y *Spiroplasma kunkelii* ó Corn Stunt Spiroplasma (CSS), los principales agentes causales del complejo conocido como achaparramiento del maíz (Oliveira *et al.*, 2004). Este complejo es una enfermedad de gran importancia en el país debido a que tiene efectos negativos en cosecha, disminuyendo el rendimiento del cultivo en aproximadamente un 50% (ICA, 2016, 2019a). La incidencia y gravedad ocasionadas por dicha enfermedad, está directamente relacionada con la presencia y abundancia de poblaciones de su vector. A pesar de ello, para Colombia existe conocimiento limitado respecto a las características biológicas de *D. maidis*, su morfología y frecuencia de infección con los agentes causales del achaparramiento del maíz.

Finalizando el año 2015, el incremento de la incidencia y las pérdidas en cosecha en el departamento del Huila asociado al complejo *D. maidis* – MBSP y CSS ha traído como consecuencia la migración a otros sistemas productivos o búsqueda de zonas de escape para la producción de maíz (ICA, 2016, 2019a). Para generar estrategias de manejo del achaparramiento eficientes, se requiere conocimiento del vector que transmite los agentes causales de la enfermedad (caracterización morfológica, biología, ecología y parámetros demográficos de las poblaciones del insecto vector, entre otras). El presente trabajo buscó describir el vector del achaparramiento arbustivo del maíz *D. maidis*, mediante una caracterización morfológica; además de establecer si existe relación entre la presencia y abundancia de patógenos Mollicutes en las poblaciones de *D. maidis*.

Para lograr la caracterización de *Dalbulus* en el departamento del Huila, el presente trabajo se dividió en dos capítulos, cada uno asociado a cada objetivo específico desarrollado: el primero consistió en el estudio de las poblaciones a partir de caracteres morfológicos; y el

segundo, evaluó la presencia y frecuencia de los Mollicutes en las poblaciones recolectadas.

1. Justificación

Dalbulus maidis es un insecto de importancia agrícola, debido a que es el principal medio de diseminación (vector) del fitoplasmas MBSP, del espiroplasma CSS y el virus Maize rayado fino virus (MRFV), agentes causales de la enfermedad conocida como el achaparramiento del maíz (Casuso, 2017; Loladze *et al.*, 2016). El achaparramiento del maíz es una de las enfermedades que más afecta el rendimiento de los cultivos de maíz en Colombia, causando pérdidas severas superiores al 50% (Varon y Sarria, 2007). Actualmente, se desconocen los aspectos biológicos de las poblaciones colombianas de *D. maidis* y sus interacciones con los agentes causales del achaparramiento del maíz. Es importante resaltar que el maíz es uno de los cultivos más relevantes en el sector agroalimentario de Colombia. Concentra el 13% del área agrícola del país (Govaerts *et al.*, 2019). Para el 2017 el cultivo de maíz tuvo un rendimiento de 4,82 t/h en un área de 378.559,70 h y una producción de 966.820,04 t (Agronet, 2019).

Los estudios poblacionales de insectos vectores como *D. maidis* son importantes porque permiten conocer la dinámica poblacional de los insectos, los cambios en su estructura y tamaño de la población, fluctuaciones en la abundancia de individuos, y los posibles factores que generan esos cambios, como por ejemplo, la respuesta de los vectores a cambios climáticos y ambientales, las relaciones tróficas con otras especies y los efectos de las estrategias de manejo aplicadas (Varon y Sarria, 2007). El conocimiento de las poblaciones de los vectores refleja la dinámica de los patógenos en los cultivos al depender de los insectos para su multiplicación y dispersión; por lo que, el manejo de las enfermedades se puede hacer a través del control de éstos (Hernández-Avila *et al.*, 2000; Varon y Sarria, 2007).

En Colombia, los estudios poblacionales de *D. maidis* son limitados pero necesarios como primer acercamiento a la situación actual de este vector y su relación con los agentes

causales de enfermedad. Teniendo en cuenta el aumento de la presencia de *D. maidis* en las zonas productoras de maíz como el departamento del Huila y las pérdidas que ocasiona el achaparramiento (ICA, 2016, 2019a), además de que este departamento, ha sido una de las regiones geográficas de Colombia con mayor afectación de la enfermedad e incremento cualitativo de las poblaciones de *D. maidis* a partir del año 2015 (ICA, 2016). Ya que, la principal herramienta para el control de la enfermedad es el monitoreo constante para localizar los vectores y/o los síntomas para evitar la propagación de los patógenos; así mismo, ayudar a determinar las interacciones de las poblaciones con los patógenos, y posibles cambios en el insecto vector son importantes.

2. Planteamiento del problema

D. maidis es un hemíptero de la familia Cicadellidae conocido como el principal vector de Mollicutes (MBSP y CSS) causantes del achaparramiento arbustivo del maíz (Moya-Raygoza, 2002). Al ser vector de patógenos que causan enfermedades en los cultivos de maíz, las poblaciones de *D. maidis* están directamente relacionadas con el porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad (Eigenbrode *et al.*, 2018); ya que, el aumento de la población del vector incrementa el riesgo de presencia de la enfermedad; de ahí, la importancia de conocer las características biológicas, ecológicas y poblacionales de *D. maidis* (Martins De Oliveira *et al.*, 2013). *D. maidis* es un fitófago que se alimenta del floema de las plantas; su principal fuente de alimento es el maíz, aunque, se puede alimentar de algunas arvenses en ausencia de maíz; actúa como el principal medio de transmisión y diseminación de los patógenos entre plantas (Eigenbrode *et al.*, 2018).

A nivel mundial, el maíz es el segundo cultivo más productivo, después del trigo (FAO, 2001). Se encuentra entre uno de los renglones más importantes de la producción agrícola de Colombia, siendo el tercer cultivo con mayor superficie de siembra después del café y

el arroz (Govaerts *et al.*, 2019). En Colombia, para el año 2018 se registró la producción de maíz tecnificado en 21 departamentos, mientras que, la producción de maíz tradicional se concentró en 31 departamentos. Específicamente para el departamento del Huila tuvo una producción de 23.706 toneladas en un área total de siembra de 5.689 hectáreas. Respecto al maíz tradicional o convencional, el Huila tuvo una producción de 9.957 toneladas en un área de 6.496 hectáreas (Agronet, 2019).

El complejo del achaparramiento del maíz es una enfermedad causada por el *Candidatus phytoplasma asteris* - Mayze Bushy Stunt Phytoplasma o MBSP, *Spiroplasma kunkelii* - Corn Stunt Spiroplasma o CSS y el *Maize rayado fino virus* o MRFV, que ocasiona pérdidas severas debido a su efecto en el rendimiento de la planta (Varon y Sarria, 2007). Los tres patógenos asociados, son transmitidos por vectores del género *Dalbulus*, siendo *D. maidis* el principal (Loladze *et al.*, 2016). En los últimos años, los cultivos de maíz de las zonas productoras del departamento del Huila se han visto afectados por la creciente diseminación de dicha enfermedad. Finalizando el año 2015, en el departamento del Huila, se presentó la sintomatología del achaparramiento del maíz en varios cultivos, lo que llevó al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), a realizar monitoreo y muestreos de material vegetal e insectos para análisis en laboratorio, reportando la presencia del fitoplasma en insectos de *D. maidis* y tejido vegetal de 360 hectáreas monitoreadas, acompañado por la alta presencia de *D. maidis*. La enfermedad bajó el porcentaje de productividad y rendimiento de los cultivos, llevando a pérdidas a los agricultores (ICA, 2016). A partir de ese reporte, el ICA realizó vigilancia de los cultivos en los siguientes años.

Como medida de prevención del achaparramiento a partir del 2019 el ICA ha implementado la regulación de fechas de siembra en el departamento (ICA, 2019a, 2019b). Sin embargo, la creación de otras estrategias de control se ve limitada debido a los vacíos respecto a la correlación entre patógeno – vector – planta; por lo que, se requiere conocer mejor las interacciones entre estos factores que afectan el cultivo. El primer paso para realizar estudios poblacionales es la correcta identificación de la especie evaluada. Para lo cual, se requiere de una caracterización morfológica.

El objetivo de la investigación se centró en la caracterización de poblaciones de *Dalbulus maidis*, vector del complejo de achaparramiento del maíz en el departamento del Huila,

identificar los vectores mediante caracteres morfológicos y detectar la presencia de los mollicutes (espiroplasma y fitoplasma) en los vectores.

Este trabajo es un primer paso para la comprensión de las poblaciones del insecto vector *D. maidis*, como uno de los principales factores que interfieren en esta enfermedad, que permita tener mayor claridad de las interacciones y así, llenar algunos vacíos en cuanto la morfología y porcentaje de infección de *D. maidis*, para servir de base a investigaciones futuras que permitan desarrollar estrategias de manejo más eficientes, que estén dirigidas ya sea al vector o a los patógenos. Los resultados del proyecto, tienen como beneficiarios la comunidad científica, que pueden usarlos para investigaciones futuras relacionadas con el manejo de la enfermedad y asistentes técnicos del cultivo de diferentes regiones productoras de maíz en Colombia.

3. Hipótesis

Se plantean tres hipótesis:

La principal especie del género *Dalbulus* asociada al cultivo del maíz corresponde a *D. maidis*.

Existen variaciones morfológicas dentro las poblaciones de *D. maidis* asociados a maíz colectadas en diferentes localidades del departamento del Huila.

La abundancia de poblaciones de *D. maidis* asociados a cultivos de maíz en las localidades del departamento del Huila, aumenta la frecuencia de “vectores virulíferos” de Mollicutes causantes del achaparramiento del maíz.

4. Marco teórico

4.1 El cultivo del maíz

El maíz (*Zea mays* L.), es una planta de la familia Poaceae, originaria de México, donde presenta una gran diversidad (Galinat, 1992). A partir de allí, se dispersó de manera muy rápida como planta cultivada y productora de alimentos a diferentes regiones de América (Paliwal, 2001). Actualmente, el maíz es el cultivo de mayor área sembrada y cosechada del mundo. En el año 2019, la producción mundial del maíz fue de 1.124,48 millones de toneladas. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), estima una producción de maíz para el año 2020 de 1.108,62 millones de toneladas, que podría significar una reducción de 15,87 millones de toneladas en la producción total (Producción Agrícola Mundial, 2020). Entre los países con mayor producción de maíz a nivel mundial se encuentran Estados Unidos (347.006.000 toneladas métricas), seguido de China (260.770.000 toneladas métricas) y Brasil (101.000.000 toneladas métricas). Colombia, ocupa el puesto 41 con una producción de 1.600.000 toneladas métricas (Producción Agrícola Mundial, 2020).

En Colombia, los principales departamentos productores de maíz tecnificado son: Meta (284.386,00 t), Córdoba (80.827,04 t), Valle del Cauca (62.528,52 t), Tolima (52.023,78 t) y Huila (23.706,20 t) (Agronet, 2019). Por su parte, el maíz tradicional, tiene su mayor producción en los departamentos: Bolívar (78.478,77 t), Córdoba (37.820,22 t), Magdalena (25.731,58 t), Meta (24.053,55 t), Antioquia (23.043,48 t), Cesar (19.594,23 t), Tolima (14.062,72 t) y Huila (9.957,57 t) (Agronet, 2019). Su producción se da principalmente para el aprovechamiento del grano; aun así, todas las partes de la planta son utilizadas para muchos fines. Entre los principales usos, se encuentra el alimento humano (doméstico o industrial), alimento para animales y fermentado para productos industriales (Paliwal, 2001).

Este cultivo, está expuesto a la presión de diferentes plagas y enfermedades desde el momento de la siembra. Entre los insectos que afectan el cultivo se encuentran las polillas en estados larvales: gusano cortador *Agrotis ipsolis*, gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*, elotero *Helicoverpa zea* y el barrenador *Ostrinia nubilalis*, son los que mayor

daño directo causan a la planta; seguidos por las larvas de escarabajos que se encuentran en el suelo y generan daño a las raíces de las plantas como: *Chaetocnema pulcaria*, *Chaetocnema* spp., *Phyllophaga* spp., *Cyclocephalas* spp., *Malanotus* spp. y *Agriotes* spp., entre otras. Además, se encuentra el grupo de artrópodos insectos, principalmente del orden Hemiptera, que actúan como vectores de virus y bacterias (Flores, 2016). Estos artrópodos por lo general no causan un daño directo en los cultivos y su importancia radica en la severidad de las enfermedades que transmiten. Los insectos chupadores, adquieren los patógenos de tejidos del floema al alimentarse de plantas infectadas, los patógenos, generalmente espiroplasmas, fitoplasmas y virus, tienen la capacidad de penetrar la pared celular del intestino medio del insecto, llegar a la hemolinfa y a otros órganos como los tubos de Malpighi y las glándulas salivales. Así, al alimentarse de una planta sana la infecta por medio de secreciones salivales (Bové *et al.*, 2003; Regassa y Gasparich, 2006).

4.2 *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott)

El orden Hemiptera, es el más exitoso en vectores de fitoplasmas; el suborden Auchenorrhyncha presenta una alta proporción de los insectos que actúan como vectores de patógenos, principalmente en la familia Cicadellidae (Nielson, 1975; Weintraub y Beanland, 2006). Los cicadélidos, se componen de muchas especies de plagas económicamente importantes que causan cinco de los mayores tipos de daños a las plantas, que van, desde necrosis hasta graves alteraciones fisiológicas producto de los hábitos de alimentación y oviposición; además, de los daños causados por los patógenos que pueden transmitir (Nault y Ammar, 1989; Triplehorn y Jhonson, 2005; Virla *et al.*, 2003). *D. maidis* (De Long y Wolcott, 1923) es un Deltocephalinae Macrostelini estrechamente asociado al maíz (Virla *et al.*, 1990). Los adultos y ninfas se alimentan de savia en la base de las hojas que puede causar amarillamiento foliar; sin embargo, su importancia radica en la transmisión de virus y bacterias causantes de la enfermedad conocida como el complejo del achaparramiento del maíz (Casuso, 2017; Flores, 2016). Se tiene reportada en 15 países del continente americano: Estados Unidos, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Argentina y en las islas del Caribe de Cuba, Jamaica y República Dominicana (CABI, 2020). Su distribución geográfica coincide con la distribución de los patógenos que transmite y se encuentra en elevaciones desde el nivel del mar hasta los 3.200 m (Moya-Raygoza y Nault, 1998; Nault, 1979).

El ciclo de vida de *D. maidis* tiene una duración promedio de 34 días a una temperatura de 23°C y 83% de humedad relativa, comienza con la etapa de huevos; que, son muy pequeños y de forma ovalada, translucidos cuando están recién puestos y cambian de coloración a blanquecina una semana después (Casuso, 2017). Una hembra coloca en promedio 428,1 huevos durante su vida, depositando de 4 hasta 19 en hileras (Casuso, 2017; de Remes Lenicov y Virla, 1993; Valarezo *et al.*, 2013). La eclosión ocurre después de 9 días aproximadamente; las ninfas, pasan por cinco estadios en un tiempo promedio de 25 días; éstas, no poseen alas, son de color amarillo translucido, y del primer al tercer estadio ninfal, los individuos presentan manchas negras en los terguitos abdominales, después del tercer estadio, las ninfas comienzan a cambiar de pigmentación, de amarillo a castaño oscuro (Casuso, 2017; Cuadra, 2013; Nielson, 1975). Al llegar al estado adulto, los individuos presentan alas bien desarrolladas, las alas posteriores son translucidas, mientras que, las anteriores (hemiélitros) son de color crema. Las hembras se diferencian de los machos por tener el ovipositor visible a simple vista (más oscuro que el resto del cuerpo) en la parte ventral del abdomen. Los adultos se encuentran alojados generalmente en los cogollos de las plantas, poseen un periodo pre-oviposicional de 4,25 días (Casuso, 2017). Las hembras viven alrededor de 43 días, por su parte, los machos duran aproximadamente 21 días (Valarezo *et al.*, 2013).

Los adultos se caracterizan por lo general por presentar una coloración blanco amarillenta, con dos puntos negros redondos en la corona de la cabeza (manchas ocelares), las antenas largas a diferencia de la mayoría de los cicadélidos, pronoto amarillento, semihélitro hialino y el tercer par de patas, presenta una hilera de espinas en la tibia. Los machos, miden de 3,50 a 4,00 mm, el aedeagus presenta un proceso apical divergente; las hembras, miden entre 4,00 y 4,10 mm, el séptimo esternito abdominal es modificado, presentando dos muescas profundas (Nielson, 1975; Triplehorn y Nault, 1985). Su principal hospedero es el maíz, pero en ausencia de este, *D. maidis* puede encontrarse en otras Poaceas, como la avena (*Avena sativa*), la cebada (*Hordeum vulgare*), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el centeno (*Secale cereale*), el sorgo (*Sorghum*), el trigo (*Triticum*), la caminadora (*Rottboellia exaltata*), el pasto Johnson (*Sorghum halepense*) y en ciertas hierbas (Nielson, 1975; Varon y Sarria, 2007). La importancia de *D. maidis* en los cultivos de maíz radica en su papel como vector del fitoplasma MBSP y el espiroplasma

CSS (Ebbert y Nault, 2001; Nault y Ammar, 1989; Oliveira *et al.*, 1998; Varon y Sarria, 2007).

De los estudios realizados en México en la biología de la especie, se ha encontrado un efecto de diferentes temperaturas en la supervivencia y fecundidad de tres especies de saltahojas de *Dalbulus*, en el que se observó que *D. maidis* tiene un comportamiento similar con *D. elimatus* y *D. gelbus* en las temperaturas 20, 23 y 26°C. Sin embargo, en la temperatura más alta evaluada 29°C, *D. maidis*, presenta mayor tiempo de supervivencia y una fecundidad más alta con respecto a las otras especies (Madden *et al.*, 1986). Heady y colaboradores (1985), realizaron un estudio sobre el comportamiento de la oviposición en seis especies de *Dalbulus*, encontrando que *D. maidis* y *D. elimatus*, saltahojas especialistas en *Zea*, han conservado rasgos oviposicionales de sus ancestros comunes relacionados con *Tripsacum*; debido a que, *D. maidis* no presenta cambios en sus patrones de oviposición cuando usa como hospedero a *Tripsacum* (Heady *et al.*, 1985).

La temperatura es un factor importante en el desarrollo de las poblaciones de *D. maidis*, se sabe que las poblaciones incrementan en temporadas secas y temperaturas altas (Varon y Sarria, 2007); por tanto, en el contexto actual del mundo con respecto al cambio climático, se han realizado estudios para ver su influencia en *D. maidis*. En el 2015, un estudio evaluó el efecto de diferentes temperaturas sobre el desarrollo, el rendimiento y la aptitud física del vector, aplicando modelos para la estimación del efecto de cambio climático, como resultado se observó que la temperatura tuvo una influencia significativa en la ovoposición y la incubabilidad, así como en el desarrollo y la supervivencia del vector, por lo que, el rango de distribución de *D. maidis* podría estar restringido por la disponibilidad de la planta huésped más que por la temperatura (Van Nieuwenhove *et al.*, 2016). Así mismo, un estudio más reciente, aplicó un modelo a escala global para evaluar los efectos del cambio climático en *D. maidis*, con el que se concluye que, aunque el cambio climático generaría una disminución de las áreas adecuadas para la presencia de *D. maidis* en Sudamérica, países como Argentina, Chile, Ecuador, Perú, Venezuela y Colombia, presentarían áreas muy adecuadas para el desarrollo de la especie (Santana *et al.*, 2019).

4.3 Agentes causales del complejo del achaparramiento del maíz

Los agentes causales del achaparramiento que corresponden a *Candidatus phytoplasma asteris* o Maize Bushy Stunt Phytoplasma (MBSP) y *Spiroplasma kunkelii* o Corn Stunt Sipiropiasm (CSS), son transmitidos por *D. maidis* de forma persistente. Son bacterias del grupo Mollicutes, que se caracterizan por tener un genoma pequeño, bajo contenido de GC y no presentar pared celular (Bové *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2005). Tanto el MBSP y como el CSS, se reproducen asexualmente por gemación o fisión binaria. Se encuentran restringidos al floema de la planta, de donde son ingeridos por los vectores (Arismendi *et al.*, 2010). Una vez transmitidos por el vector a la planta tienen un período de incubación entre los 40 a los 60 días, por lo que, los síntomas se manifiestan después de la floración del cultivo (Varon y Sarria, 2007). Todos los estadios de desarrollo del insecto (ninfas y adultos) son capaces de adquirir y transmitir la enfermedad. A pesar de que, *D. maidis* es el principal vector de los patógenos del achaparramiento del maíz, se conocen otras especies de cicadélidos que igualmente pueden ser vectores: *D. elimatus* y *Graminiella nigriformis* (Varon y Sarria, 2007). La eficacia del vector después de estar expuestos a una planta infectada con MBSP o CSS puede variar según las condiciones ambientales, la planta hospedera, el patógeno, entre otros factores (Bosco *et al.*, 1997; Ebbert y Nault, 1994; Ebbert y Nault, 2001; Garcia-Salazar *et al.*, 1991).

Generalmente, los síntomas se caracterizan inicialmente por la formación de bandas blancas o cloróticas en la base de las hojas jóvenes. A medida que avanza la infección, se puede cubrir la lámina foliar volviéndose púrpura o amarilla. Se presenta enanismo, acortamiento de entrenudos, proliferación de brotes o mazorcas en los nudos, ramificación excesiva, reducción de las raíces. En infecciones tempranas, las plantas no producen mazorcas o estas no se desarrollan normalmente y la altura es muy reducida (Varon y Sarria, 2007). El achaparramiento es una de las enfermedades más importantes que afectan el cultivo de maíz en regiones tropicales y subtropicales, las pérdidas generadas, se relacionan directamente con el porcentaje de incidencia de la enfermedad, porcentaje de plantas improductivas, grado de severidad y poblaciones del insecto vector. Entre más temprana es la infección en los cultivos, mayores son las pérdidas. Se han registrado pérdidas en el rendimiento de los cultivos de maíz entre el 50 a 90% (Druetta y Luna, 2018).

4.4 Interacción vector – patógeno

Los cicadélidos tienen una alta capacidad para transmitir patógenos a un amplio rango de huéspedes (Dávila-Berúmen *et al.*, 2014). La interacción vector-patógeno puede ser circulativa o propagativa, los patógenos circulativos son ingeridos por el insecto, pasan a través de la pared intestinal hacia la hemolinfa y luego a las glándulas salivales para salir con las secreciones salivales sin perder la capacidad de infección. Por su parte, los patógenos propagativos, tienen características de transmisión similares a los circulativos, pero se pueden multiplicar en su vector, y las características del vector juegan un papel fundamental en el ciclo vital de los patógenos y como tal de la enfermedad en la planta (Nault y Ammar, 1989). Una vez que *D. maidis* adquiere alguno de los patógenos, MBSP o CSS, puede transmitirlos por el resto de su vida. Por lo general, en un campo afectado por achaparramiento aproximadamente el 10% de la población del insecto vector transmite la enfermedad (de Luque *et al.*, 2003). Las investigaciones con respecto a *D. maidis* y la enfermedad del achaparramiento, abarcan diferentes temas de los aspectos, biológicos, ecológicos, comportamentales, interacción con los patógenos, entre otros. Gran parte de estos estudios, han sido realizados en México; aunque también, se encuentran trabajos en Estados Unidos, Brasil y Argentina.

Spiroplasma kunkelii y su interacción con *D. maidis* ha sido evaluado en México, determinando la presencia del patógeno en dos condiciones de campo; evidenciando la presencia de *S. kunkelii* en sitios de baja elevación que eran irrigados durante la estación seca, comparado con sitios de alta elevación que no eran irrigados, donde no se encontró ni el patógeno ni el vector; pero, en la estación húmeda se encontraron adultos de *D. maidis* de mayor tamaño en las localidades de alta elevación sin riego, lo que se atribuyó a procesos de migración (Moya-Raygoza *et al.*, 2007).

Un estudio sobre la biología de la transmisión de tres aislamientos de fitoplasma MBSP por *D. maidis* a diferentes temperaturas, demostró que la transmisión del patógeno no se diferenciaba entre los aislamientos a temperaturas de 15 y 20°C; sin embargo, a 25°C se observó una mayor tasa de transmisión y periodo de latencia más largo para el aislamiento de Poza Rica (Veracruz, México); además, el aislamiento de Tlaltizapan (Morales, México) tuvo mejor transmisión cuando la infección se daba en los estadios ninfales. (Moya-Raygoza y Nault, 1998). Ebbert y Nault (2001), compararon la supervivencia de saltahojas

expuestos a maíz sano con saltahojas expuestos a maíz infectado con espiroplasma CSS y fitoplasma MBSP, encontrando un aumento en la supervivencia de los insectos después de la infección con cualquiera de los patógenos, además, de encontrar interacciones significativas entre las poblaciones de *D. maidis* con los diferentes aislamientos, que demuestra, una interacción mutualista entre *D. maidis* y los patógenos.

4.5 Estudios poblacionales de *D. maidis*

En el campo de la caracterización genética de poblaciones de *D. maidis*, se ha observado que poblaciones del noreste de Brasil difieren morfológicamente de poblaciones del centro-sur, por tal razón, en el 2007 Oliveira y colaboradores estudiaron el posible aislamiento genético de estas poblaciones mediante el método de amplificación aleatoria de polimorfismos del DNA, RADP por sus siglas en inglés. Sus resultados sugieren que las poblaciones del noreste están genéticamente aisladas, mientras que, las de la zona centro-sur del país presentan migraciones con un flujo de genes alto entre ellas. Por otro lado, un estudio que se realizó para observar la variación genética entre poblaciones de *D. maidis* de México y Argentina, en las que se han reportado diferencias en la reproducción y caracteres fenotípicos, el análisis de secuencia de la subunidad 1 del gen citocromo oxidasa (COI) y el espaciador interno transcrito del ADN ribosomal, ITS2, demostró que la variación genética era baja en el COI y nula en el ITS2 entre las poblaciones de los dos países, atribuido posiblemente a un corto periodo de tiempo evolutivo desde la dispersión del maíz en América (Palomera *et al.*, 2012).

4.6 Morfotipo y biotipo

En entomología, a través de los años se han usado diferentes definiciones para el término biotipo al momento de clasificar individuos de una especie determinada (Claridge y Den Hollander, 1983; Gallun, 1977). En general, Maxwell y Jennings (1980), definen biotipo como un individuo o población que se distingue del resto de su especie por criterios distintos a la morfología como: diferencias de hospedantes, capacidad y grado de fitotoxicidad, resistencia a insecticidas y/o comportamientos distintos. Es el caso de *Spodoptera frugiperda*, considerada la principal plaga de maíz, en la cual se han

identificado dos biotipos que no se pueden diferenciar morfológicamente, pero se diferencian en su composición genética expresada en, resistencia a insecticidas y preferencia de diferentes especies vegetales (maíz y arroz) (Drès y Mallet, 2002; Flores-zamora, 2004; Vélez-Arango *et al.*, 2008). Adicionalmente, en *Bemisia tabaci*, se han encontrado más de veinte biotipos, entre los que se ha estudiado principalmente el biotipo B. Este biotipo tiene un mayor rango de hospedantes, comparado con los demás biotipos de *B. tabaci*, característica que puede contribuir en la capacidad de establecimiento y prolongación en un cultivo (Zang *et al.*, 2006). Adicionalmente, el biotipo Q de *B. tabaci* ha demostrado una mayor capacidad de adaptación y colonización que el biotipo B, en los diferentes sistemas productivos (Liu *et al.*, 2016).

Por otro lado, los morfotipos corresponden a grupos de individuos de una especie que presentan variaciones en sus caracteres morfológicos, como coloración, presencia o ausencia de manchas, setas, estrías, diferencia en la genitalia, entre otros (González *et al.*, 2014). Como es el caso de *Aramigus tessellatus*, un coleóptero de la familia Curculionidae, que no presenta un carácter diagnóstico exclusivo a nivel morfológico que lo defina como especie, por lo que se diferencian seis morfotipos a partir de caracteres morfométricos externos de la espermateca y del conducto espermatecal (Lanteri *et al.*, 2002; Lanteri y Díaz, 1994). Otro ejemplo es *Xyleborus volvulus* (Coleoptera: Curculionidae), que en poblaciones mexicanas se han diferenciado dos morfotipos en base a su coloración, forma de las setas, estrías, estructuras pronotales, entre otras (Pérez-silva y Equihua-Martínez, 2007; Silva *et al.*, 2015). Para el caso específico de *D. maidis*, se ha considerado que, debido a su amplio rango de distribución en centro y Suramérica, se pueden presentar diferencias morfológicas y fisiológicas entre sus poblaciones (Oliveira *et al.*, 2004). Larsen y Nault (1994), observaron diferencias morfológicas en tamaño y pigmentación de poblaciones mexicanas de *D. maidis* con relación a cambios estacionales. A su vez, Oliveira y colaboradores (2004), observaron variaciones en cuanto a tamaño, pigmentación, peso y otros cuatro caracteres morfológicos, entre poblaciones de diferentes localidades de Brasil.

4.7 Objetivos

4.7.1 Objetivo general

Caracterizar poblaciones de *Dalbulus* sp. (De Long) provenientes de cultivos de maíz afectados por Mollicutes en el departamento del Huila.

4.7.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente poblaciones de *Dalbulus* sp. (Hemiptera: Cicadellidae) de individuos colectados en cultivos de maíz del departamento del Huila.

- Correlacionar presencia y frecuencia de Mollicutes en poblaciones de *Dalbulus maidis*.

5. Capítulo 1: Caracterización morfológica de poblaciones de *Dalbulus* sp. de individuos colectados en cultivos de maíz del departamento del Huila.

5.1 Metodología

5.1.1 Muestreo de campo

Los muestreos se realizaron en zonas maiceras de ocho localidades del departamento del Huila entre octubre de 2018 y mayo de 2019: Aipe, Campoalegre, Aipe-Villavieja, La Plata, Palermo, Garzón, Neiva y Tarqui tomando datos de temperatura, precipitación y clima de los sitios de muestreo. Se hicieron dos recolecciones por punto de muestreo usando una aspiradora D-VAC en transeptos lineales de 20 m que tenían como punto de partida el borde del cultivo hacia el centro, para un total de 72 muestras analizadas, que corresponden a 36 predios de maíz del departamento afectados por la enfermedad. El material colectado en la aspiradora fue guardado en bolsas de papel y transportado en neveras para disminuir el metabolismo de los insectos, una vez llevados al laboratorio, se separaron por órdenes taxonómicos, se depositaron en viales con alcohol al 70% y se conservaron en refrigeración a 4 °C.

5.1.2 Determinación taxonómica

Las muestras insectiles fueron limpiadas, retirando material vegetal, separando los individuos de grupos insectiles que no son de interés, es decir, insectos de ordenes diferentes a Hemiptera, para posteriormente determinar su abundancia. La determinación a género y especie, se realizó seleccionando caracteres diagnósticos desde el taxón superior Orden, hasta el nivel taxonómico de especie. Los individuos se agruparon en el orden Hemiptera, a partir de la observación de la forma y longitud de la cabeza, abdomen alargado y terminado en punta y el aparato bucal del tipo picador-succionador (Triplehorn

y Jhonson, 2005). Para la familia Cicadellidae los caracteres seleccionados fueron la presencia de ocelos y flagelo antenal, disposición de las antenas y las tibias de las patas posteriores con una o más hileras de espinas (Dietrich, 2005; Triplehorn y Jhonson, 2005). Para la determinación del género *Dalbulus* se observaron el flagelo antenal largo, las alas anteriores con cuatro celdas distales, primer tarsomero posterior pectinado con una seta aguda interna corta y modificaciones del séptimo y decimo tergo abdominal (Knight y Webb, 1993). Debido a que el género *Dalbulus* cuenta con 14 especies, para seleccionar los caracteres de mayor peso para cada especie se realizó un clúster de análisis monotético función MONA (Struyf *et al.*, 1996), a partir de los caracteres morfológicos seleccionados para la determinación de la especie *D. maidis*, se construyó una matriz de presencia – ausencia (Tabla 1-1), con los caracteres: presencia de manchas ocelares, diámetro de las manchas ocelares, coloración de cabeza y abdomen, a partir de las claves taxonómicas de Triplehorn y Nault (1985), esto, comparando las cinco especies de *Dalbulus* presentes en maíz y asociados a la transmisión de los patógenos causantes del achaparramiento del maíz, *D. elimatus*, *D. maidis*, *D. guevarai*, *D. gelbus* y *D. longulus* (Moya-Raygoza, 2002). La determinación de la especie *Dalbulus maidis* se realizó a partir de individuos hembras y machos que conservan todas las estructuras morfológicas externas en buen estado (antenas, patas y alas) ya que se requieren para poder determinar la especie a través de los caracteres diagnósticos, que se observaron a través de estereoscopio marca Leica EZ4.

Tabla 1-1: Caracteres morfológicos para la separación de especies del género *Dalbulus* (*D. elimatus*, *D. guevarai*, *D. gelbus*, *D. longulus* y *D. maidis*).

<i>Carácter morfológico</i>	<i>D. elimatus</i>	<i>D. guevarai</i>	<i>D. gelbus</i>	<i>D. longulus</i>	<i>D. maidis</i>
Tercer segmento antenal largo	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Alas anteriores con cuatro celdas apicales presentes	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Primer tarsomero de las patas posteriores pectinado con seta aguda interna	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Cabeza de color amarillo opaco	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente
Manchas anteriores negras	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente
Manchas ocelares dos veces el diámetro de los ocelos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente

Abdomen de color café oscuro o con franjas negras	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
---	----------	---------	---------	---------	----------

Además de la revisión de los caracteres mencionados, se llevó a cabo un proceso de extracción de genitalia de machos, que se realizó con tratamiento del abdomen de los individuos con KOH al 10% durante 40 minutos en baño serológico, para aclaramiento de las estructuras y lavado con alcohol ácido (70 ml de etanol al 70% y 30 ml de ácido acético) por 15 minutos. Se revisó el aedeagus que en *D. maidis* presenta procesos apicales divergentes; también, se observó el séptimo esternito abdominal de las hembras, modificado con dos muescas profundas (Triplehorn y Nault, 1985).

5.1.3 Abundancia *Dalbulus maidis*

La frecuencia de *D. maidis* se determinó mediante el conteo total de individuos colectados y número de individuos por localidad. Además, se observó la abundancia de *D. maidis* a partir de un agrupamiento de los individuos de acuerdo a condiciones de clima y altitud para evidenciar si existe una relación de las condiciones ambientales asociada a la abundancia de *D. maidis*.

5.1.4 Evaluación de morfotipos

Los especímenes seleccionados para el análisis morfológico se escogieron teniendo en cuenta el estado de preservación y el estado de desarrollo, eliminando individuos que les faltaran partes del cuerpo y los individuos en estadios inmaduros (ninfas); seleccionando hembras y machos adultos que presenten los caracteres morfológicos para la identificación. A los individuos evaluados se les realizó el montaje en seco en alfileres entomológicos, etiquetado y codificación para su conservación.

Posterior a la determinación de la especie *D. maidis*, se seleccionaron cinco caracteres adicionales dentro de esta, para evaluar la posible presencia de diferencias morfológicas (morfotipos) en las poblaciones del departamento del Huila (Tabla 1-2). En la gráfica

Banner (Fig. 1-1), cada paso de separación de los morfotipos se realizó a partir de la presencia o ausencia de un carácter específico.

Tabla 1-2: Caracteres morfológicos evaluados para la determinación y separación de morfotipos de las poblaciones de *Dalbulus maidis*.

Carácter morfológico	Abreviación
Cabeza de color amarillo opaco.	Ca_amo
Abdomen de color café oscuro o con franjas negras.	Ab_osc
Cuerpo de color blanco a amarillo claro.	Ab_bla
Dos pares de manchas ocelares.	N_moc
Un par de manchas anteriores a las manchas ocelares.	M_ant

Se tomaron fotografías de los caracteres morfológicos evaluados usando un estereoscopio marca Leica EZ4W con cámara incorporada. Las fotografías en vista dorsal y ventral de los individuos se tomaron a un aumento de 20X, las imágenes de los caracteres de la cabeza se tomaron en un aumento de 30X y las fotografías de los tarsomeros de las patas posteriores se tomaron a un aumento de 35X. Con la aplicación AirLab, se realizaron las medidas de 10 individuos de cada morfotipo por localidad, se midió el largo de la antena, diámetro de las manchas ocelares, distancia entre los ojos compuestos, longitud de la cabeza (alto), longitud ala derecha, longitud ala izquierda y la longitud total del cuerpo. En la extracción de genitalia, se tomaron medidas de longitud del aedeagus y distancia entre los procesos apicales en los machos, en las hembras se midió la longitud del ovipositor.

Se realizó un montaje no permanente de las alas para observar las cuatro celdas apicales, se retiró el ala anterior derecha de un individuo de cada morfotipo por localidad y se depositó en un portaobjetos con una gota de agua destilada, las fotografías se tomaron con un microscopio Primo Star ZEISS a través del programa ZEN a un aumento de 4X; las alas retiradas, fueron guardadas en viales con alcohol al 70% después de tomar las fotografías.

5.1.5 Análisis de datos

- **Clúster separación de morfotipos**

La importancia de cada uno de los caracteres morfológicos usados para la separación de los morfotipos se evaluó mediante un análisis de agrupación monotético (*MONothetic*

Analysis Clustering of Binary Variables) a través de la función MONA (Struyf *et al.*, 1996), para la agrupación jerárquica divisiva de un conjunto de datos de variables binarias. Este análisis determinó una gráfica Banner, donde los cuadros grises representan los individuos evaluados, los cuadros amarillos representan la presencia de los caracteres presentes y los negros la ausencia de los caracteres. Este análisis se realizó mediante el paquete *clúster* en el paquete estadístico R versión 4.0.2. (Maechler *et al.*, 2019).

Con las longitudes de los caracteres morfológicos longitud antenal (*long_ant*), diámetro de mancha ocelar (*dia_man*), distancia entre los ojos compuestos (*dis_ojo*), longitud de la cabeza (*long_cab*), longitud ala derecha (*long_ader*), longitud ala izquierda (*long_aizq*) y longitud total del cuerpo (*long_tot*), se realizaron diversos análisis.

- **Estadística descriptiva**

Para identificar la dispersión y confiabilidad de los datos se realizó el cálculo de media, mediana, desviación estándar, error estándar, coeficiente de variación, mínimos y máximos. Posteriormente, se realizaron gráficos Boxplot para la observación de la dispersión de los datos y comparación de las poblaciones. Lo anterior se llevó a cabo en el software R versión 4.0.2 (R Core Team, 2020).

- **Análisis de datos por modelos mixtos**

Con los caracteres morfológicos *long_ant*, *dia_man*, *dis_ojo*, *long_cab*, *long_ader*, *long_aizq* y *long_tot* se realizaron comparaciones para determinar si existen diferencias significativas en los individuos de *D. maidis* al compararlos entre localidades, morfotipos y sexo, la influencia de las variables en conjunto y la interacción entre ellas al momento de comparar las poblaciones. Para lo cual, se realizó un análisis por modelos mixtos, con pruebas de normalidad, homogeneidad de varianza y se realizaron pruebas *F* con *p*-valor.

- **Análisis factorial para datos mixtos (AFDM)**

Finalmente, se evaluó en conjunto los datos de variables cuantitativas (longitud antenal, diámetro de la mancha ocelar, distancia entre los ojos compuestos, longitud de la cabeza, longitud ala derecha, longitud ala izquierda y longitud total) y variables cualitativas (localidades, morfotipos y sexo) a través de un AFDM para observar las interacciones en

conjunto de los tres caracteres morfológicos y la categorización de las poblaciones a través del morfotipo, localización y sexo de los individuos.

Posteriormente, se realizó un análisis de clúster municipio y morfotipo, por el método de Ward y la distancia de Bray-Curtis. Los anteriores análisis se realizaron en el programa estadístico R versión 4.0.2 (R Core Team, 2020) con los paquetes FactoMineR, factoextra y vegan (Kassambara y Mundt, 2017; Le *et al.*, 2008; Oksanen *et al.*, 2019).

5.2 Resultados

5.2.1 Evaluación de los caracteres morfológicos diagnóstico para la determinación de la especie *Dalbulus maidis*

A partir de los caracteres morfológicos seleccionados en la metodología (Tabla 1) se realizó un análisis estadístico para corroborar la importancia que cada carácter morfológico tiene en la separación de la especie *D. maidis*. Con el banner, se demostró que *D. maidis* posee los siete caracteres morfológicamente determinantes para su identificación, ya que, es la primera especie en ser separada con estos caracteres morfológicos. *D. maidis* se separó de *D. guevarai* por el carácter del diámetro de mancha ocelar, presente en *D. maidis* y ausente en *D. guevarai*. A su vez, *D. guevarai* y *D. gelbus* se diferencian y separan por el carácter de coloración amarillo opaco de la cabeza, presente en *D. guevarai* y ausente en *D. gelbus*. El carácter de las manchas ocelares anteriores, separó a *D. gelbus* de *D. longulus*, ausente y presente, respectivamente. Finalmente, *D. elimatus* se diferencia de *D. longulus* por el carácter de coloración café del abdomen, presente en *D. elimatus* y ausente en *D. longulus* (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). De esta manera, se corroboró la relevancia de los caracteres morfológicos seleccionados para la determinación de *D. maidis*.

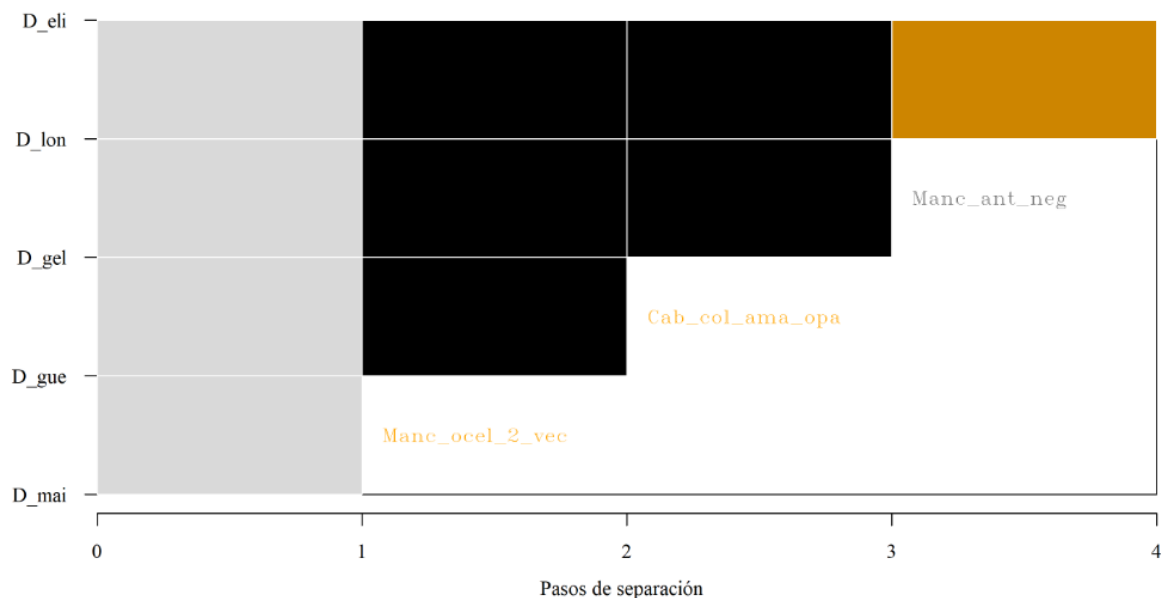


Figura 1-1: Banner del Clúster generado a partir de los análisis en R de la separación de cinco especies de *Dalbulus*: *D. elimatus*, *D. longulus*, *D. guevaria*, *D. gelbus* y *D. maidis*.

5.2.2 Abundancia de *Dalbulus maidis* en las localidades de muestreo

Se encontraron un total de 6.759 individuos de la especie *D. maidis* en los municipios muestreados en el departamento del Huila. De los ocho municipios evaluados, en tres de ellos la abundancia *D. maidis* fue cero. Los municipios con mayor abundancia fueron Garzón y Tarqui, con 3.820 y 2.650 individuos, respectivamente (Figura 1-2). Neiva tuvo una abundancia de 145 individuos, mientras en Campoalegre se encontraron 103 individuos. Tomando en cuenta la abundancia cero de tres localidades (La Plata, Palermo y Aipe-Villavieja) y la poca cantidad de individuos de la localidad de Aipe, se decidió realizar los análisis de morfología y la comparación de las poblaciones entre las cuatro localidades que presentaron *Dalbulus maidis* (Campoalegre, Neiva, Tarqui y Garzón).

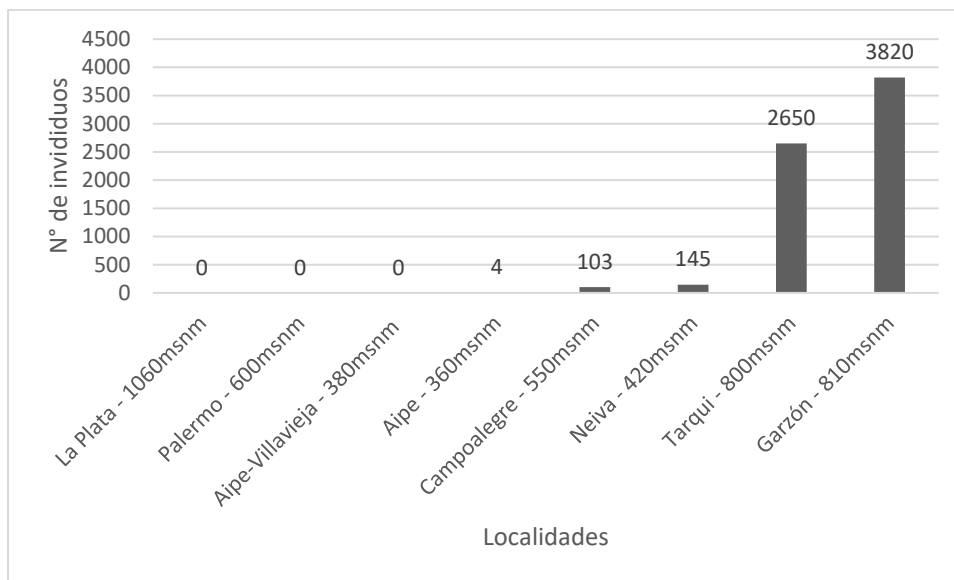


Figura 1-2: Abundancia de *Dalbulus maidis* en ocho localidades del departamento del Huila.

Tomando en cuenta las condiciones climáticas de las localidades muestreadas, se observa que la mayor abundancia se presenta en las zonas de Garzón y Tarqui, que tienen un clima templado – semihúmedo con un rango altitudinal de 720 a 880 msnm y una temperatura de 22 a 24 °C; por su parte, en la zona de Neiva y Campoalegre, que presentan un clima cálido – semiárido en elevaciones de 360 a 585 msnm muestran una abundancia mucho más baja con respecto a la zona de Garzón y Tarqui (Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Abundancia de individuos de *Dalbulus maidis* de ocho localidades del departamento del Huila.

clima	Altitud msnm	Temperatura °C	Municipio	Abundancia
Frío – húmedo	1060 - 1120	18 - 20	La Plata	0
Templado – semihúmedo	720 - 880	22 -24	Garzón	6470
			Tarqui	
Cálido – semiárido	360 - 585	26 -28	Aipe	252
			Neiva	
			Campoalegre	

5.2.3 Morfotipos determinados

El clúster de la matriz de datos permitió verificar la separación de cinco grupos de acuerdo con las características morfológicas presentes. Entre los individuos evaluados se describieron cinco posibles morfotipos inicialmente: el morfotipo II, es el primer morfotipo que se define por la ausencia del carácter *Ab_osc*, presente en los otros cuatro morfotipos. El segundo paso de separación utilizó el carácter *Ca_amo*, ausente en el morfotipo III. El morfotipo V, se agrupó por la presencia del carácter *N_moc*, carácter que se tomó en cuenta en la evaluación de morfotipos, porque se ha reportado como una característica poco común, pero presente en algunos individuos de *D. maidis* (Knight y Webb, 1993); los morfotipos I y IV, se diferenciaron por el carácter *M_ant*, presente en el morfotipo IV y ausente en el morfotipo I (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

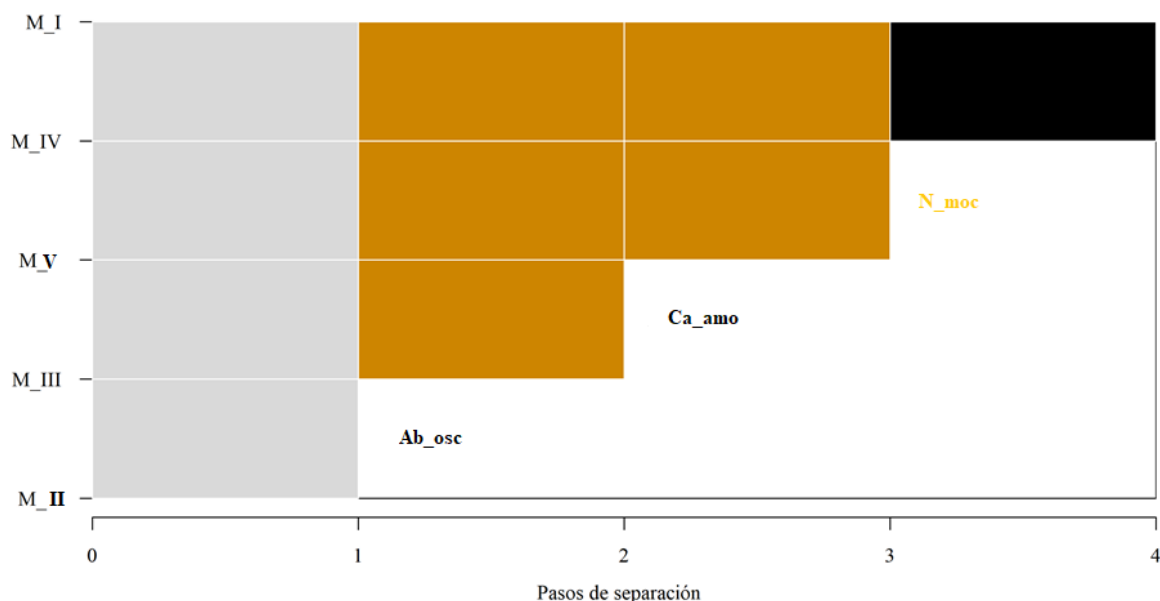


Figura 1-3: Banner del Clúster generado a partir de los análisis en R de la separación de los cinco morfotipos de las poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila.

Los cinco morfotipos encontrados en las poblaciones de *Dalbulus maidis* del Huila se describen a continuación:

- **Morfotipo I**

El Morfotipo I se caracterizó por la presencia de siete caracteres de la matriz. El tercer segmento antenal largo de 0,69 mm de longitud (Figura 1-4A). La presencia de las cuatro celdas apicales en las alas anteriores (Figura 1-4B), El primer tarsomero de las patas posteriores pectinado con una seta aguda (Figura 1-4C), cabeza de color amarillo opaco, manchas ocelares presentes con un diámetro promedio 0,09 mm y el abdomen de color café oscuro (Figura 1-4A). El aedeagus presenta los procesos apicales característicos de la especie *D. maidis* (Figura 1-4D).

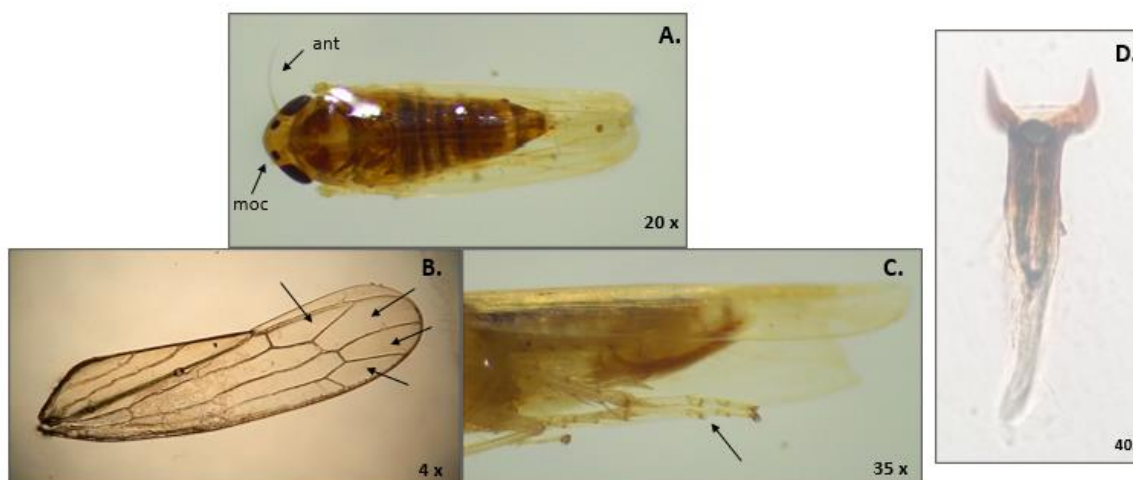


Figura 1-4: Caracteres morfológicos del Morfotipo I: **A.** color de la cabeza, manchas ocelares (moc), antena (ant), pigmentación del abdomen. **B.** celdas apicales alas anteriores. **C.** tarsomero pectinado de la pata posterior. **D.** Aedeagus con procesos apicales divergentes. **Fuente:** Sánchez Reinoso Isda 2020 – 2021.

La presencia del morfotipo I en el departamento del Huila se da en cuatro de las localidades evaluadas; Neiva, Campoalegre, Garzón y Tarqui (Figura 1-5). Con mayor número de individuos en la localidad de Tarqui y menor abundancia en Garzón.

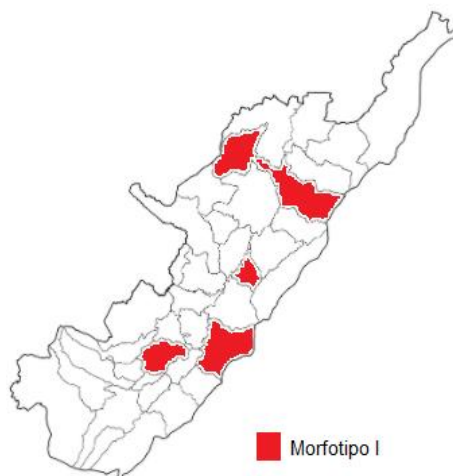


Figura 1-5: Localidades con presencia del morfotipo I de *Dalbulus maidis* en el departamento del Huila. **Fuente:** Producción propia.

▪ **Morfotipo II**

El Morfotipo II presenta seis características similares al Morfotipo I, el tercer segmento antenal largo de 0,65 mm en promedio (Figura 1-6A), presencia de las cuatro celdas apicales en las alas anteriores (Figura 1-6B), primer tarsomero de las patas posteriores pectinado con una seta aguda (Figura 1-6C), cabeza de color amarillo opaco, manchas ocelares presentes con un diámetro de alrededor de 0,12 mm. La característica principal del Morfotipo II que lo separa de los otros morfotipos, es la pigmentación del abdomen que va del blanco al amarillo claro (Figura 1-6A), aedeagus con procesos apicales divergentes (Figura 1-6D).

Este morfotipo se encuentra presente en los municipios de Tarqui, Garzón, Neiva y Campoalegre (Figura 1-7). En mayor abundancia se encuentra en el municipio de Tarqui; mientras, en los tres municipios restantes, se encuentran en igual cantidad.

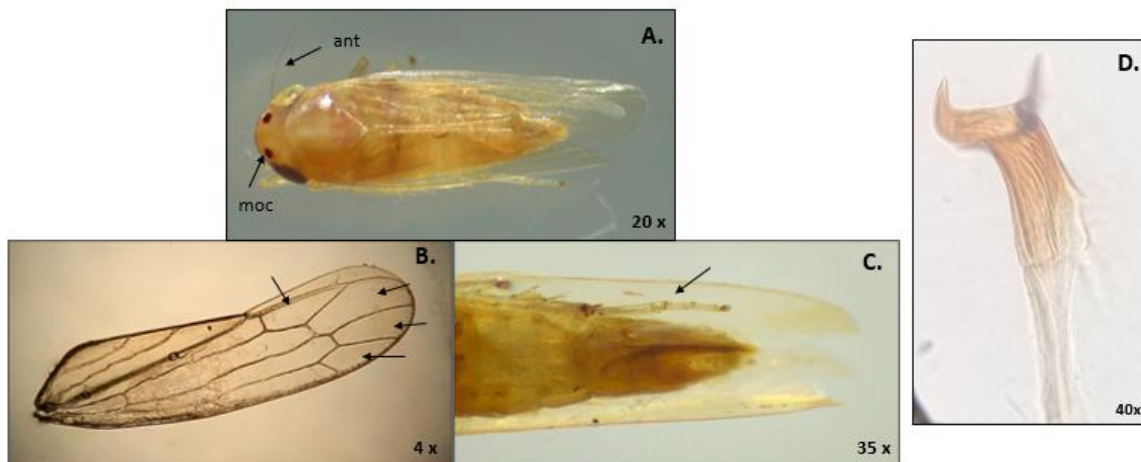


Figura 1-6: Caracteres morfológicos del Morfotipo II. **A.** color de la cabeza, manchas ocelares (moc), antena (ant), pigmentación del abdomen. **B.** celdas apicales alas anteriores. **C.** tarsomero pectinado de la pata posterior. **D.** Aedeagus con procesos apicales divergentes. **Fuente:** Sánchez Reinoso Isda 2020 – 2021.

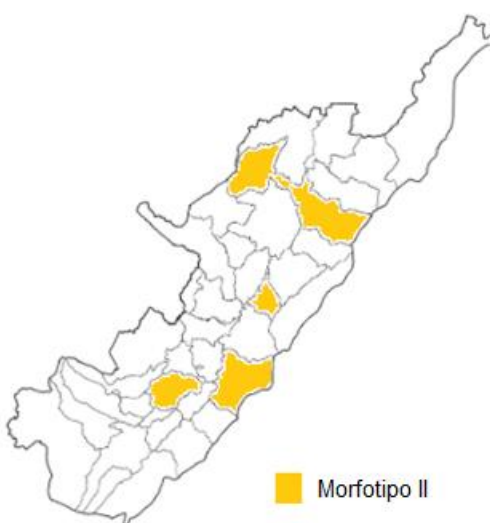


Figura 1-7: Localidades con presencia del morfotipo II de *Dalbulus maidis* en el departamento del Huila. **Fuente:** Producción propia.

▪ Morfotipo III

Se caracteriza por no presentar un carácter morfológico compartido por los otros cuatro morfotipos. Los individuos del Morfotipo III, presentan el tercer segmento antenal largo con 0,67 mm de longitud aproximadamente (Figura 1-8A), presencia de las cuatro celdas apicales en las alas anteriores (Figura 1-8B), primer tarsomero de las patas posteriores

pectinado con una seta aguda (Figura 1-8C), manchas ocelares presentes con un diámetro promedio de 0,09 mm, abdomen de color café oscuro; su cabeza no es de color amarillo opaco, presenta una coloración oscura (Figura 1-8A), aedeagus con procesos apicales divergentes (Figura 1-8D). De este morfotipo se encontraron pocos individuos, y solamente se encontró presencia de ellos en el municipio de Tarqui (Figura 1-9).

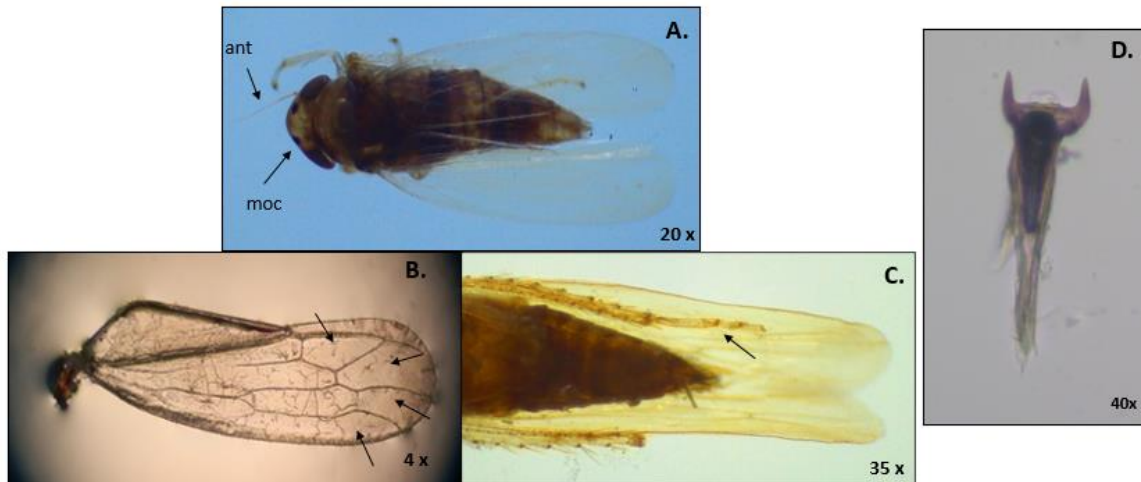


Figura 1-8: Caracteres morfológicos del Morfotipo III. **A.** color de la cabeza, manchas ocelares (moc), antena (ant), pigmentación del abdomen. **B.** celdas apicales alas anteriores. **C.** tarsomero pectinado de la pata posterior. **D.** Aedeagus con procesos apicales divergentes. **Fuente:** Sánchez Reinoso Isda 2020 – 2021.



Figura 1-9: Localidades con presencia del Morfotipo III de *Dalbulus maidis* en el departamento del Huila. **Fuente:** Producción propia.

▪ Morfotipo IV

Este morfotipo, comparte las siete características del Morfotipo I, el tercer segmento antenal largo de 0,71 mm en promedio (Figura 1-10A), presencia de las cuatro celdas apicales en las alas anteriores (Figura 1-10C), primer tarsomero de las patas posteriores pectinado con una seta aguda (Figura 1-10D), cabeza de color amarillo opaco, manchas ocelares presentes con un diámetro de alrededor de 0,1 mm (Figura 1-10A), abdomen de color café oscuro (Figura 1-10B). Se diferencia del Morfotipo I, porque, además, presenta un par de manchas en la parte posterior de la cabeza, muy cerca de las manchas ocelares (Figura 1-10A). Aedeagus con procesos apicales divergentes (Figura 1-10E).

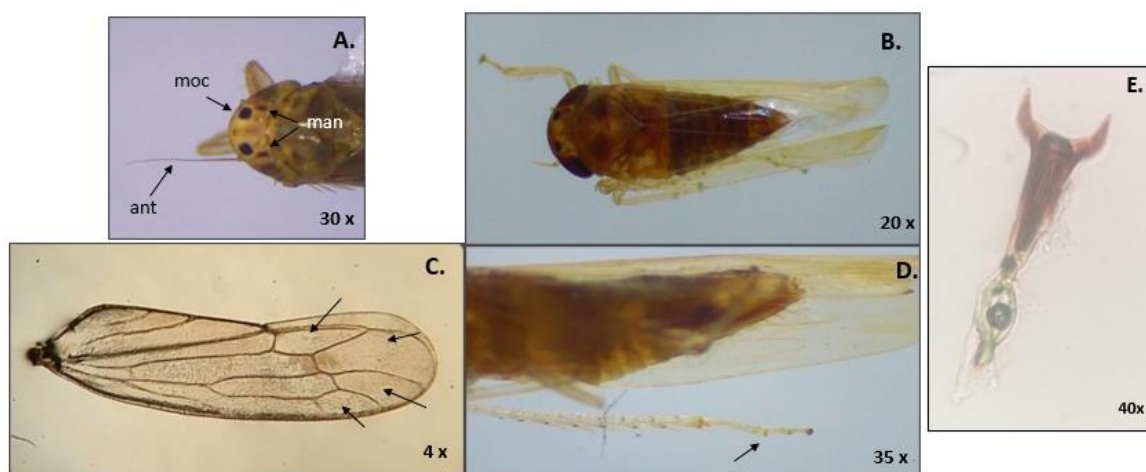


Figura 1-10: Caracteres morfológicos del Morfotipo IV. **A.** color de la cabeza, manchas ocelares (moc), antena (ant), manchas cercanas a los ocelos (man). **B.** pigmentación del abdomen, **C.** celdas apicales alas anteriores. **D.** tarsomero pectinado de la pata posterior. **E.** Aedeagus con procesos apicales divergentes. **Fuente:** Sánchez Rienoso Isda 2020 – 2021.

El Morfotipo IV, al igual que el Morfotipo I, se presenta en las cuatro localidades que tienen poblaciones de *D. maidis*, Neiva, Campoalegre, Garzón y Tarqui, siendo esta última la localidad con mayor presencia del Morfotipo IV (Figura 1-11).

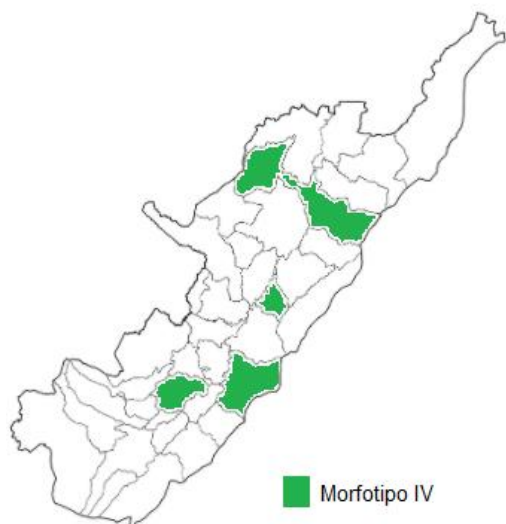


Figura 1-11: Localidades con presencia del Morfotipo IV de *Dalbulus maidis* en el departamento del Huila. **Fuente:** Producción propia.

▪ Morfotipo V

El Morfotipo V fue determinado a partir de dos individuos hembras colectadas en Garzón (Figura 1-13), que presentan las cuatro celdas apicales en las alas anteriores (Figura 1-12C), el primer tarsomero de las patas posteriores pectinado con una seta aguda (Figura 1-12D), pigmentación abdominal de café oscuro (Figura 1-12B); cabeza de color amarillo opaco, tercer segmento antenal de 0,35 mm de longitud, a diferencia de los otros morfotipos presenta cuatro manchas ocelares (Figura 1-12A). Tomando en cuenta estas características, en un principio se tomaron como *D. maidis*; sin embargo, a pesar de compartir los caracteres morfológicos con los demás individuos, se envió a corroboración con experto del grupo, pues se evidenciaban diferencias marcadas de los individuos respecto a su tamaño.

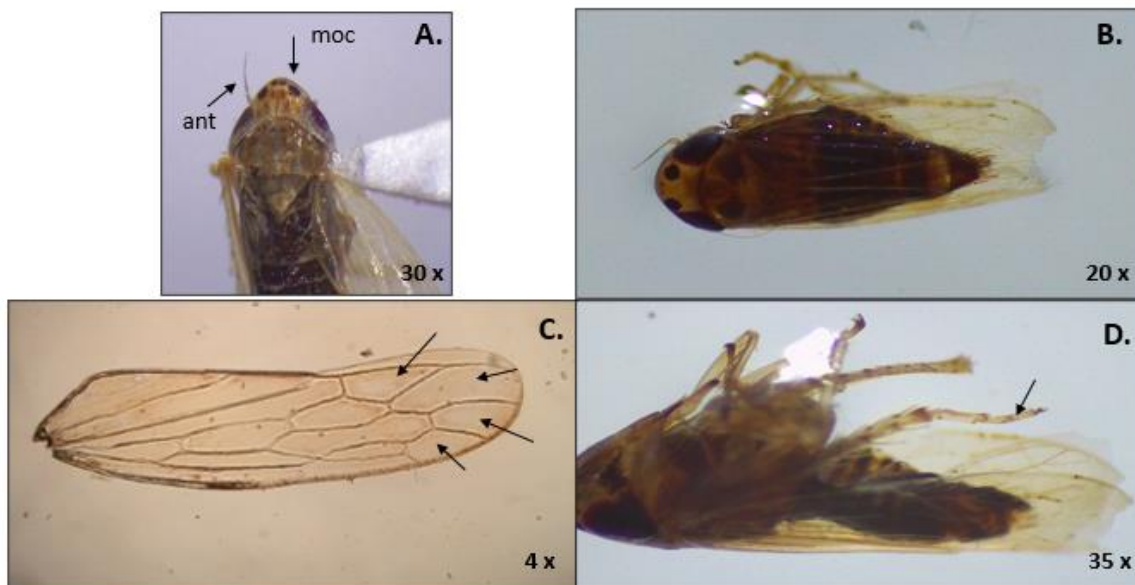


Figura 1-12: Caracteres morfológicos del Morfotipo V. **A.** color de la cabeza, manchas oclares (moc), antena (ant). **B.** pigmentación del abdomen. **C.** celdas apicales alas anteriores. **D.** tarsomero pectinado de la pata posterior. **Fuente:** Sánchez Reinoso Isda 2020 – 2021.

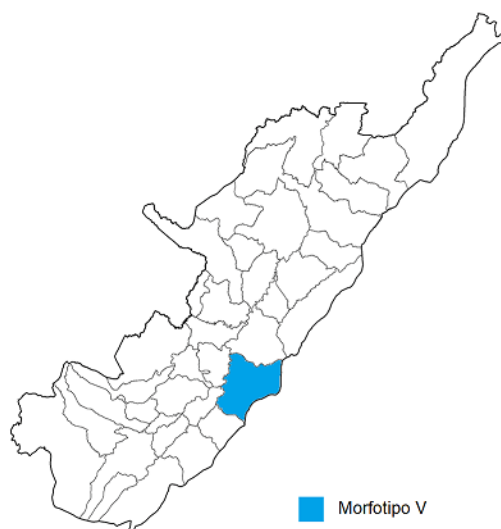


Figura 1-13: localidades con presencia del morfotipo V en el departamento del Huila. **Fuente:** Producción propia.

A partir de la corroboración de la determinación de la especie, a través de fotografías de los individuos en vista dorsal y ventral, con el experto en el grupo, el investigador Gustavo Moya de la Universidad de Guadalajara (G. Moya-Raygoza, comunicación personal, 09 de

noviembre de 2020), determinó que los individuos agrupados en este morfotipo, no corresponden a la especie *D. maidis* y posiblemente pertenecen a un género de cicadélido diferente, sugiriendo que podrían pertenecer al género *Amblysellus*. Sin embargo, este género presenta 18 especies descritas, reportadas en Canadá, Estados Unidos, México, Guatemala, Ecuador, Argentina y China (Pinedo-Escatell *et al.*, 2020) y no se encuentran reportes para Colombia. La falta de individuos y baja abundancia no permitió una confirmación de la determinación a nivel de género de este morfotipo. Por tanto, el morfotipo V no se tuvo en cuenta para las comparaciones con los demás individuos en los siguientes análisis.

5.2.4 Evaluación de los individuos por localidad

Se realizaron los análisis de estadística descriptiva para los caracteres morfológicos long_ant, dia_man, dis_ojo, long_cab, long_ader, long_aizq y long_tot de 130 individuos. Los datos se analizaron por localidad comparando las cuatro localidades, Campoalegre, Neiva, Garzón y Tarqui, presentando valores de desviación estándar, error estándar y coeficiente de variación bajos, que equivalen a una agrupación de datos homogénea. La long_ant no presenta mucha diferencia entre las localidades, para Campoalegre y Garzón es de 0,69 mm en promedio, Tarqui 0,72 mm y Neiva de 0,70 mm. Por su parte, la long_tot se presenta el mayor valor promedio en Campoalegre (3,94 mm) y el menor valor en Neiva 3,79 mm respectivamente (Tabla 1-4). El dia_man tiene un rango de medición de 0,07 a 0,14 mm, sin embargo, la mayoría de los individuos presentan valores entre los 0,09 y 0,11 mm en las cuatro poblaciones. La long_cab está alrededor de 0,30 mm en las cuatro localidades. Se observa en la longitud de las alas, que el ala izquierda es un poco más grande que el ala derecha generalmente (Tabla 1-4).

Tabla 1-4: Medidas resumen de los siete caracteres morfométricos evaluados en individuos de *Dalbulus maidis* de cuatro localidades del departamento del Huila. **D.E:** desviación estándar, **C.V:** coeficiente de variación.

LOCALIDAD	VARIABLE	N	MEDIA	D.E.	C.V.	MIN	MÁX
CAMPOALEGRE	Long total	30	3,94	0,25	06,43	3,48	4,79
CAMPOALEGRE	Long antenal	30	0,69	0,11	15,20	0,51	0,89
CAMPOALEGRE	Dia man oce	30	0,10	0,01	14,06	0,07	0,14
CAMPOALEGRE	Long ala der	30	3,37	0,18	05,42	2,97	3,65
CAMPOALEGRE	Long ala izq	30	3,38	0,19	05,59	2,99	3,63
CAMPOALEGRE	Long cabeza	30	0,31	0,04	13,53	0,24	0,40

CAMPOALEGRE	Dist de ojos	30	0,51	0,06	12,11	0,35	0,61
NEIVA	Long total	30	3,83	0,32	08,46	3,32	4,56
NEIVA	Long antenal	30	0,69	0,08	11,89	0,52	0,90
NEIVA	Dia man oce	30	0,10	0,01	13,12	0,07	0,12
NEIVA	Long ala der	30	3,37	0,32	09,60	2,74	3,95
NEIVA	Long ala izq	30	3,40	0,32	09,48	2,82	3,98
NEIVA	Long cabeza	30	0,32	0,04	11,32	0,26	0,40
NEIVA	Dist de ojos	30	0,50	0,07	14,15	0,36	0,63
GARZÓN	Long total	30	3,79	0,31	08,12	3,30	4,90
GARZÓN	Long antenal	30	0,70	0,11	15,00	0,50	0,90
GARZÓN	Dia man oce	30	0,10	0,01	13,21	0,08	0,14
GARZÓN	Long ala der	30	3,30	0,24	07,12	2,91	3,72
GARZÓN	Long ala izq	30	3,33	0,24	07,16	2,95	3,75
GARZÓN	Long cabeza	30	0,29	0,04	15,34	0,21	0,38
GARZÓN	Dist de ojos	30	0,50	0,05	09,96	0,39	0,60
TARQUI	Long total	40	3,86	0,26	06,82	3,35	4,42
TARQUI	Long antenal	40	0,72	0,11	15,55	0,47	0,94
TARQUI	Dia man oce	40	0,10	0,01	12,98	0,07	0,12
TARQUI	Long ala der	40	3,37	0,17	05,06	3,02	3,66
TARQUI	Long ala izq	40	3,40	0,18	05,20	2,94	3,71
TARQUI	Long cabeza	40	0,30	0,04	13,06	0,21	0,38
TARQUI	Dist de ojos	40	0,49	0,05	10,85	0,36	0,59

En el análisis por modelos mixtos de los caracteres morfométricos, se observó la normalidad y homogeneidad de los siete caracteres; se encontró tanto la longitud antenal, el diámetro de la mancha ocelar, la longitud del ala derecha e izquierda y la longitud total no presentaron diferencias significativas entre las cuatro localidades (Tabla 1-5). El valor promedio de la Long_ant es de 0,70 a 0,72 mm; Long_ader va de 3,34 a 3,40 mm, mientras que, Long_aizq está entre 3,80 y 3,88 mm.

Tabla 1-5: Análisis de varianza con prueba de LSD-Fisher de siete caracteres morfométricos de poblaciones de *Dalbulus maidis* de cuatro localidades del departamento del Huila.

LOCALIDAD	VARIABLE	MEDIA	LDS-FISHER
CAMPOALEGRE	Long antenal	0,70	A
NEIVA	Long antenal	0,71	A
GARZÓN	Long antenal	0,70	A
TARQUI	Long antenal	0,27	A
CAMPOALEGRE	Dia man oce	0,10	A
NEIVA	Dia man oce	0,10	A
GARZÓN	Dia man oce	0,10	A
TARQUI	Dia man oce	0,10	A
CAMPOALEGRE	Long ala der	3,37	A
NEIVA	Long ala der	3,31	A
GARZÓN	Long ala der	3,38	A
TARQUI	Long ala der	3,36	A

CAMPOALEGRE	Long ala izq	3,38	A
NEIVA	Long ala izq	3,34	A
GARZÓN	Long ala izq	3,40	A
TARQUI	Long ala izq	3,39	A
CAMPOALEGRE	Long total	3,88	A
NEIVA	Long total	3,80	A
GARZÓN	Long total	3,82	A
TARQUI	Long total	3,83	A
CAMPOALEGRE	Long cabeza	0,32	B
NEIVA	Long cabeza	0,29	A
GARZÓN	Long cabeza	0,32	B
TARQUI	Long cabeza	0,31	A B
CAMPOALEGRE	Dist de ojos	0,51	B
NEIVA	Dist de ojos	0,50	A B
GARZÓN	Dist de ojos	0,50	A B
TARQUI	Dist de ojos	0,48	A

Por otro lado, los caracteres de longitud de la cabeza y distancia entre los ojos, si presentaron diferencias significativas entre las localidades (Tabla 1-5). La Long_cab promedio de la localidad de Neiva es de 0,29 mm, mientras que Campoalegre y Garzón presentan una Long_cab de 0,32 mm cada uno. Tarqui presenta diferencias significativas con respecto a Campoalegre en el carácter Dis_ojo, con un promedio de 0,48 y 0,51 mm, respectivamente.

5.2.5 Evaluación de los individuos por morfotipo

En los morfotipos, el valor promedio más alto para la longitud antenal lo presenta el Morfotipo III con 0,73 mm; mientras que la longitud antenal más corta es la del Morfotipo II, 0,68 mm. La longitud total del cuerpo, presenta su valor más bajo en el Morfotipo I, 3,74 mm, y el promedio más alto está también en el Morfotipo II con 3,97 mm, seguido del Morfotipo IV con 3,86 mm (Tabla 1-6). El diámetro de la mancha es el carácter que no presenta variaciones en su promedio en las localidades, los morfotipos y el sexo, su valor promedio es de 0,10 mm. El valor más bajo del ala derecha e izquierda es de 2,94 mm, el primero del Morfotipo IV y el segundo del Morfotipo II. El valor más alto para Long_ader es del Morfotipo II con 3,95 mm, y el de Long_aizq es de 3,98 mm del Morfotipo II.

Tabla 1-6: Medidas resumen de los siete caracteres morfométricos evaluados en los cuatro morfotipos de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila. **D.E.:** desviación estándar, **C.V.:** coeficiente de variación.

MORFOTIPO	VARIABLE	N	MEDIA	D.E.	C.V.	MIN	MÁX
I	Long total	40	3,74	0,23	06,13	3,32	4,11
I	Long antenal	40	0,70	0,10	14,53	0,47	0,90
I	Dia man oce	40	0,10	0,01	12,47	0,07	0,12
I	Long ala der	40	3,33	0,27	08,15	2,74	3,74
I	Long ala izq	40	3,35	0,27	07,97	2,82	3,75
I	Long cabeza	40	0,30	0,04	14,60	0,21	0,40
I	Dist de ojos	40	0,49	0,06	11,46	0,36	0,59
II	Long total	40	3,97	0,34	08,65	3,31	4,79
II	Long antenal	40	0,69	0,08	11,89	0,52	0,90
II	Dia man oce	40	0,10	0,01	13,02	0,07	0,12
II	Long ala der	40	3,40	0,22	06,54	2,91	3,95
II	Long ala izq	40	3,42	0,21	06,28	2,94	3,98
II	Long cabeza	40	0,31	0,04	14,17	0,24	0,40
II	Dist de ojos	40	0,51	0,05	09,27	0,42	0,63
III	Long total	10	3,75	0,18	04,75	3,46	4,03
III	Long antenal	10	0,73	0,09	12,74	0,63	0,94
III	Dia man oce	10	0,10	0,01	13,57	0,08	0,12
III	Long ala der	10	3,33	0,18	05,41	3,04	3,66
III	Long ala izq	10	3,36	0,18	05,32	3,01	3,69
III	Long cabeza	10	0,31	0,03	11,28	0,26	0,36
III	Dist de ojos	10	0,45	0,03	07,57	0,40	0,51
IV	Long total	40	3,86	0,27	07,04	3,30	4,90
IV	Long antenal	40	0,72	0,10	14,13	0,51	0,88
IV	Dia man oce	40	0,10	0,01	11,84	0,07	0,12
IV	Long ala der	40	3,34	0,21	06,15	2,94	3,76
IV	Long ala izq	40	3,36	0,23	06,76	2,95	3,90
IV	Long cabeza	40	0,31	0,04	13,03	0,21	0,38
IV	Dist de ojos	40	0,51	0,07	14,10	0,35	0,61

La comparación de los caracteres morfométricos entre los morfotipos mostró que cinco de ellos no presentan diferencias significativas (Tabla 1-7). La longitud antenal promedio varía de 0,69 en el Morfotipo II a 0,73 mm en el Morfotipo III. El promedio de la longitud de la cabeza no varía entre los cuatro morfotipos, 0,31 mm; el ala derecha posee valores promedio de 3,31 a 3,39 mm, mientras que el ala izquierda va de 3,34 a 3,41 mm. Al igual que en las comparaciones por localidades de los individuos, el diámetro de la mancha ocelar tiene un promedio de 0,10 mm en los cuatro morfotipos.

Tabla 1-7: Análisis de varianza con prueba LDS- Fisher de siete caracteres morfométricos de los morfotipos de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila.

MORFOTIPO	VARIABLE	MEDIA	LDS-FISHER
I	Long antenal	0,71	A
II	Long antenal	0,69	A
III	Long antenal	0,73	A
IV	Long antenal	0,72	A
I	Dia man oce	0,10	A
II	Dia man oce	0,10	A
III	Dia man oce	0,10	A
IV	Dia man oce	0,10	A
I	Long ala der	3,35	A
II	Long ala der	3,39	A
III	Long ala der	3,31	A
IV	Long ala der	3,34	A
I	Long ala izq	3,37	A
II	Long ala izq	3,41	A
III	Long ala izq	3,34	A
IV	Long ala izq	3,36	A
I	Long total	3,75	A
II	Long total	3,93	B
III	Long total	3,77	A B
IV	Long total	3,84	A B
I	Long cabeza	0,31	A
II	Long cabeza	0,31	A
III	Long cabeza	0,31	A
IV	Long cabeza	0,31	A
I	Dist de ojos	0,49	B
II	Dist de ojos	0,50	B
III	Dist de ojos	0,45	A
IV	Dist de ojos	0,51	B

Por otro lado, la distancia entre los ojos y la longitud total mostraron diferencias significativas entre los individuos (Tabla 1-7). El morfotipo III, se diferencia significativamente con respecto a los morfotipos I, II y IV por el carácter Dis_ojo, con valor promedio de 0,45 mm; los otros tres morfotipos, presentan valores entre los 0,49 y 0,51 mm en promedio. La Long_tot, muestra diferencias significativas entre el morfotipo I y II, con valores alrededor de 3,75 y 3,93 mm, respectivamente.

En un análisis de varianza, se comparó la longitud del ovipositor de las hembras de los cuatro morfotipos, mostrando una diferencia significativa del morfotipo I con respecto a los otros tres morfotipos (p -valor = 0,0016). Se observó que el morfotipo I presenta un ovipositor más corto de 698,10 μ m en promedio; mientras que, los morfotipos II, III y IV están alrededor de los 800 μ m más o menos (Tabla 1-8).

Tabla 1-8: Análisis de varianza y prueba LSD-Fisher de longitud del ovipositor, longitud del aedeagus y la distancia entre los procesos apicales divergentes de hembras y machos de cuatro morfotipos de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila.

MORFOTIPO	VARIABLE	MEDIA	LDS-FISHER
I	Long ovipositor	698,10	A
II	Long ovipositor	793,40	B
III	Long ovipositor	841,52	B
IV	Long ovipositor	812,87	B
I	Long aedeagus	145,29	B
II	Long aedeagus	128,49	A
III	Long aedeagus	131,26	A
IV	Long aedeagus	140,34	A B
I	Dist proc apic	47,17	B
II	Dist proc apic	50,13	C
III	Dist proc apic	45,03	A
IV	Dist proc apic	43,97	A

Por su parte, la comparación de la longitud del aedeagus mostró diferencias significativas del morfotipo I y los morfotipos II y III (Tabla 1-8). El morfotipo I presenta la mayor longitud promedio con 145,29 μm , mientras el morfotipo II presentó la menor longitud entre los cuatro morfotipos, alrededor de 128,49 μm . El morfotipo III no presenta diferencias significativas respecto a los morfotipos II y IV, mientras que, el morfotipo IV está entre los valores de los morfotipos II, III y I, 140,34 μm .

Como una medida adicional, se evaluó la distancia entre los procesos apicales divergentes del aedeagus, con el cual se encontraron diferencias significativas en los cuatro morfotipos (Tabla 1-8). Los morfotipos IV y III no presentan diferencias entre ellos; sin embargo, presentan diferencias con respecto a los morfotipos I y II. El morfotipo II presenta la mayor distancia entre los procesos divergentes, 50,13 μm en promedio, mientras, los morfotipos IV y III presentan los valores más bajos, 43,97 y 45,03 μm , respectivamente.

Aunque solo se encontraron diferencias significativas en dos de los caracteres morfométricos externos evaluados entre los morfotipos en los análisis y se muestra un solapamiento de los datos en los cinco caracteres restantes, se puede observar diferencias en la abundancia de los morfotipos en las localidades (Tabla 1-9). Los morfotipos I, II y IV se encuentran presentes en las cuatro localidades, Campoalegre, Neiva, Garzón y Tarqui. El morfotipo I, es el más abundante (112 individuos) con 81 individuos en la localidad de Tarqui y 16 en Neiva, en Campoalegre presenta el mismo número de individuos que el

morfotipo V (8). Por su parte, el morfotipo III sólo se encuentra en la localidad de Tarqui (22), respectivamente. El morfotipo II es el segundo morfotipo más abundante con 109 individuos en total. Los valores altos de abundancia de los morfotipos se presentan en la localidad de Tarqui, ya que es la localidad con mayor presencia de *Dalbulus maidis*. Por otro lado, se observa un mayor número de hembras que de machos, 179 y 167, respectivamente. Además, a nivel de genitalia, se pudieron determinar diferencias entre los morfotipos, tanto con las estructuras de los machos como de las hembras.

Tabla 1-9: Abundancia de los individuos de *Dalbulus maidis* por localidad y morfotipo en poblaciones del departamento del Huila.

Localidad	Morfotipo	Individuos	Hembras	Machos
Campoalegre	I	8	6	2
	II	8	4	4
	IV	3	2	1
Neiva	I	18	13	5
	II	15	9	6
	IV	14	9	5
Garzón	I	5	2	3
	II	13	4	9
	IV	10	6	4
Tarqui	I	81	33	48
	II	73	45	28
	III	22	8	14
	IV	74	36	38
Total		346	179	167

5.2.6 Evaluación de los individuos por sexo

En las observaciones entre machos y hembras, se encontró que las hembras presentan la long_tot mayor (3,98 mm); los machos tienen una longitud promedio de 3,69 mm. Además, la long_ant es de 0,70 mm en promedio para hembras y machos de 0,71 mm (Tabla 1-10). La longitud antenal, tiene un rango de 0,47 a 0,94 mm en los machos y las hembras, pero las hembras tienden a presentar valores un poco más bajos que los machos (Tabla 1-10). Los caracteres de diámetro de mancha ocelar y longitud de la cabeza, presentan el mismo promedio entre machos y hembras, 0,10 y 0,31 mm, respectivamente.

Tabla 1-10: Medidas resumen de los siete caracteres morfométricos evaluados en machos y hembras de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila. **D.E:** desviación estándar, **C.V:** coeficiente de variación.

SEXO	VARIABLE	N	MEDIA	D.E.	C.V.	MIN	MÁX
HEMBRA	Long total	72	3,98	0,23	06,13	3,32	4,11
HEMBRA	Long antenal	72	0,70	0,10	14,89	0,47	0,90
HEMBRA	Dia man oce	72	0,10	0,01	11,67	0,08	0,12
HEMBRA	Long ala der	72	3,38	0,23	06,76	2,74	3,95
HEMBRA	Long ala izq	72	3,41	0,23	06,85	2,85	3,98
HEMBRA	Long cabeza	72	0,31	0,05	14,66	0,21	0,40
HEMBRA	Dist de ojos	72	0,50	0,06	12,29	0,36	0,63
MACHO	Long total	58	3,69	0,21	05,65	3,30	4,24
MACHO	Long antenal	58	0,71	0,10	14,16	0,50	0,94
MACHO	Dia man oce	58	0,10	0,01	13,76	0,07	0,12
MACHO	Long ala der	58	3,32	0,23	06,94	2,79	3,75
MACHO	Long ala izq	58	3,34	0,23	06,87	2,82	3,72
MACHO	Long cabeza	58	0,31	0,04	12,36	0,23	0,40
MACHO	Dist de ojos	58	0,49	0,05	11,14	0,35	0,61

En la comparación entre machos y hembras, no se encontraron diferencias significativas en seis caracteres, la distancia entre los ojos es en promedio de 0,49 mm en las hembras y 0,50 mm en los machos; la longitud del ala derecha esta entre 3,34 y 3,37 promedio; mientras el ala izquierda va de 3,36 a 3,40 mm más o menos (Tabla 1-11).

Tabla 1-11: Análisis de varianza con prueba de LSD-Fisher de siete caracteres morfométricos de machos y hembras de poblaciones de *Dalbulus maidis* de cuatro localidades del departamento del Huila.

LOCALIDAD	VARIABLE	MEDIA	LDS-FISHER
HEMBRA	Long antenal	0,70	A
MACHO	Long antenal	0,72	A
HEMBRA	Dia man oce	0,10	A
MACHO	Dia man oce	0,10	A
HEMBRA	Long ala der	3,34	A
MACHO	Long ala der	3,37	A
HEMBRA	Long ala izq	3,36	A
MACHO	Long ala izq	3,40	A
HEMBRA	Long cabeza	0,31	A
MACHO	Long cabeza	0,31	A
HEMBRA	Dist de ojos	0,49	A
MACHO	Dist de ojos	0,50	A
HEMBRA	Long total	3,96	B
MACHO	Long total	3,71	A

La longitud total muestra diferencias significativas entre los machos y las hembras, siendo más grandes las hembras en general (Tabla 1-11), el promedio de longitud es de 3,71 mm para los machos y 3,96 para las hembras.

5.2.7 Análisis factorial para datos mixtos

Para la generación del clúster, se realizó el análisis factorial de datos mixtos, tomando en cuenta los siete caracteres morfológicos long_ant, long_tot, long_cab, dis_ojo, long_ader, long_aizq y dia_man; además, del sexo, localidad y morfotipo, para determinar los caracteres que permitan generar una posible separación de las poblaciones en subgrupos. El análisis del mapa de factores, mostró una separación de los individuos en dos grupos (Figura 1-14). La mayoría de los individuos no presentan mayor variación entre ellos en las características evaluadas por lo que se concentran aglomerados en el centro de la gráfica; sin embargo, los individuos del 101 al 109, que corresponden al morfotipo III, se separan de los demás presentando diferencias con respecto a los demás.

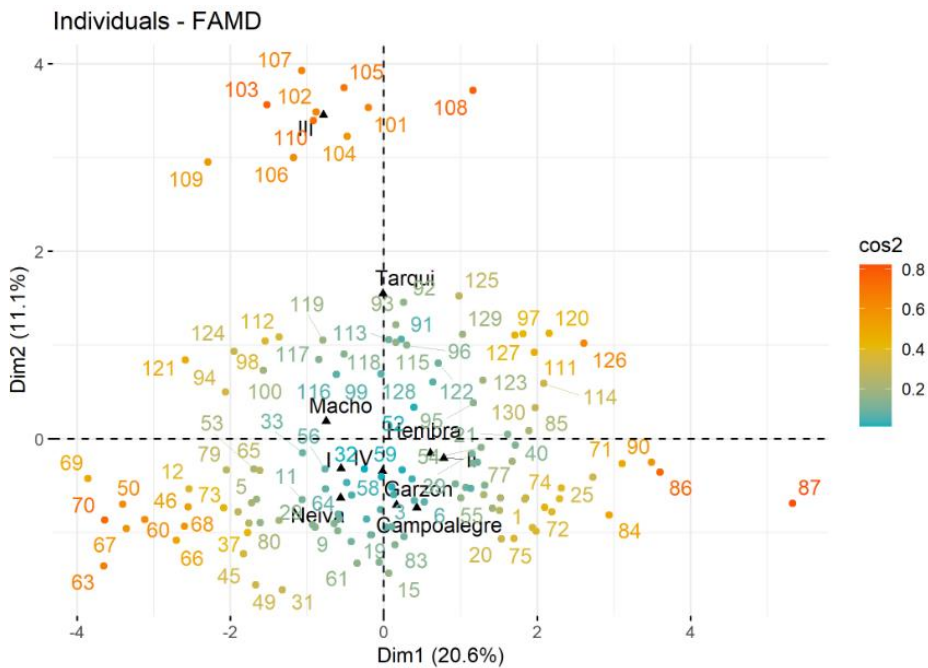
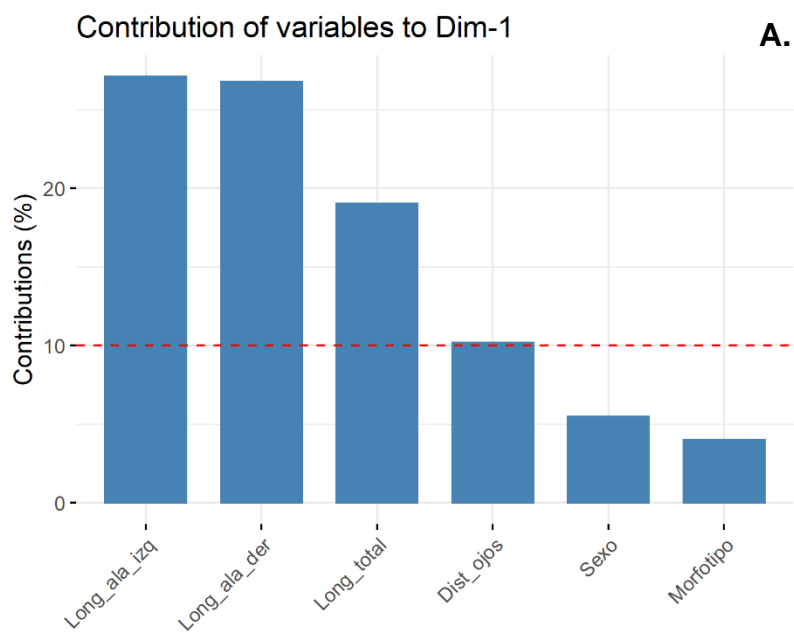


Figura 1-14: Mapa de factores análisis factorial de datos mixtos generado a partir de los análisis en R de los individuos por localidad, morfotipo y sexo de poblaciones de *Dalbulus* maidis del departamento del Huila.

El análisis demostró que los caracteres presentaban variaciones y correlaciones en tres dimensiones (Figura 1-15). Los caracteres long_aizq, long_ader, se representan en la

dimensión uno con una contribución de alrededor el 27%, long_tot tiene una contribución de 19%, dis_ojo (10%), sexo y morfotipo, más o menos 5% (Figura 1-15A). En la dimensión dos, se representa con mayor contribución los caracteres de localidad y morfotipo con más del 40% (Figura 1-15B). Los caracteres long_cab y sexo presentan mayor contribución en la dimensión tres con alrededor del 20%, mientras que, dis_ojo, morfotipo y long_tot tienen contribuciones cercanas al 10% en esta dimensión (Figura 1-15C).



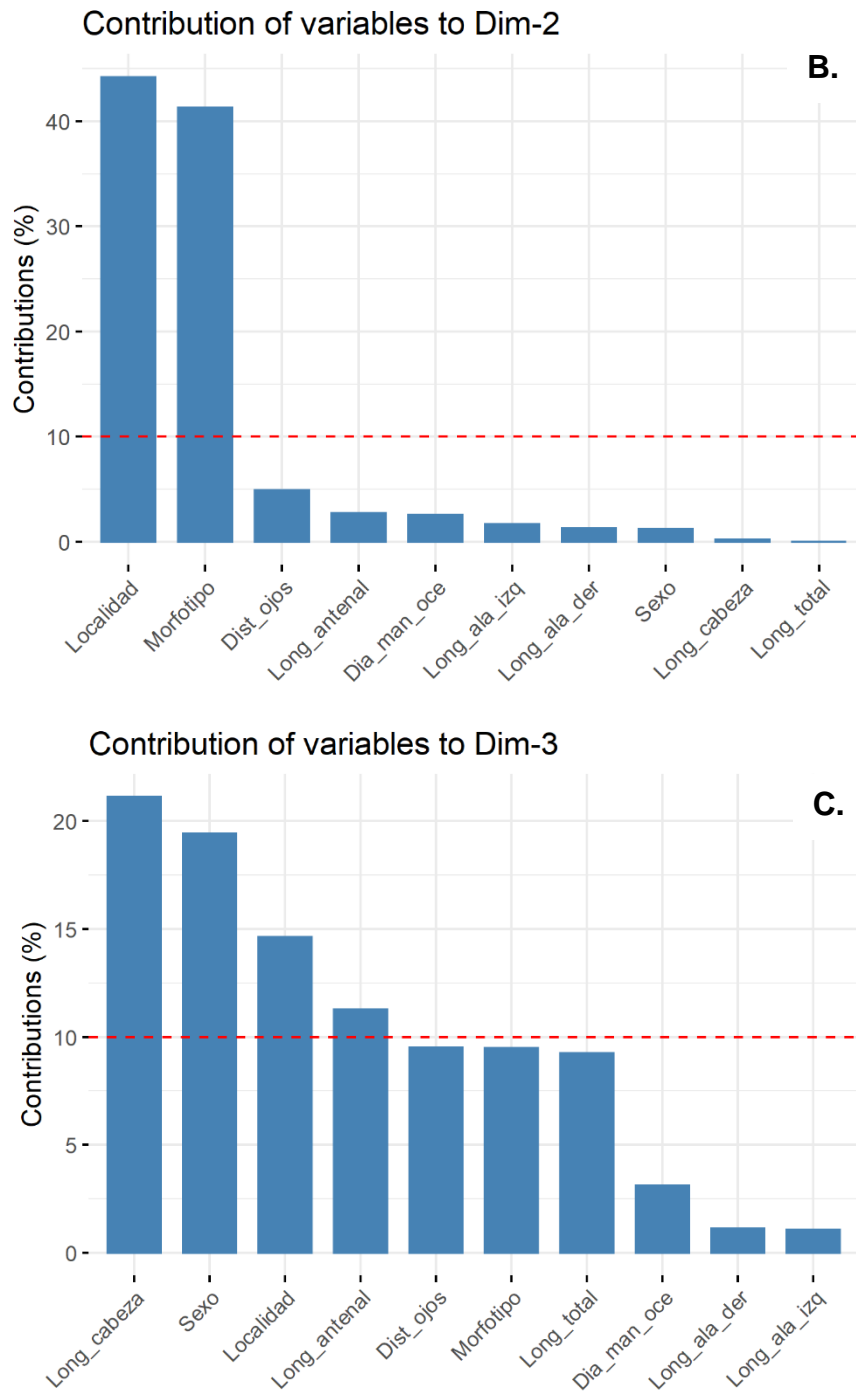


Figura 1-15: Contribuciones de las variables cuantitativas y cualitativas en las dimensiones uno, dos y tres para el análisis factorial de datos mixtos. **A.** Dimensión uno. **B.** Dimensión dos. **C.** Dimensión tres.

El círculo de correlación de los caracteres dia_man, long_tot, long_cab, long_ader, long_aizq, dis_ojo y long_ant, demuestra la interacción de estos caracteres, observando como se explicó anteriormente, que los caracteres long_tot, long_ader y long_aizq están en la dimensión uno principalmente, long_ant y long_cab están en la dimensión tres. Dis_ojo interactúa en las dimensiones uno y tres (Figura 1- 16).

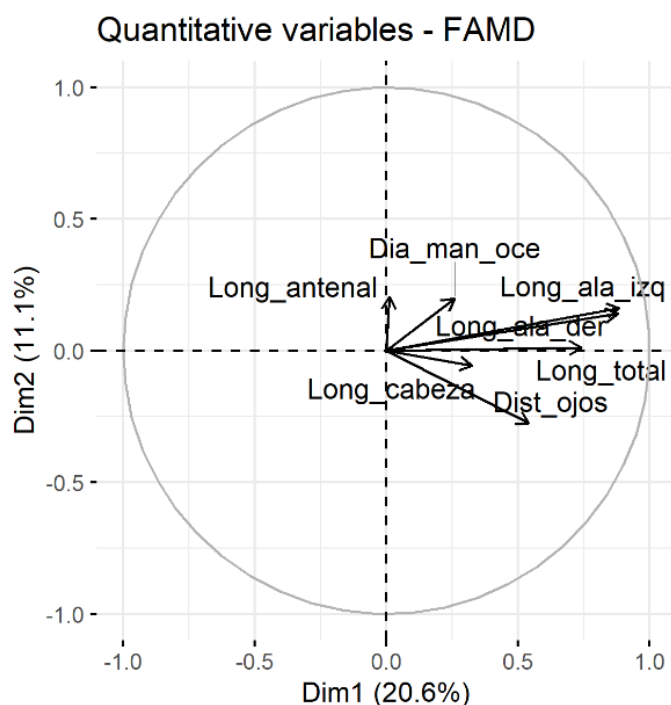


Figura 1- 16: Circulo de correlación de las variables cuantitativas en el análisis factorial de datos mixtos generado a partir de los análisis en R de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila.

A partir del promedio de los siete caracteres morfométricos de cada morfotipo por localidad, el clúster realizó la separación de los individuos en cuatro subgrupos (

Figura 1-17). De esta manera, en el dendograma se encuentran el morfotipo I de Garzón y IV de Neiva, como el grupo más separado de los demás individuos; los morfotipos II y IV de Campoalegre y II de Tarqui presentan mayor similitud entre los caracteres, por lo que se agrupan en un clado. Los morfotipos IV de Garzón, I de Tarqui y Neiva y IV de Tarqui, conforman el siguiente clado del dendograma; y finalmente, los morfotipos III de Tarqui, I de Campoalegre y II de Neiva y Garzón se agrupan en el cuarto clado del dendograma.

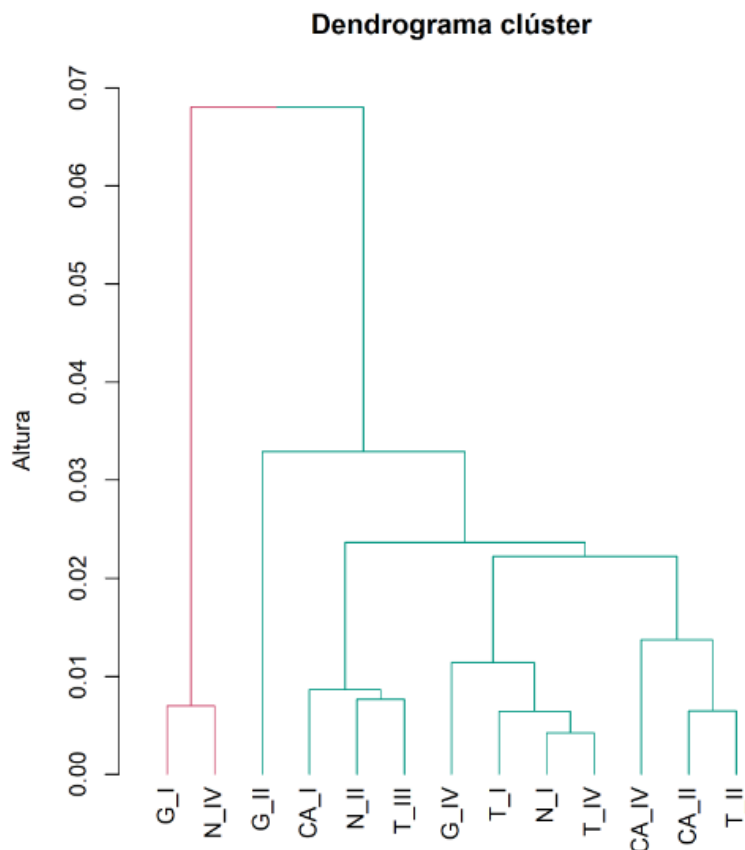


Figura 1-17: Dendrograma de separación de los individuos generado a partir de los análisis en R por localidad y morfotipo de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila.

5.3 Discusión

5.3.1 Abundancia *Dalbulus maidis*

Existen muchos factores ambientales que pueden afectar la abundancia de *D. maidis*, como la disponibilidad de alimento, microclima del cultivo, presencia de enemigos naturales y eventos de migración de individuos (Meneses *et al.*, 2016). Un factor a tener en cuenta en la abundancia de individuos es la época de muestreo, ya que las condiciones ambientales que pueden afectar las poblaciones varían en el tiempo. En Brasil, se observaron variaciones en la abundancia de especies de Cicadellidae en los años 2005,

2006 y 2007 en 48 localidades (Oliveira *et al.*, 2013). *D. maidis*, ha mostrado cambios en la abundancia de las poblaciones considerando las temporadas del cultivo, presentando un aumento de individuos en los meses de la estación seca en comparación con la abundancia en la época de lluvia (Ávila y Arce, 2008; Meneses *et al.*, 2016). La etapa fenológica del cultivo de maíz, es otro factor que influye en la abundancia y distribución de *D. maidis* en el cultivo. Oliveira *et al.*, (2015), observó un aumento de las poblaciones de *D. maidis* en el primer muestreo hasta el tercero, en la etapa de floración; además, la distribución de *D. maidis* en la planta de maíz, es influenciada por el estado de desarrollo de la planta (Meneses *et al.*, 2016; Todd *et al.*, 1991). A su vez, *D. maidis* posee una alta capacidad de migración y abandono de los cultivos cuando el maíz entra en etapa de senescencia, colonizando campos cercanos recién plantados, estrategias que favorecen su supervivencia (Oliveira *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2013).

Se conoce que las temperaturas altas y clima seco, generan un acortamiento en el ciclo de vida, lo que genera una mayor presencia de individuos (Varon y Sarria, 2007). Bajo este concepto, se esperaría que, en zonas como Neiva y Campoalegre, se presente una abundancia alta de individuos; sin embargo, se debe considerar que, aunque, las temperaturas altas aceleran los procesos de desarrollo de *D. maidis* también afectan la supervivencia y la fecundidad de los adultos, factores que también influyen en la abundancia de los individuos de las poblaciones. En temperaturas como las presentes en las localidades de Neiva y Campoalegre (26 a 28 °C) (Tabla 1-3), estudios como el de Madden *et al.*, (1986) han demostrado efectos negativos en parámetros demográficos como la tasa de supervivencia, la fecundidad, tasa neta de reproducción y tasa intrínseca de crecimiento de *D. maidis*, generando una disminución poblacional. Por lo que, la baja abundancia de las poblaciones de *D. maidis* en las zonas de Neiva y Campoalegre, se puede atribuir a la influencia de la temperatura en la dinámica poblacional. A su vez, se ha observado que el rango de 22 a 24 °C, temperaturas de la zona climática de Tarqui y Campoalegre, se presenta la mayor tasa de supervivencia y fecundidad de *D. maidis* por lo que se consideran las temperaturas óptimas para el desarrollo de las poblaciones (Madden *et al.*, 1986).

5.3.2 Morfotipos determinados

Se ha reportado que características como la pigmentación y el tamaño de los saltahojas adultos pueden ser influenciados por los factores ambientales, como temperatura, fotoperiodo y condiciones de la planta hospedante, que se presentan en los estados inmaduros de los individuos (Harrison, 1980). Por tal razón, se pueden observar las diferencias en las coloraciones y manchas en los morfotipos encontrados en las poblaciones del Huila. Estas diferencias morfológicas se pueden presentar, además, como formas adaptativas a las condiciones del medio ambiente, en algunos casos ayudan en la inactividad, la termorregulación y la reproducción, entre otras (Tauber *et al.*, 1986).

5.3.3 Evaluación de individuos por localidades

En los insectos se han realizado diversas investigaciones que demuestran que factores como la temperatura, la latitud y la elevación afectan la morfología y el desarrollo de las especies (Hawkins y Lawton, 1995; Hodkinson, 2005; Krasnov *et al.*, 1996; Rodríguez-Zabala *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2000). En especies de cicadélidos se han reportado que factores como la temperatura genera variaciones morfológicas en adultos de *Empoasca fabae* y *Graminella nigrifrons* (Larsen *et al.*, 1990; Simonet y Pienkowski, 1980). Larsen y Nault (1994), en una investigación con poblaciones mexicanas de *D. maidis* observaron cambios en tamaño, peso y pigmentación de acuerdo a bajas temperaturas; además, de variaciones morfológicas en las poblaciones de acuerdo a la época del año. En Brasil, se ha evaluado la influencia de la latitud y la elevación en poblaciones de *D. maidis*, encontrando diferencias morfológicas que se asociaron con variaciones en estos dos factores de los sitios evaluados, observando un mayor peso corporal, mayor tamaño y pigmentación en elevaciones más altas; así como, la separación de las poblaciones en dos grupos según el sitio de muestreo, en poblaciones de la región noreste, y, poblaciones de la región centro-sur (Oliveira *et al.*, 2004). Además de causar variaciones morfológicas, se ha visto que factores como la temperatura puede afectar también la sobrevivencia y fecundidad de especies como *D. maidis* (Madden *et al.*, 1986). Aunque en las poblaciones de *D. maidis* evaluadas de las cuatro localidades del Huila, se encontraron diferencias significativas en la longitud de la cabeza y la distancia entre los ojos, se puede observar que los valores promedio para los caracteres son cercanos, mostrando poca variación en

los caracteres, ya que Neiva y Tarqui presentan un promedio de 0,29 y 0,31 mm de long_cab, respectivamente; mientras que, Garzón y Campoalegre miden en promedio 0,32 mm (Tabla 1-5). Además, los caracteres long_ant, long_ader, long_aizq, long_tot y dia_man, no presentaron diferencias significativas entre ellos. Teniendo en cuenta que los factores ambientales que se han reportado como factores que afectan las variaciones morfológicas (temperatura, elevación y latitud), no presentan grandes variaciones en las poblaciones de Neiva, Garzón, Campoalegre y Tarqui (Tabla 1-3), se considera que al momento de evaluar las diferencias entre poblaciones colombianas de *D. maidis* de diferentes localidades, se deben tener en cuenta estos factores ambientales.

5.3.4 Evaluación de los individuos por morfotipo

La longitud antenal se midió debido a que en el género *Dalbulus* el tercer segmento antenal es largo y este carácter es una excepción en la familia Cicadellidae, ya que las demás especies en esta familia presentan un flagelo antenal corto (Knight y Webb, 1993; Triplehorn y Jhonson, 2005). Sin embargo, no se encuentra un reporte del tamaño de las antenas en *D. maidis*, por lo que el rango de longitud de un carácter diagnóstico a nivel de género puede ser un poco amplio y no mostrar una diferencia a nivel de morfotipos. El diámetro de la mancha ocelar, es un carácter relevante en *D. maidis*, porque se define en esta especie como dos veces el tamaño de los ocelos (Knight y Webb, 1993; Nielson, 1975; Pinedo-Escatel y Blanco-Rodríguez, 2016). Los ocelos de *D. maidis* son muy pequeños, por lo que las manchas ocelares presentan un tamaño acorde al carácter de la especie, pero se puede ver que no permite ver diferencias a nivel de morfotipos en la especie. La distancia entre los ojos compuestos y la longitud de la cabeza, son caracteres que se han evaluado en otros estudios para la observación de variaciones morfológicas (polimorfismos) dentro de la especie *D. maidis* (Oliveira *et al.*, 2004). Aquí, se presentaron diferencias significativas entre los morfotipos con el carácter de distancia entre los ojos, el morfotipo III presenta el valor más bajo para esa característica, 0,45 mm que lo separa de los otros morfotipos (Tabla 1-7). Por otro lado, el carácter longitud de la cabeza no mostro diferencias significativas entre los morfotipos, ya que los valores presentan un rango similar entre los individuos (Tabla 1-7). La longitud de las alas anteriores también se ha usado para la determinación de variaciones morfológicas entre poblaciones de *D. maidis*. Como en un estudio de poblaciones brasileñas que permitió separar las localidades evaluadas

en dos grupos (Oliveira *et al.*, 2004). Sin embargo, en los análisis de los morfotipos de las poblaciones no mostraron diferencias significativas para este carácter, aunque se observa que el ala izquierda es un poco más larga que el ala derecha (Tabla 1-7).

La longitud total reportada para la especie está entre 3,5 y 4,0 mm, rango en el que se encuentran los cuatro morfotipos (Oliveira *et al.*, 2004; Larsen y Nault, 1994; Nielson, 1975). Los individuos del grupo externo (morfotipo V), aunque presentan los caracteres externos con los que se determinó la especie *D. maidis*, la gran diferencia con los demás morfotipos generó incertidumbre en la determinación de los individuos; sin embargo, la baja cantidad de individuos y la falta de especímenes macho en este morfotipo, fueron un obstáculo para la clarificación de la identidad taxonómica a partir de caracteres morfológicos. La colaboración del experto en la determinación demostró que los individuos podrían pertenecer a otro grupo de la familia Cicadellidae, en un género que no está reportado para Colombia (CABI, 2020).

5.3.5 Evaluación de los individuos por sexo

Las diferencias en la variable long_tot se puede apreciar entre los machos y las hembras de *D. maidis*. En la longitud total del cuerpo se observa que las hembras tienden a ser un poco más grandes que los machos como se ha reportado anteriormente en varios estudios de *D. maidis* (Oliveira *et al.*, 2004; Larsen y Nault, 1994; Nielson, 1975; Triplehorn y Nault, 1985), con una mayor frecuencia de hembras de un tamaño entre los 3,70 y 4,70 mm; mientras que los machos oscilan principalmente entre los 3,50 y 3,70 mm. Aunque la mayoría de los machos están en el rango de tamaño de 3,50 a 3,70 mm, la dispersión total de los datos muestra un rango desde 3,40 a 4,00 mm que abarca el rango definido por Nielson (1975), que describe que los machos de *D. maidis* tienen una longitud de 3,50 a 4,00 mm; mientras que las hembras tienen una longitud de 4,00 a 4,10 mm, que también es coincidente con estos resultados, además, de hembras de mayor tamaño, ya que se encontraron individuos con valores cercanos a los 4,50 mm (Tabla 1-11). En los insectos por lo general, las hembras son más grandes que los machos (Triplehorn y Jhonson, 2005), en *D. maidis* la diferencia en tamaño entre machos y hembras se ha relacionado con la tasa de desarrollo de los individuos, ya que, las hembras tienen un desarrollo más lento, con mayor tiempo para la alimentación y el crecimiento, que los machos (Oliveira *et al.*,

2004); además, a esta característica, se le ha dado una explicación adaptativa, ya que las hembras son las encargadas de la cría y la postura de los huevos, al ser de mayor tamaño aumentan su probabilidad de reproducción y cría con respecto a hembras más pequeñas (Larsen y Nault, 1994). El diámetro de la mancha ocelar y la longitud antenal, la longitud de la cabeza, distancia entre los ojos, longitud del ala derecha e izquierda, no son caracteres diferenciales entre machos y hembras.

6. Capítulo 2: Correlación entre presencia de Mollicutes en morfotipos de poblaciones de *Dalbulus maidis* colectadas en el departamento del Huila.

6.1 Metodología

6.1.1 Extracción de ADN insectil

Para las detecciones de los Mollicutes (MBSP y CSS) en las poblaciones de *D. maidis* se seleccionaron, de acuerdo a la cantidad de especímenes disponibles por morfotipo un mínimo de 7 individuos del morfotipo III que corresponde al morfotipo menos abundante y un máximo de 10 especímenes por cada uno de los morfotipos de cada localidad, a partir de los individuos con todos los caracteres morfológicos determinados en el capítulo 1, a excepción del morfotipo V, perteneciente a otro género de la familia Cicadellidae. La extracción de ADN se realizó basado en el protocolo de extracción de Chen y colaboradores (2010), con modificaciones. Se utilizó un individuo para cada extracción. La maceración de los insectos se realizó mecánicamente con pistilo estéril y 500 µl de buffer de extracción SDS (Tris: 200 mM, EDTA: 25 mM, NaCl: 250 mM y SDS: 0,5% p/v). Posteriormente para completar el proceso, se transfirieron las muestras a tubos Eppendorf de 1,5 ml, adicionando 0,05 g aproximadamente de microesferas de vidrio y fueron llevados a agitación a 200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalizado el tiempo de agitación, a cada tubo se le adicionó 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se llevó a incubación a 50 °C toda la noche para completar la lisis celular y de proteínas. Una vez terminado el tiempo de incubación se adicionaron 500 µl de cloroformo isoamil alcohol (24:1) por tubo y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a una temperatura de 4 a 8 °C. Se transfirió la

fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío (almacenado a -20°C), y se llevaron las muestras a incubación a -20°C por una hora, para luego centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado del pellet con 500 µl de etanol al 70% a 12000 rpm por 3 minutos. Completado el proceso, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet para resuspender las muestras en 25 µl de agua ultrapura. Finalmente, se adicionaron 2 µl de RNAsa A (10 mg/ml) y se incubaron las muestras por una hora en baño serológico a 37°C.

La calidad y concentración (≥ 30 ng/µl) del ADN extraído se verificó mediante cuantificación con Nanodrop, para lo cual se usó 1 µl de agua ultra pura como blanco y 1 µl de muestra para la medición de las relaciones de absorbancia 260/280 (≈ 1.8) y 260/230 (≈ 1.8).

6.1.2 Detecciones del *Spiroplasma kunkelii* (CSS)

La detección del patógeno CSS en los individuos de *D. maidis*, se realizó mediante PCR convencional o de punto final. La PCR se realizó siguiendo las condiciones de Park y colaboradores (2011), empleando las siguientes concentraciones finales: solución buffer; 1X, MgCl₂; 1,5 mM, mezcla de dNTPs; 0,25 mM, cebador directo (CSSF1, 5'-CTGTAGCGGCAAAAAGATGTA-3') y cebador indirecto (CSSR1 5'-AGTAGTTGCGGCTGAATAGTT-3') 0,2 µM cada uno, que amplifican una región del gen de la espiralina de *S. kunkelii*, BSA; 0,1 µg/µl y Taq polimerasa 1U. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo a 95°C por dos minutos, 35 ciclos a 95 °C por un minuto, 60°C por dos minutos y 72 °C por tres minutos, un ciclo a 72°C por 10 minutos.

La detección positiva se corroboró mediante corrido electroforético en gel de agarosa al 1,2% por 30 minutos a 90 voltios, cargando 3 µl del producto de PCR más el buffer de carga y el marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles de agarosa fueron entonces visualizados con el documentador Enduro GSII. Se consideraron muestras positivas para CSS, las muestras en las que se visualizó una banda de amplificación de 500 pb del gen de la espiralina (Figura 2-1).

Como control positivo, se empleó ADN total de una muestra positiva previamente enviada a confirmación por secuenciación Sanger en los dos sentidos.

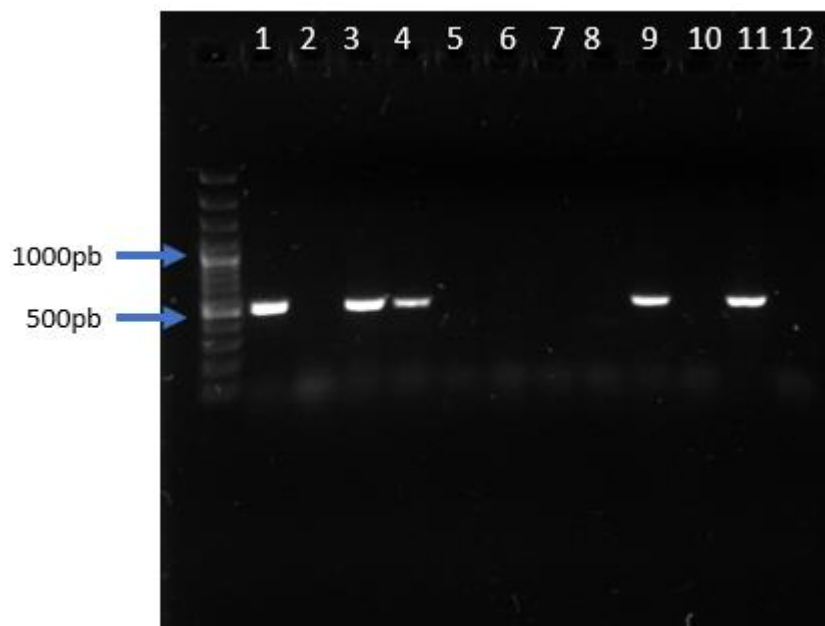


Figura 2-1: Visualización en gel de agarosa de los productos de la PCR realizada para detección del patógeno CSS en individuos de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila (pozos del 1 al 10: muestras de ADN de *D. maidis*, 11: control positivo, 12: blanco PCR).

6.1.3 Detecciones del fitoplasma (MBSP)

La detección del patógeno MBS en los cuatro morfotipos de *D. maidis*, se realizó mediante PCR convencional o de punto final. La PCR se realizó siguiendo las condiciones de Harrison y colaboradores (1996), empleando las siguientes concentraciones finales: solución buffer; 1X, MgCl₂; 2,5 mM, mezcla de dNTPs; 0,25 mM, cebador directo (MBS-F1 5'-AATGTCTGAACTAACAGGCGG-3') y cebador indirecto (MBS-R1 5'-TTGGCGATTTGGTTTTGG-3') 0,2 μM cada uno, que amplifican una región del gen 16Srl-B específica para el fitoplasma MBSP, BSA; 0,1 μg/μl, Taq polimerasa 1U. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo a 94°C por un minuto, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos y 72 °C por un minuto, un ciclo a 72°C por 10 minutos.

La detección positiva se corroboró mediante corrido electroforético en gel de agarosa al 1,5% por 30 minutos a 90 voltios, cargando 10 μl del producto de PCR más el buffer de carga y el marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles de agarosa fueron visualizados con el documentador Enduro GSII. Se consideraron muestras positivas para

MBS, las muestras en las que se visualizó una banda de amplificación de 740 pb del gen 16Srl-B del ARN ribosomal (ARNr) (Figura 2-2).

Como control positivo del método se empleó la región diagnóstica clonada en el plásmido TOPO TA, suministrado por los laboratorios de la Universidad Militar Nueva Granada.

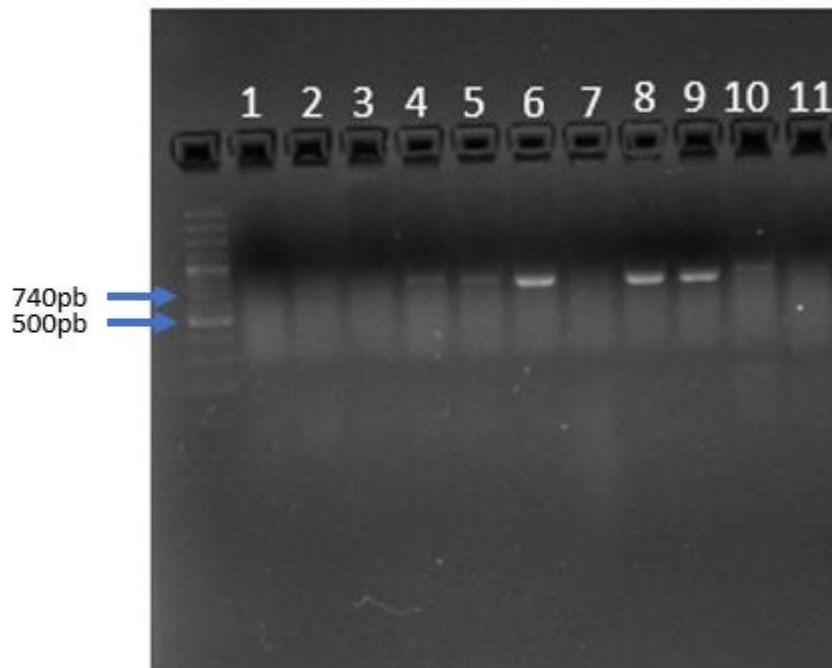


Figura 2-2: Visualización en gel de agarosa de los productos de la PCR realizada para detección del patógeno MBSP en individuos de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila (pozos del 1 al 10: muestras de ADN de *D. maidis*, 11: control positivo, 12: blanco PCR).

6.1.4 Estadística descriptiva, análisis de frecuencia de CSS y MBSP en *D. maidis*.

Se determinó la frecuencia total de los patógenos CSS y MBSP determinando el número de muestras positivas para cada patógeno sobre el número total de muestras evaluadas, para determinar el porcentaje de individuos con presencia del CSS y/o el MBSP. Se realizó un análisis de frecuencia de detecciones mixtas e individuales, se evaluó la presencia de los Mollicutes CSS y MBSP con respecto a la abundancia del vector *D. maidis* en cada localidad. Se determinó el porcentaje de infección de los morfotipos, relacionando el

número de individuos por morfotipo y la presencia de cada Mollicute; así como la dominancia de los patógenos en los morfotipos. Además, se determinó la frecuencia de coinfecciones en la población total de *D. maidis* y en cada morfotipo.

6.2 Resultados

6.2.1 Análisis de coinfecciones e infecciones individuales

La detección de CSS y MBS, se realizó a partir del ADN de un total de 110 individuos de *D. maidis*, de los cuales 37 fueron positivos para CSS, correspondiendo al 34% de la población; 17 fueron positivos para MBS (15%) y solamente 9 fueron positivos para CSS y MBS, evidenciando 8% de coinfección en el total de los individuos evaluados (Figura 2- 3).

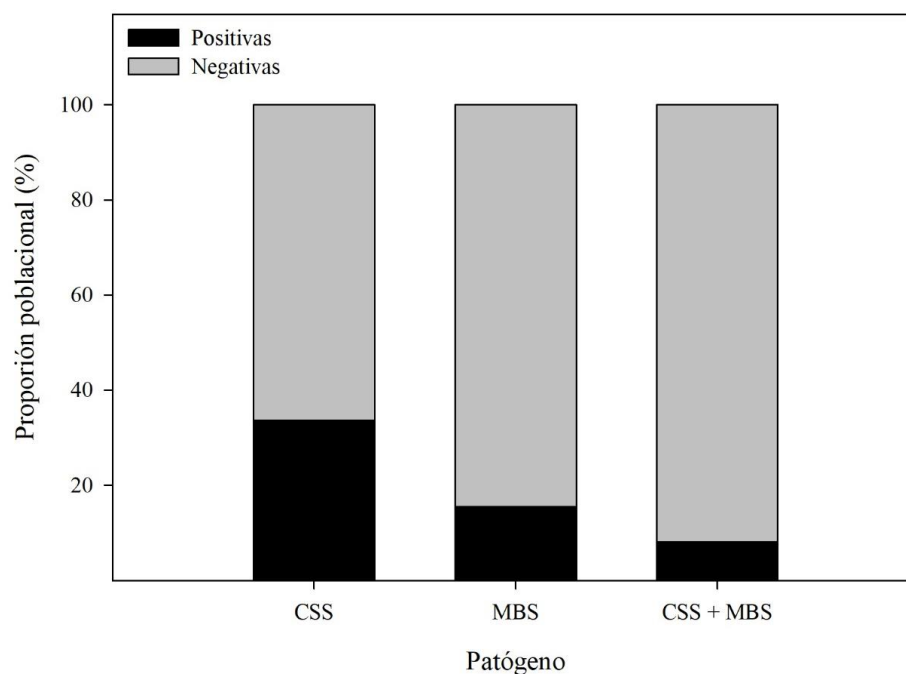


Figura 2- 3: Detecciones de CSS, MBSP y CSS + MBSP en *Dalbulus maidis* provenientes de las cuatro localidades del departamento del Huila.

6.2.2 Detecciones individuales de CSS

Las detecciones de CSS en los *D. maidis* recolectados en las cuatro localidades del departamento del Huila, independientemente del morfotipo, fueron iguales o superiores al

30% (Figura 2-4). La localidad con mayor porcentaje de individuos infectados con CSS fue Neiva, con un 39% de las muestras de individuos evaluadas de la población, de 23 individuos evaluados de esta localidad 9 fueron positivos para CSS. Campoalegre, es la segunda localidad con mayor porcentaje de infección (37%), en 27 individuos de la localidad 10 fueron positivos. Por su parte, Garzón y Tarqui tuvieron un porcentaje de infección del 30%, ya que, de 30 individuos analizados por cada localidad, 9 dieron positivo.

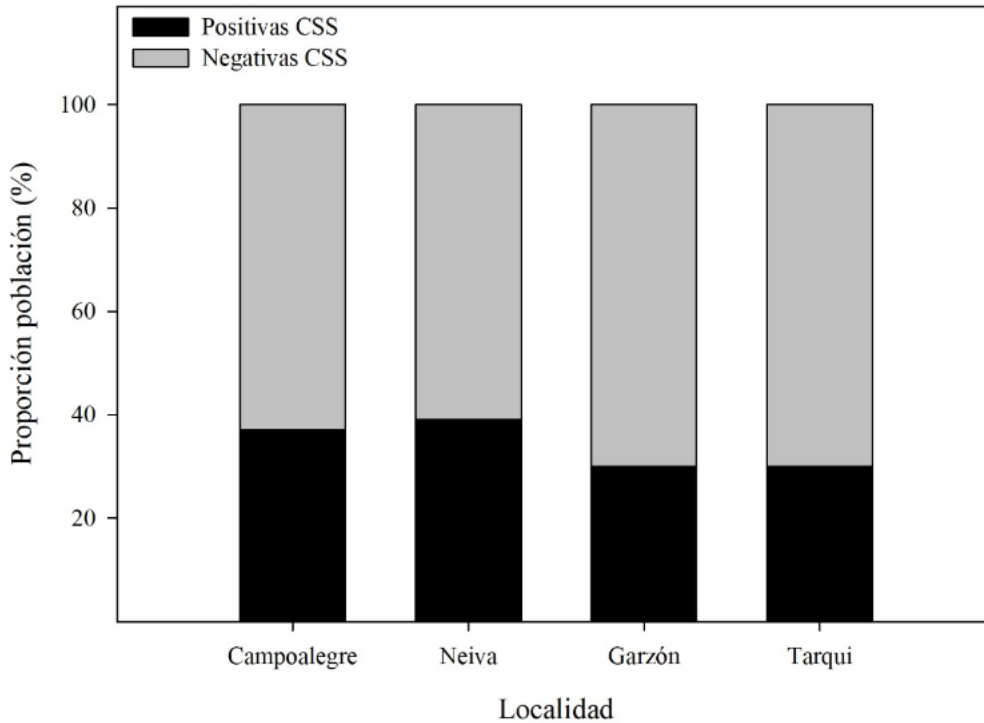


Figura 2-4: Detecciones del patógeno CSS en *Dalbulus maidis* recolectados de las cuatro localidades del departamento del Huila.

En las detecciones del CSS por morfotipo se observó que el morfotipo con mayor porcentaje de infección fue el morfotipo III, con un porcentaje de 57% (Figura 2-5). Este morfotipo es el de menor abundancia y distribución, ya que solo se encuentra en la localidad de Tarqui, por lo que, para las detecciones de los patógenos, fue el morfotipo con menos individuos evaluados, así, de siete individuos evaluados, cuatro dieron positivo para CSS. Los morfotipos I y II presentaron porcentajes de infección similares, 32 y 35%, respectivamente; de 31 individuos analizados del morfotipo I 10 fueron positivos, mientras que, de 37 individuos analizados del

morfotipo II 13 fueron positivos para CSS. El morfotipo IV presentó el menor porcentaje de detecciones positivas, de 35 individuos evaluados 10 fueron positivos, correspondiendo al 29% del morfotipo.

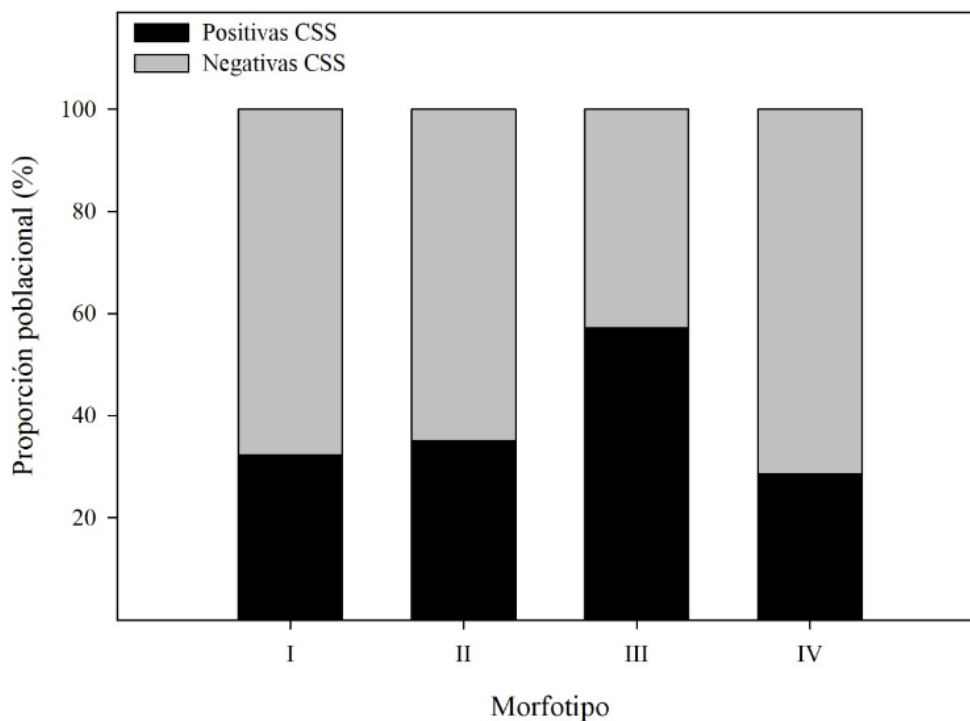


Figura 2-5: Detecciones del patógeno CSS en morfotipos de *Dalbulus maidis* caracterizados en el departamento del Huila.

6.2.3 Detecciones individuales de MBSP

El MBSP mostró un porcentaje de infección menor al CSS, a excepción de la localidad Garzón, en la cual, el porcentaje de detecciones positivas para MBSP fue igual al CSS, con 30% de infección (Figura 2-6). Campoalegre, presentó un porcentaje de detecciones del 15%, con cuatro individuos infectados de 27 evaluados. Por su parte Neiva, tuvo un porcentaje de infección del 9%, con solamente dos individuos positivos, Tarqui fue la población con menor porcentaje de infección (7%), ya que, de 30 individuos analizados solo dos fueron positivos para MBSP.

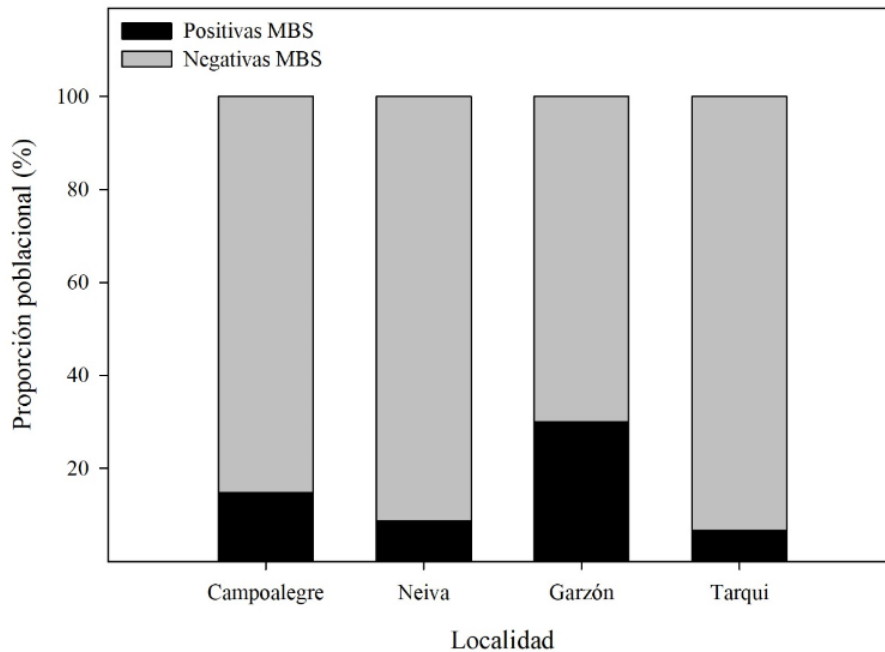


Figura 2-6: Detecciones del patógeno MBS en individuos de *Dalbulus maidis* recolectados en cuatro localidades del departamento del Huila.

En la evaluación por morfotipos, el MBSP presentó el mayor porcentaje de detecciones en el morfotipo II con 19% de los individuos infectados. El morfotipo III mostró una infección del 0% en sus individuos, de los siete individuos evaluados en ninguno se observó banda de amplificación de MBSP. El morfotipo IV, a diferencia de las detecciones de CSS presentó el segundo porcentaje más alto con 17% de infección, con seis individuos infectados de 35 analizados. El morfotipo I presentó un porcentaje de infección del 13%, pues, de los 37 individuos evaluados cuatro fueron positivos para MBSP.

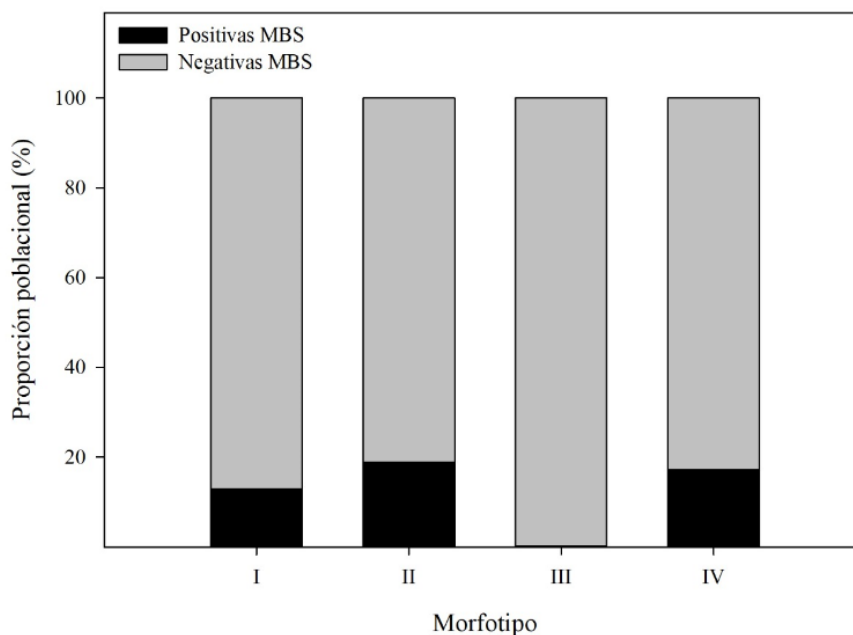


Figura 2-7: Detecciones del patógeno MBSP en individuos de *Dalbulus maidis* separados por su procedencia por localidad del departamento del Huila.

6.3 Discusión

Las detecciones generales de los patógenos en los individuos de *D. maidis*, mostraron que el patógeno CSS es el que infecta más frecuentemente a los insectos, ya que, el porcentaje de detecciones fue de más del doble con respecto al MBSP (Figura 2- 3). Los reportes de presencia del CSS en *D. maidis* muestran porcentajes de 4 a 10% (Markham y Alivizatos, 1983; Alivizatos y Markham, 1986; Moya-Raygoza *et al.*, 2002). En una muestra de la población de *D. maidis* del Huila de 110 individuos, un 34% se encontraron infectados con positivos para CSS. Para el caso del fitoplasma MBSP, su porcentaje de presencia en *D. maidis* fue similar al reportado en estudios previos, en donde se han encontrado valores desde 3% hasta 18% (Legrand y Power, 1994; Oliveira *et al.*, 2011). Las coinfecciones de *D. maidis* con ambos patógenos CSS y MBS, se presentan en menor grado que las infecciones de solo un patógeno, ya que, al compartir el vector, se presenta una competencia entre los patógenos para su desarrollo. La transmisión de ambos patógenos es condicionada por factores ambientales, además, del orden de adquisición de los patógenos (Oliveira *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2015).

6.3.1 Detecciones del CSS

Los porcentajes de presencia de CSS en *D. maidis* en las cuatro localidades evaluadas, estuvieron entre 30 y 39%. La estrecha relación adaptativa de este Mollicute con el vector, se relaciona posiblemente con el porcentaje de detección. Para la transmisión del CSS de una planta a otra, el espiroplasma debe atravesar el epitelio intestinal de *D. maidis*, llegar a la hemolinfa, cruzar las capas celulares de las glándulas salivales y así ser introducido en el floema de la planta con la saliva del saltahoja (Clark, 1984; Özbek *et al.*, 2003). El CSS ocupa un conjunto de estrategias para infectar *D. maidis*, por medio de las cuales el espiroplasma interactúa con varios tipos de células y tejidos; usa el citoplasma de las células epiteliales del intestino para moverse desde la luz intestinal al lado basal hacia la hemolinfa, donde se cree ocurre la mayor replicación del patógeno (Markham, 1983; Markham y Alvizatos, 1983; Clark, 1984; Alvizatos y Markham, 1986; Özbek *et al.*, 2003).

El espiroplasma CSS y el fitoplasma MBSP son bacterias Mollicutes que se caracterizan por la falta de pared celular; por lo que, el vector *D. maidis*, es el componente principal para el desarrollo y la replicación de estos patógenos (Oliveira *et al.*, 2002). Las poblaciones de *D. maidis* se adaptan a un amplio rango de temperatura (17 a 35°C); por tanto, el desarrollo permanente de los patógenos es limitado más por la presencia del vector que por la temperatura ambiental (Van Nieuwenhove *et al.*, 2016). Sin embargo, se conoce que la temperatura influye en el tiempo de latencia de los patógenos dentro del vector; a temperaturas que oscilan entre 25 y 29 °C, el período de latencia es de 17 a 23 días (Nault, 1980). Para el espiroplasma CSS, el rango de temperaturas de las localidades evaluadas (Tabla 1-3), son adecuadas para la adquisición y transmisión del patógeno, y podrían explicar los porcentajes de infestación de *D. maidis* superiores al 30% en todas las localidades (Figura 2-4), especialmente en Campoalegre y Neiva, que presentaron temperaturas un poco más altas, 26 – 28°C (Tabla 1-3).

Otro factor importante para la detección del espiroplasma, es el periodo de acceso a la adquisición del patógeno; muchos estudios han observado la infestación del espiroplasma CSS al vector, en los cuales se ha visto que a mayor tiempo de exposición del vector *D. maidis* a plantas infectadas con CSS, mayor es el porcentaje de adquisición. Canale *et al.*, (2018), observaron que la proporción de insectos transmisores de CSS aumentó de 4,3%,

a los nueve días después del inicio de la adquisición, hasta el máximo de 93% a los 22 días de exposición.

Revisando las detecciones del CSS por morfotipo, se observó que los porcentajes de infección son cercanos entre sí para los morfotipos I, II y IV, con valores de 29 a 35%. Sin embargo, el morfotipo III presentó un porcentaje de infección de 57%, así, la mitad de los individuos de este morfotipo presentaron el espiroplasma, aunque, la abundancia del morfotipo III no se podría comparar con la de los otros morfotipos, y para una comprobación del porcentaje de detección, se deberían hacer observaciones con un mayor número de individuos, lo que requeriría de remuestreos.

6.3.2 Detecciones de MBSP

Los fitoplasmas invaden las células intestinales de los insectos desde la luz intestinal y se acumulan en niveles elevados en el citoplasma celular del intestino, las glándulas salivales y otros órganos de los insectos (Sugio y Hogenhout, 2012). En el caso del fitoplasma MBSP, existen antecedentes de mayor influencia de la temperatura para su desarrollo, ya que necesita temperaturas más altas que las requeridas por el espiroplasma para la multiplicación (Oliveira *et al.*, 2007). También, se ha visto que en temperaturas entre los 25 y 29°C, el periodo de latencia del MBS oscila entre los 22 a los 28 días, y la mayor tasa de transmisión se da a 20 y 25°C (Moya-Raygoza y Nault, 1998). Aunque el fitoplasma se desarrolla mejor a temperaturas altas, también se conoce que el MBSP es más tolerante a bajas temperaturas de la temporada de invierno-primavera, prolongan el periodo de latencia del patógeno en el insecto vector (Sabato *et al.*, 2020). Como se observó en la localidad de Garzón, cuya temperatura oscila entre los 22 y 24°C, presenta una mayor presencia de MBSP, que se puede atribuir a su resistencia a bajas temperaturas (Figura 2-6).

El tiempo de exposición del vector a plantas infectadas con MBS, el porcentaje de detecciones va del 2 al 3% con una hora de exposición, mientras que, a las 72 horas de exposición al patógeno *D. maidis* tiene un porcentaje de infección del 18% (Legrand y Power, 1994). En Brasil, en un experimento que expuso dos colonias de *D. maidis* a plantas con MBS mostraron una infección de alrededor 27,5 y 3,3% en las colonias uno y dos,

respectivamente (Oliveira *et al.*, 2011). Por lo que concluyen que, la adquisición y transmisión del fitoplasma MBS depende de la planta fuente y las condiciones de temperatura ambiente. En las localidades evaluadas, los rangos de detecciones positivas fueron del 7 al 15% de las poblaciones de *D. maidis*, excepto por la localidad de Garzón cuyo porcentaje de MBS fue del 30% (Figura 2-4). Garzón tiene un rango de temperatura de 22 a 24°C, una precipitación entre 100 y 200 días y una humedad relativa anual entre el 80 y 85% (IDEAM, 2020). Como se mencionó anteriormente el MBSP tiene mayor resistencia a bajas temperaturas que el CSS, por lo que para esta localidad se podría decir que la presencia del MBSP en el mismo porcentaje que CSS, se puede atribuir a la tolerancia del fitoplasma a estas condiciones ambientales. Además, teniendo en cuenta la temperatura, se esperaría que, en las localidades de Campoalegre y Neiva, el porcentaje de MBS fuera mayor que en las localidades de Tarqui y Garzón; el rango de temperatura para Campoalegre y Neiva es de 26 a 28°C, días de lluvia de 50 a 100 y humedad relativa entre 70 – 75% y 65 – 70%, respectivamente. El porcentaje de detección del MBS inferior en estas localidades puede ser por el alto porcentaje de presencia del CSS.

La presencia del fitoplasma MBSP en los morfotipos, sigue siendo más baja con respecto al CSS, por lo que posiblemente se deba a una competencia de los patógenos por el vector, y las características adaptativas y co-evolutivas de estos con *D. maidis*, se podría decir que las detecciones de cada patógeno son inversamente proporcionales entre sí, ya que se observa que, entre más alto sea el porcentaje de detecciones de CSS en las poblaciones de *D. maidis*, más bajo es el porcentaje de detecciones del MBSP. En el morfotipo III, se observó que la mitad de los individuos evaluados fueron positivos para CSS, 57% (Figura 2-5); pero, no se detectó el MBS en ninguno de los individuos de este morfotipo. Hecho que además, podría explicar los bajos porcentajes de coinfección, ya que, la competencia de los patógenos por el vector, disminuye las posibilidades de encontrar ambos patógenos dentro de un mismo individuo, en este caso, el porcentaje de coinfección fue de 8%, pues de 110 individuos evaluados solamente nueve fueron positivos tanto para CSS como para MBSP (Figura 2- 3), valor que coincide con los bajos porcentajes de coinfección reportados en otros estudios (Oliveira *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2015).

Una observación interesante que se podría hacer en futuras investigaciones sería la comparación de los porcentajes de infección entre machos y hembras del vector. Ya que se ha reportado que, debido a la diferencia de comportamiento del macho y la hembra del saltahoja, en las hembras se presenta mayor detección de los patógenos. Canale y colaboradores (2018), detectaron la presencia de MBS en hembras y machos en una relación de 8 y 2%, respectivamente, con una infección de la población de *D. maidis* del 3%. La diferencia en el porcentaje de detección entre machos y hembras se puede deber a que las hembras pasan más tiempo en la planta huésped, alimentándose y ovipositando, lo que aumentaría las posibilidades de adquisición de los patógenos, mientras que, los machos tienden a tener vuelos más activos en búsqueda de hembras para copular (Heady y Nault, 1985; Hunt y Nault, 1991; Larsen y Nault, 1994; Canale *et al.*, 2018).

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

El presente trabajo es una línea base para las descripciones morfológicas de las poblaciones de *D. maidis* del departamento del Huila, planteando la presencia de variaciones morfológicas a nivel inter e intrapoblacional, generando una separación de cuatro morfotipos, descritos con caracteres morfológicos cualitativos y caracteres morfométricos. Además, se observó la relación de la abundancia de *D. maidis* en las zonas maiceras con las condiciones climáticas de cada población.

Las detecciones del espiroplasma CSS y el fitoplasma MBS en el vector *D. maidis*, se presentan como el primer reporte para Colombia, observando una mayor presencia del Mollicute CSS con respecto al MBS con porcentajes de infección de hasta 3 veces más del que se encuentra en la literatura.

La relación de abundancia de *D. maidis* con la frecuencia de los Mollicutes, no es clara en este estudio, por lo que se considera que deben tenerse en cuenta las condiciones como la temperatura que pueden influir en la adquisición y transmisión.

7.2 Recomendaciones

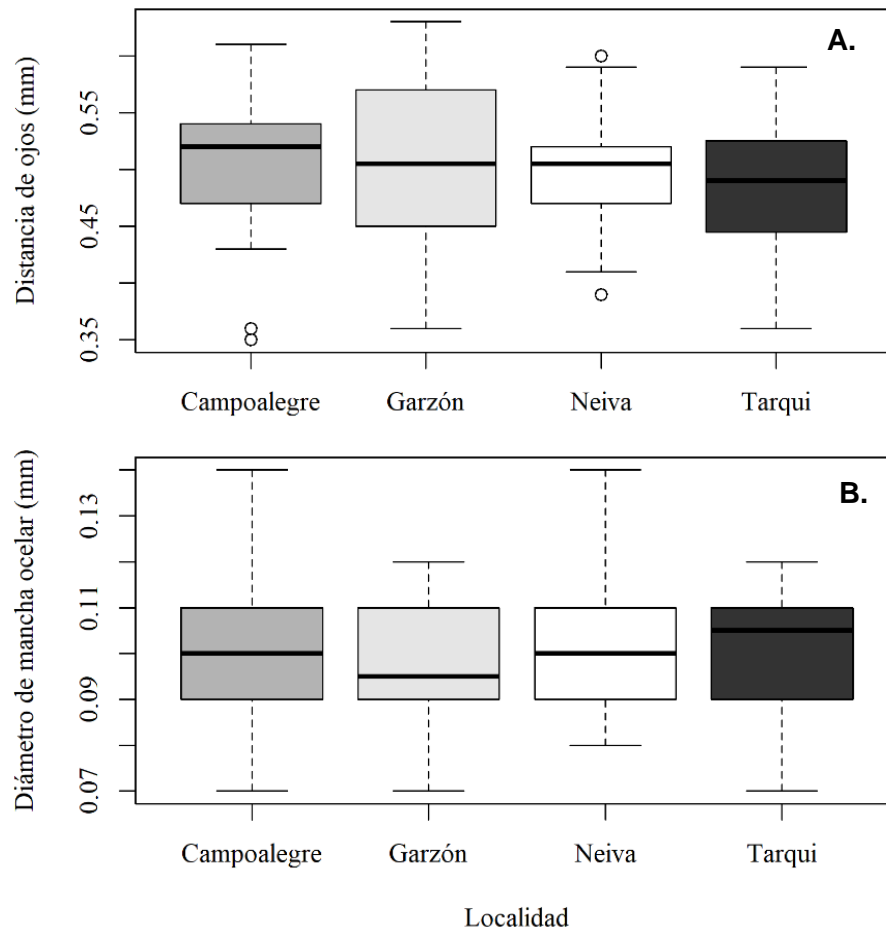
Se recomienda realizar nuevos muestreos en la localidad de Garzón para la corroboración de la identificación de los individuos del morfotipo V, ya que, según los comentarios del experto podrían corresponder a otra especie, de la cual no se tienen reportes para el país.

Se recomienda hacer remuestreos en las zonas evaluadas para ampliar las colectas evaluadas y hacer seguimiento de las poblaciones de *D. maidis* en las zonas maiceras. Además de, evaluar otros aspectos que influyan en el desarrollo o la diseminación de la enfermedad, como lo son los hospedantes alternos, maíces en asocio, o cultivos de zonas de mayor altitud, ya que, este estudio se enfocó en maíces a baja altitud.

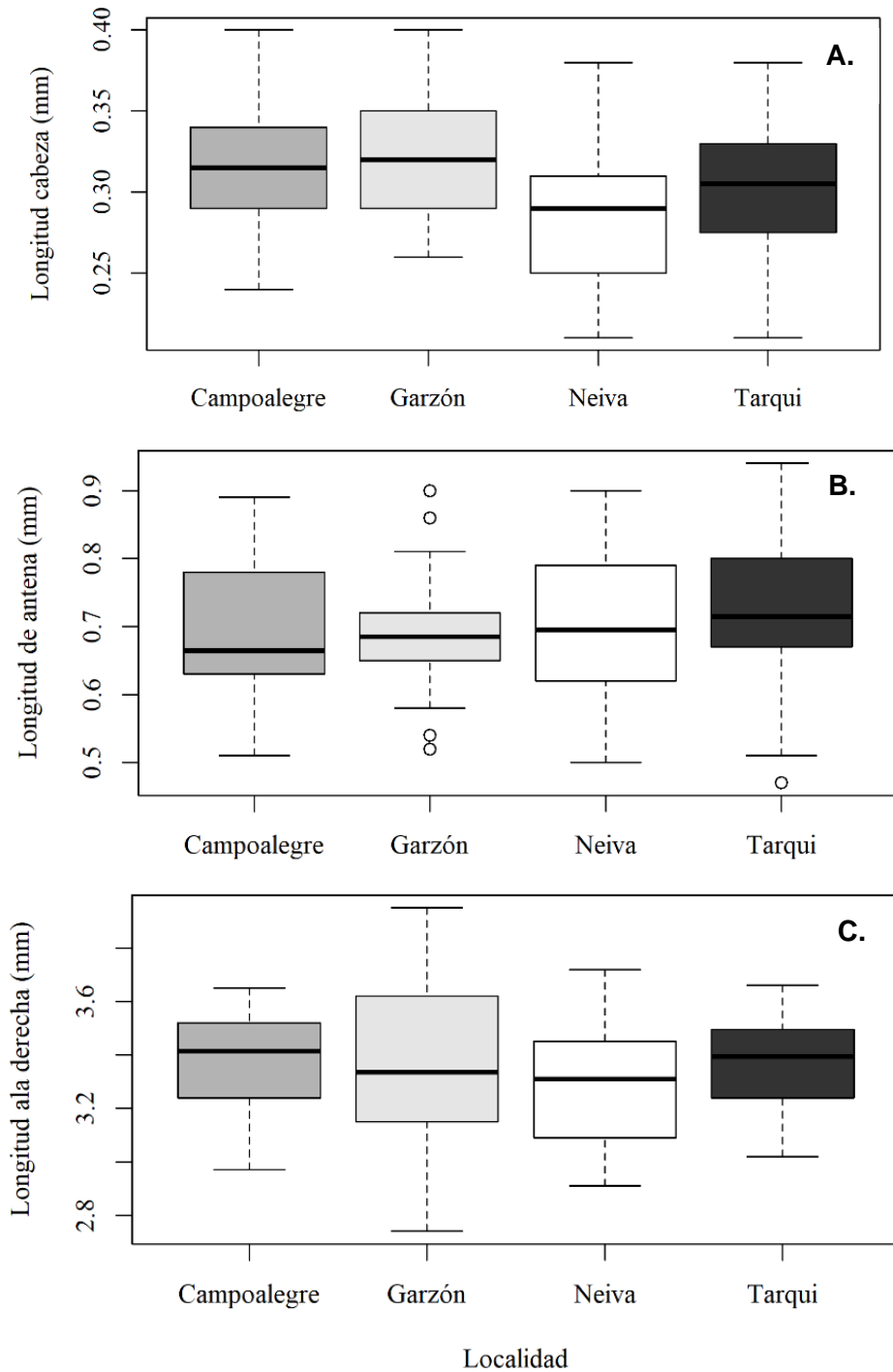
Finalmente, se recomienda realizar más detecciones de los patógenos en las zonas maiceras del Huila, evaluando un mayor número de individuos por localidad para el seguimiento de la presencia de los Mollicutes en el vector; además, para la determinación de dominancia de los patógenos y mayor información sobre los procesos de co-infección.

A. Anexo: Capítulo uno: descripción y variaciones morfológicas de *Dalbulus maidis*.

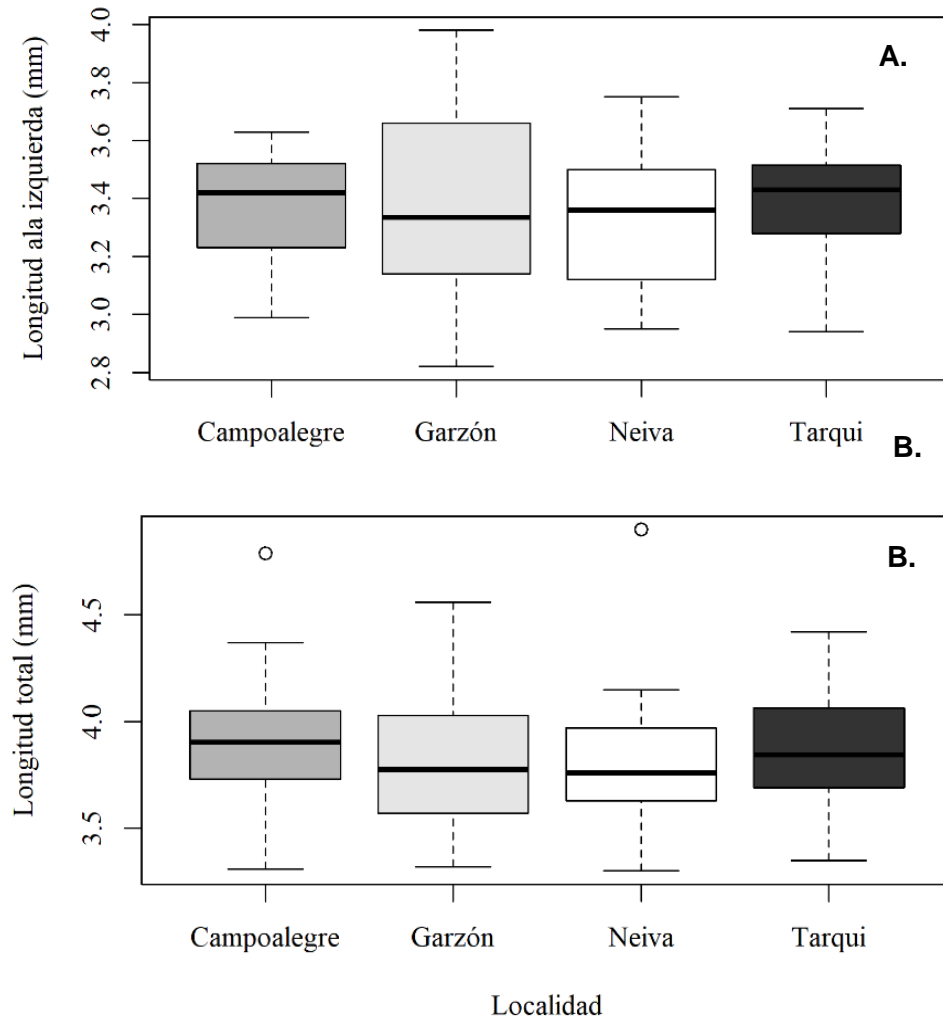
Anexo 1-1: Boxpot de poblaciones de *Dalbulus maidis* de cuatro localidades del departamento del Huila. **A.** Distancia entre ojos. **B.** Diámetro de la mancha ocelar.



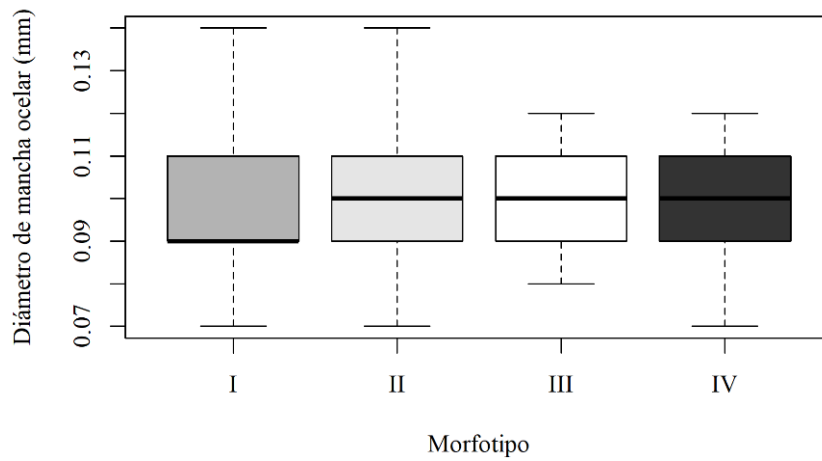
Anexo 1-2: Boxplot de poblaciones de *Dalbulus maidis* de cuatro localidades del departamento del Huila. **A.** Longitud cabeza. **B.** Longitud antenal. **C.** Longitud ala derecha.



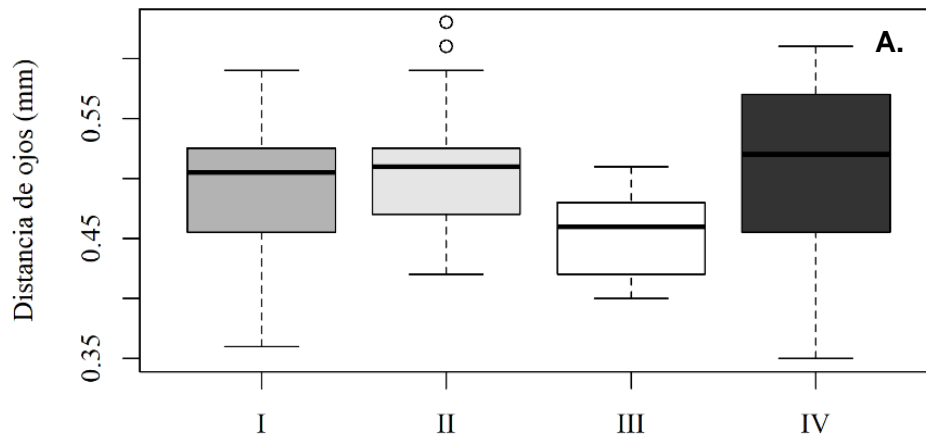
Anexo 1-3: Boxplot de poblaciones de *Dalbulus maidis* de cuatro localidades del departamento del Huila. **A.** Longitud ala izquierda. **B.** Longitud total.

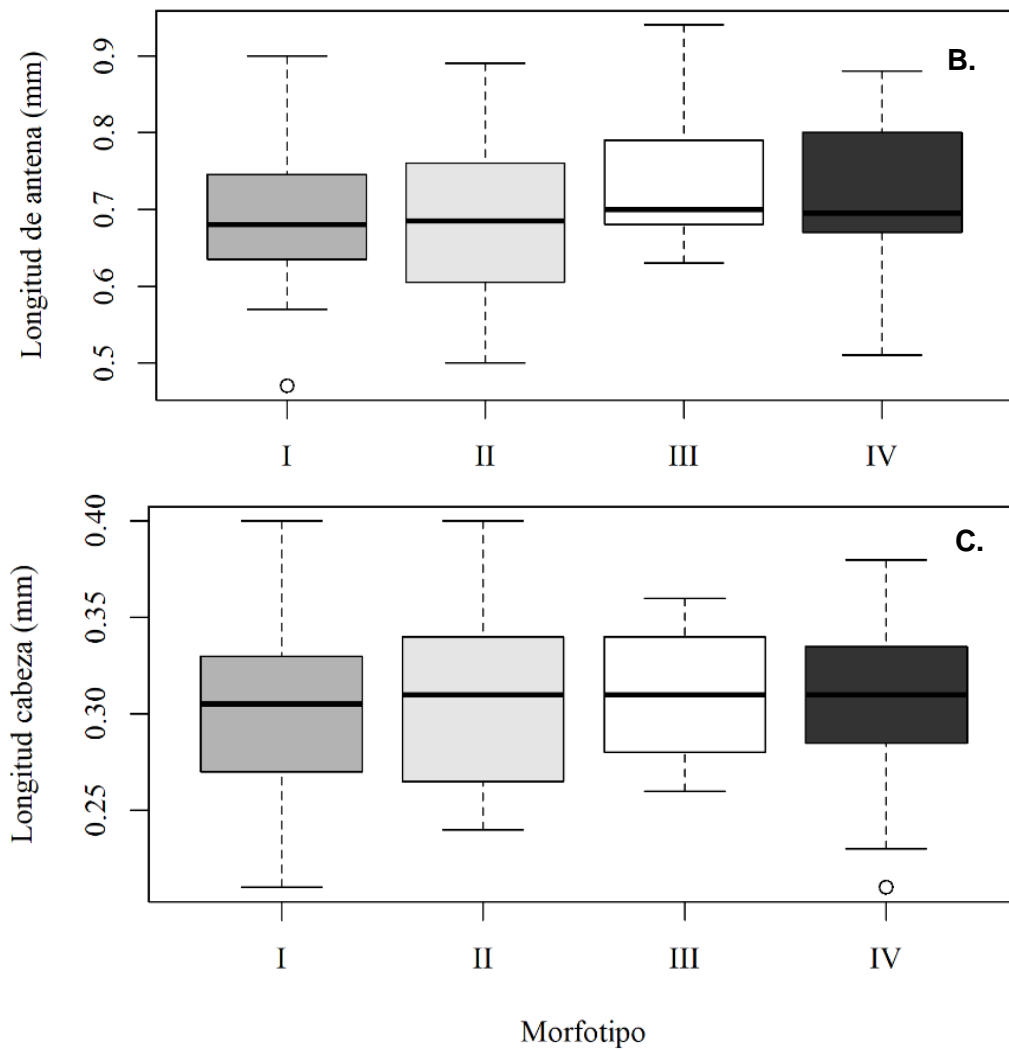


Anexo 1-4: Boxplot del diámetro de la mancha ocelar de poblaciones de *Dalbulus maidis* de cuatro morfotipos del departamento del Huila.

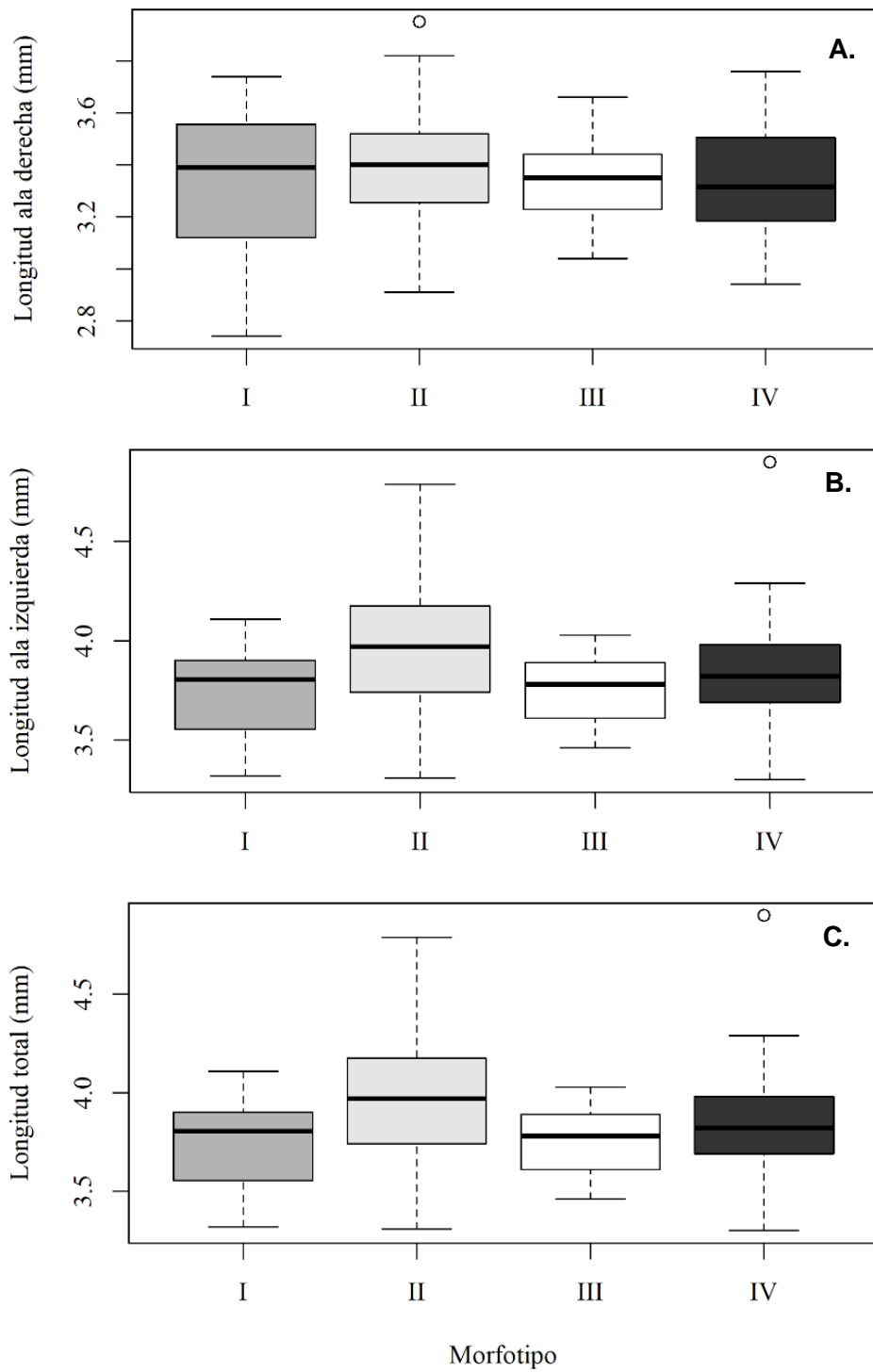


Anexo 1-5: Boxplot de poblaciones de *Dalbulus maidis* de cuatro morfotipos del departamento del Huila. **A.** Distancia entre ojos. **B.** Longitud antenal. **C.** Longitud cabeza.

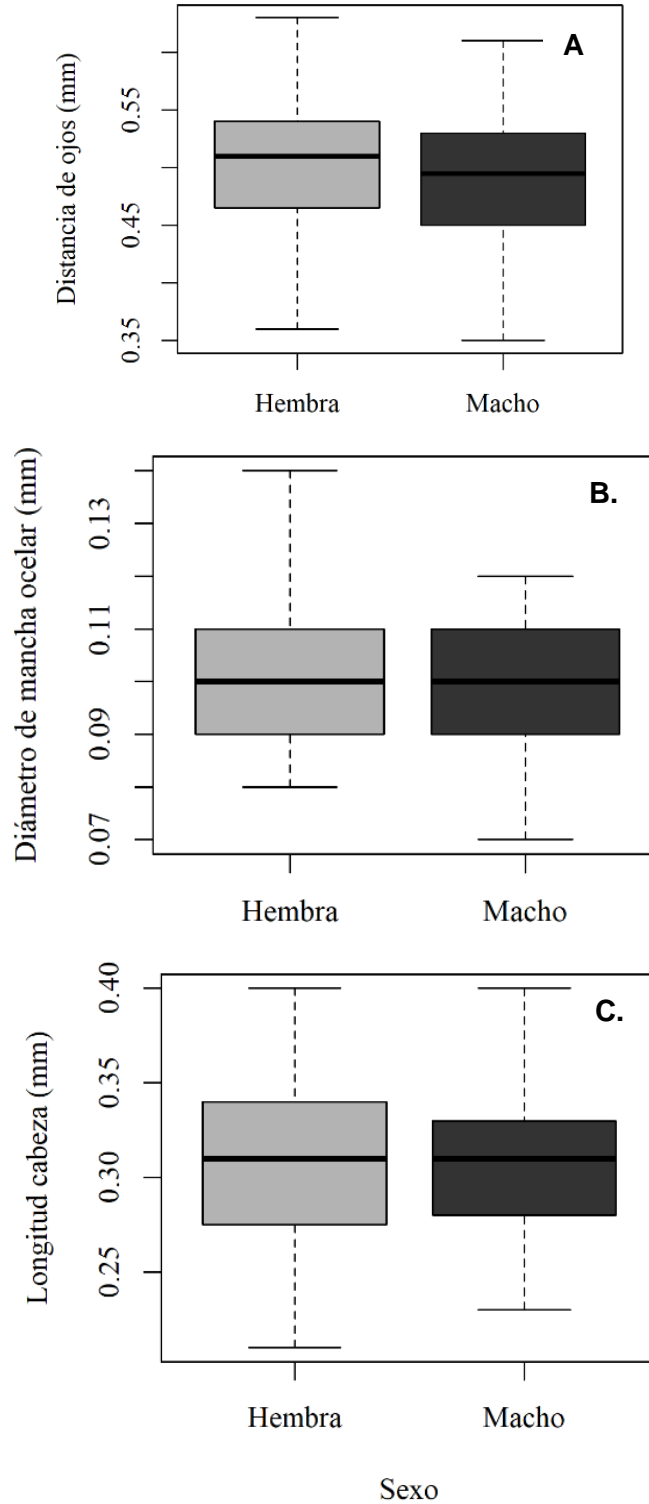




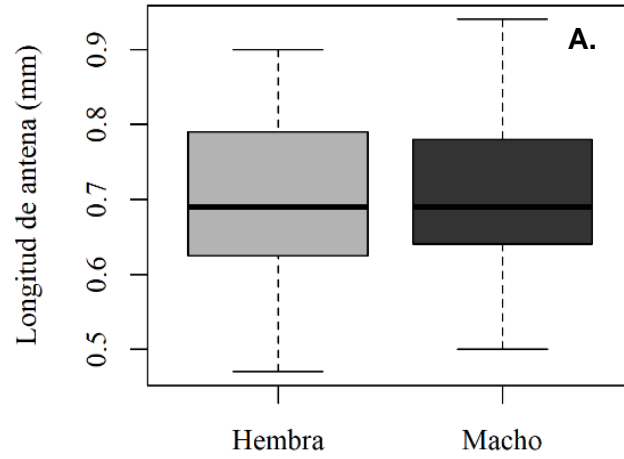
Anexo 1-6: Boxplot de poblaciones de *Dalbulus maidis* de cuatro morfotipos del departamento del Huila. **A.** Longitud ala derecha. **B.** Longitud ala izquierda. **C.** Longitud total.

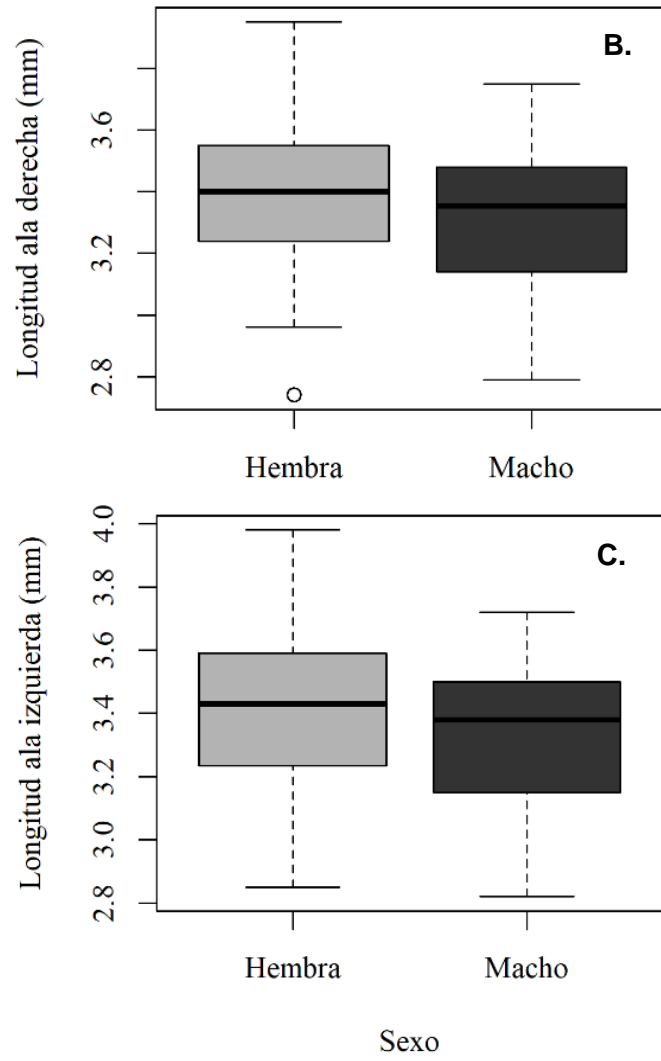


Anexo 1-7: Boxplot de machos y hembras de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila. **A.** Distancia entre ojos. **B.** Diámetro de la mancha ocelar. **C.** Longitud cabeza.

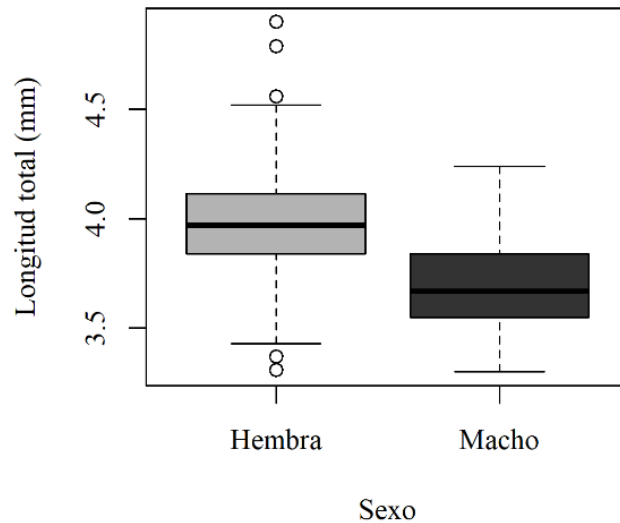


Anexo 1-8: Boxplot de machos y hembras de poblaciones de *Dalbulus maidis* del departamento del Huila. **A.** Longitud antenal. **B.** Longitud ala derecha. **C.** Longitud ala izquierda.

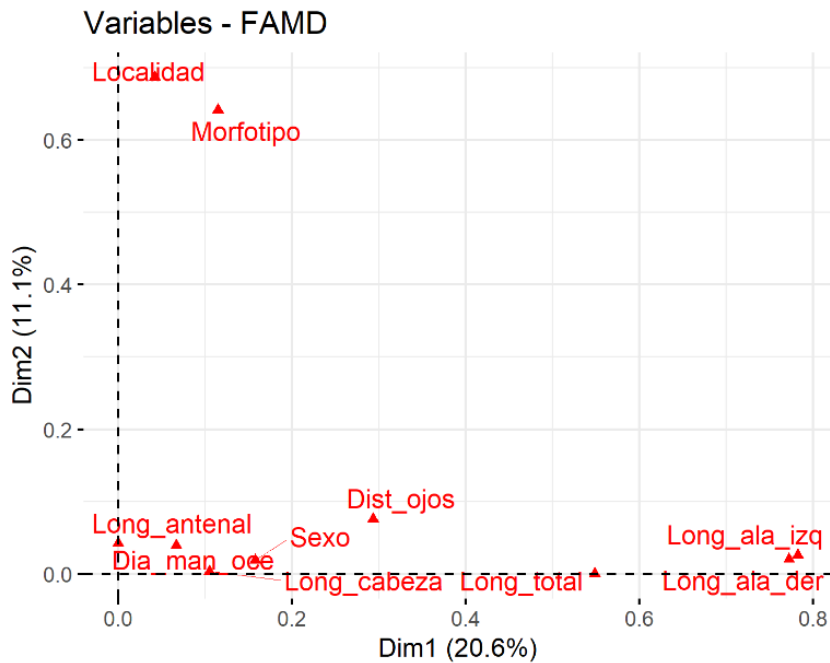




Anexo 1-9: Boxplot de la longitud total de machos y hembras de poblaciones de *Dalbulus* maidis del departamento del Huila.



Anexo 1-10: Mapa de factores análisis factorial de datos mixtos de las variables diámetro de mancha ocular, distancia entre ojos, longitud antenal, longitud antenal, longitud ala derecha, longitud ala izquierda, longitud total, localidad, morfotipo y sexo.



Anexo 1-11: Promedio de las variables longitud antenal, diámetro de mancha ocelar y longitud antenal, de los morfotipos y el sexo de poblaciones de *D. maidis* de cuatro localidades del departamento del Huila.

Individuo	Localidad	Morfotipo	Sexo	Long_ant	Dia_man	Long_tot
1	Campoalegre	I	Hembra	0,66	0,10	3,82
2	Campoalegre	I	Macho	0,69	0,11	3,76
3	Campoalegre	II	Hembra	0,67	0,10	4,07
4	Campoalegre	II	Macho	0,71	0,09	3,91
5	Campoalegre	IV	Hembra	0,73	0,10	3,99
6	Campoalegre	IV	Macho	0,73	0,09	3,74
7	Garzón	I	Hembra	0,78	0,09	3,67
8	Garzón	I	Macho	0,66	0,09	3,49
9	Garzón	II	Hembra	0,66	0,10	4,13
10	Garzón	II	Macho	0,64	0,10	3,85
11	Garzón	IV	Hembra	0,71	0,09	3,91
12	Garzón	IV	Macho	0,72	0,10	3,85
13	Neiva	I	Hembra	0,71	0,10	3,82
14	Neiva	I	Macho	0,83	0,09	3,75
15	Neiva	II	Hembra	0,71	0,11	4,05
16	Neiva	II	Macho	0,65	0,11	3,59
17	Neiva	IV	Hembra	0,71	0,10	4,05
18	Neiva	IV	Macho	0,66	0,10	3,54
19	Tarqui	I	Hembra	0,66	0,10	3,94
20	Tarqui	I	Macho	0,73	0,10	3,73
21	Tarqui	II	Hembra	0,69	0,10	4,20
22	Tarqui	II	Macho	0,80	0,10	3,60
23	Tarqui	III	Hembra	0,80	0,10	3,60
24	Tarqui	III	Macho	0,75	0,11	3,69
25	Tarqui	IV	Hembra	0,73	0,11	3,95
26	Tarqui	IV	Macho	0,74	0,10	3,71

Anexo 1-12: Promedio de las variables longitud ala derecha, longitud ala izquierda, longitud cabeza y distancia entre ojos, de los morfotipos y el sexo de poblaciones de *D. maidis* de cuatro localidades del departamento del Huila.

N°	Localidad	Morfotipo	Sexo	Long_alad	Long_alai	Long_cab	Dis_ojo
1	Campoalegre	I	Hembra	3,38	3,38	0,32	0,48
2	Campoalegre	I	Macho	3,36	3,39	0,33	0,52

3	Campoalegre	II	Hembra	3,39	3,41	0,31	0,49
4	Campoalegre	II	Macho	3,46	3,44	0,30	0,49
5	Campoalegre	IV	Hembra	3,33	3,33	0,30	0,53
6	Campoalegre	IV	Macho	3,32	3,31	0,34	0,51
7	Garzón	I	Hembra	3,25	3,29	0,30	0,51
8	Garzón	I	Macho	3,07	3,08	0,29	0,46
9	Garzón	II	Hembra	3,57	3,59	0,35	0,55
10	Garzón	II	Macho	3,47	3,46	0,33	0,49
11	Garzón	IV	Hembra	3,47	3,53	0,34	0,51
12	Garzón	IV	Macho	3,44	3,46	0,31	0,49
13	Neiva	I	Hembra	3,38	2,97	0,28	0,52
14	Neiva	I	Macho	3,51	3,57	0,31	0,51
15	Neiva	II	Hembra	3,32	3,38	0,28	0,49
16	Neiva	II	Macho	3,30	3,32	0,28	0,48
17	Neiva	IV	Hembra	3,19	3,19	0,29	0,51
18	Neiva	IV	Macho	3,16	3,18	0,31	0,49
19	Tarqui	I	Hembra	3,44	3,56	0,31	0,49
20	Tarqui	I	Macho	3,45	3,46	0,30	0,45
21	Tarqui	II	Hembra	3,38	3,39	0,31	0,50
22	Tarqui	II	Macho	3,41	3,45	0,30	0,52
23	Tarqui	III	Hembra	3,20	3,22	0,33	0,46
24	Tarqui	III	Macho	3,41	3,44	0,31	0,47
25	Tarqui	IV	Hembra	3,46	3,49	0,31	0,50
26	Tarqui	IV	Macho	3,34	3,38	0,27	0,52

B. Anexo: Capítulo dos: detección de patógenos

Anexo 2-1: Protocolo de extracción de ADN de insectos Chen et al. (2010) con modificaciones:

Paso 1. Seleccionar 1 individuo insectil del vial con etanol con un asa metálica recta con el extremo ligeramente curvado para depositar sobre papel filtro estéril donde se dejará evaporar el etanol por una hora a temperatura ambiente.

Paso 2. Introducir el individuo en un tubo eppendorf de 0,5 ml estéril sin tapa y macear en seco con pistilo azul estéril introduciéndolo dentro del tubo.

Paso 3. Una vez el individuo quede adecuadamente macerado agregar 100 µl de buffer de extracción para lavar el pistilo, garantizando que la mayor cantidad de tejido macerado quede dentro del tubo.

Paso 4. Pasar la totalidad de la mezcla a un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml adicionar buffer de extracción hasta completar 500 µl y mezclar.

Paso 5. Agregar una cucharadita de microesferas de vidrio (0,5 g aproximadamente) y agitar en shaker durante 10 minutos.

Paso 6. Adicionar 5 µl de proteinasa K, mezclar invirtiendo el tubo y llevar a incubación durante 20 horas a 50°C.

Paso 7. Completado el tiempo de incubación adicionar 500 µl de cloroformo isoamil alcohol (24:1).

Paso 8. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos entre 4 – 8°C.

Paso 9. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y adicionar 1 ml de etanol absoluto frío (previamente almacenado a -20°C). Incubar a -20°C por una hora. Posteriormente centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos entre 4 – 8°C.

Paso 10. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µl de etanol al 70% a 12000 rpm por 3 minutos.

Paso 11. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.

Paso 12. Resuspender el pellet seco en 25 µl de agua ultra pura.

Paso 13. Adicionar 2 µl de RNAsa e incubar a 37°C por una hora.

Paso 14. Posteriormente cuantificar y almacenar.

Anexo 2-2: Concentraciones finales requeridas de cada uno de los reactivos y volumen final para una reacción de PCR de 15 µl, para detección de CSS.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 reacción
Buffer	5X	1X	3 µl
MgCl ₂	25mM	1,5mM	0,9 µl
dNTPs	10mM	0,25mM	0,37 µl
Cebador-F	10µM	0,2µM	0,3 µl
Cebador-R	10µM	0,2µM	0,3 µl
BSA	5 µg/µl	0,1µg/µl	0,3 µl
Taq	5 U/µl	1U	0,2 µl
ADN	-	-	3 µl
H ₂ O	-	-	6,63µl

Anexo 2-3: Perfil térmico de la reacción de PCR para la detección de CSS.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	2 minutos	1
95 °C	1 minuto	35
60 °C	2 minutos	
72 °C	3 minutos	
72 °C	10 minutos	1
10 °C	constante	∞

Anexo 2-4: Concentraciones finales requeridas de cada uno de los reactivos y volumen final para una reacción de PCR de 15 µl, para detección de MBS.

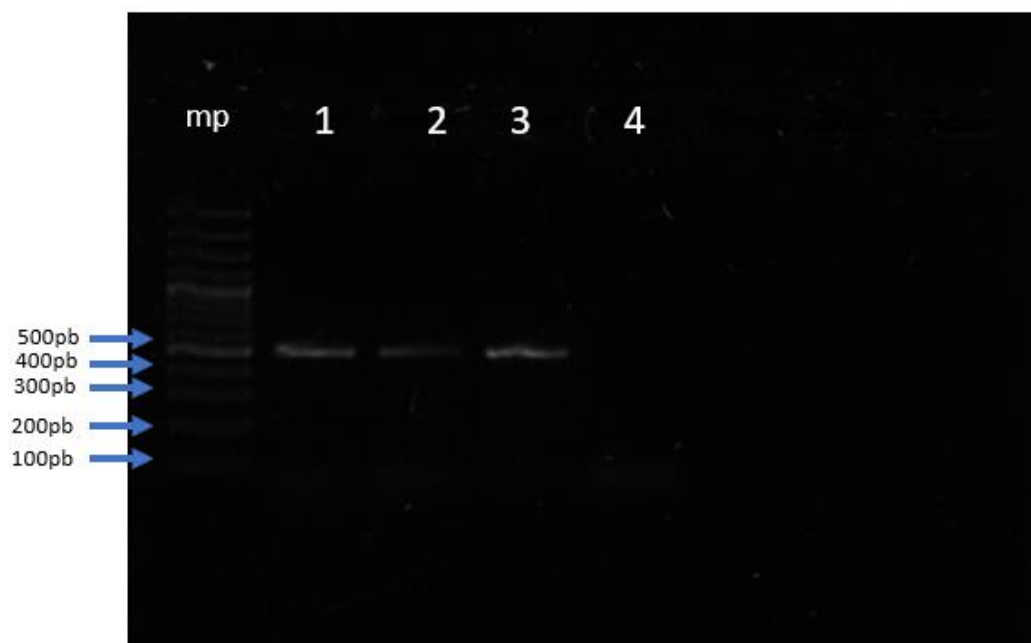
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 reacción
Buffer	10X	1X	1,5 µl
MgCl ₂	25mM	2,5mM	15, µl
dNTPs	10mM	0,25mM	0,37 µl

Cebador-F	10µM	0,2µM	0,3 µl
Cebador-R	10µM	0,2µM	0,3 µl
BSA	5 µg/µl	0,1µg/µl	0,3 µl
Taq	5 U/µl	1U/µl	0,2 µl
ADN	-	-	3 µl
H ₂ O	-	-	7,525µl

Anexo 2-5: Perfil térmico de la reacción de PCR para la detección de MBS.

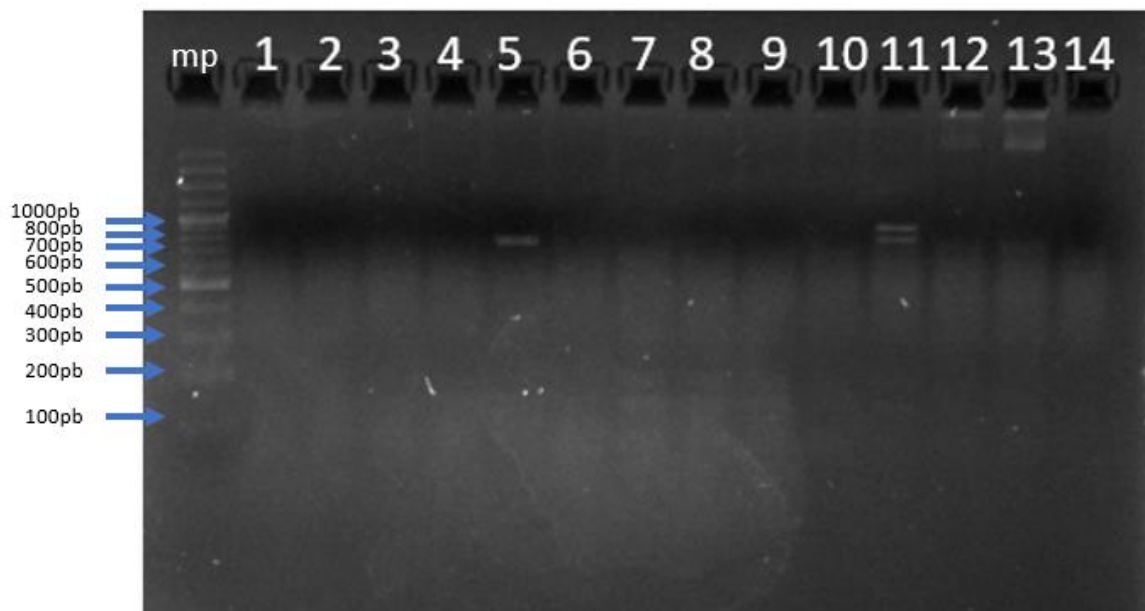
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	1 minutos	1
94 °C	30 segundos	35
60 °C	45 segundos	
72 °C	1 minuto	
72 °C	10 minutos	1
10 °C	constante	∞

Anexo 2-6: Visualización en gel de agarosa de las bandas de amplificación para la detección espiroplasma CSS en individuos de Dalbulus maidis. **mp:** marcador de peso.



Carril	Ácidos Nucleicos	A260/280	A260/230
Muestra 1	57,036	1,881	1,677
Muestra 2	62,293	1,880	1,640
Control positivo	-----	-----	-----
Blanco PCR	-----	-----	-----

Anexo 2-7: Visualización en gel de agarosa de las bandas de amplificación para la detección fitoplasma MBSP en individuos de *Dalbulus maidis*. **mp:** marcador de peso.



Carril	Ácidos Nucleicos	A260/280	A260/230
Muestra 1	34,414	1,781	1,880
Muestra 2	96,231	1,967	2,055
Muestra 3	29,344	1,825	2,039
Muestra 4	100,494	1,802	1,719
Muestra 5	61,390	1,935	1,852
Muestra 6	55,725	1,913	1,723
Muestra 7	74,486	1,949	1,782
Muestra 8	53,242	1,902	1,778
Muestra 9	76,097	1,948	1,757
Muestra 10	35,576	1,876	1,722
Control positivo 1	-----	-----	-----
Control positivo 2	-----	-----	-----
Control positivo 3	-----	-----	-----
Blanco PCR	-----	-----	-----

C. Anexo: Síntomas de la enfermedad del achaparramiento del maíz.

Anexo 3-1: Plantas de maíz afectadas con achaparramiento del maíz. **A.** enanismo de la planta. **B.** Formación de mazorcas no viables.



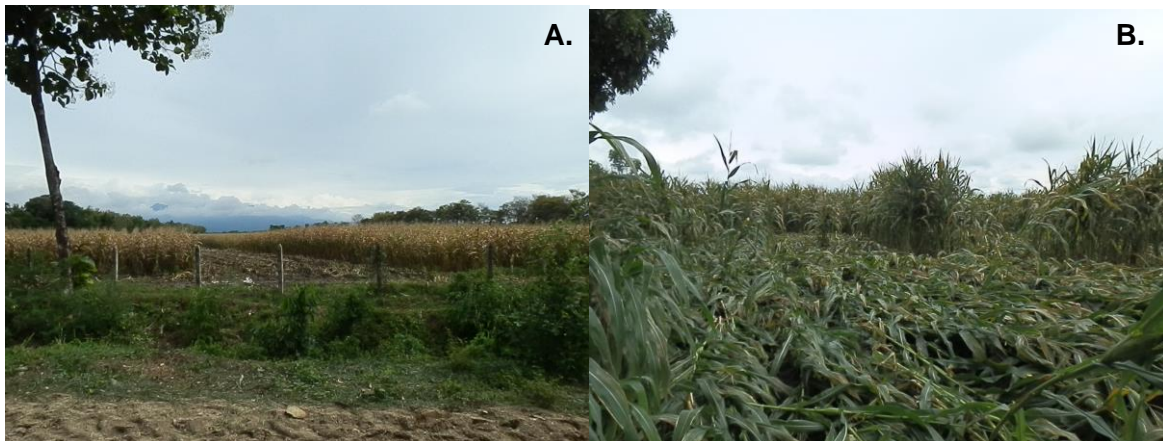
Fuente: Vargas-Berdugo, A.M. 2016

Anexo 3-2: Plantas de maíz afectadas con achaparramiento del maíz. **A.** clorosis de las hojas. **B.** Acortamiento de entrenudos, formación de hojas excesivo.



Fuente: Vargas-Berdugo, A.M. 2016.

Anexo 3-3: Cultivos de maíz afectado por el achaparramiento del maíz. **A.** Cultivo con plantas de baja estatura. **B.** Plantas volcadas, pérdida de la cosecha del cultivo.



Fuente: Vargas-Berdugo, A.M. 2016.

Bibliografía

- Agronet. (2019). *Estadísticas: área, producción y rendimiento Nacional por cultivo*. Ministerio de Agricultura. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1#>
- Alvizatos, A.S. y Markham P G. (1986). Acquisition and transmission of corn stunt spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. *Annals of Applied Biology* 108: 535 – 544
- Arismendi, S.N., Carrillo Ll., R. y Andrade S.N. (2010). Mollicutes Fitopatógenos Transmitidos Por Insectos: Interacciones Y Efectos En Sus Vectores. *Agro Sur*, 38(2), 55–67. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2010.v38n2-01>
- Ávila, C. J. y Arce, C. C. M. (2008). Flutuação populacional da cigarrinha-do-milho em duas localidades do Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural*, 38(4), 1129–1132. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782008000400035>
- Bosco, D., Minucci, C., Boccardo, G. y Conti, M. (1997). Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83(2), 219–224. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00175.x>
- Bové, J. M., Renaudin, J., Saillard, C., Foissac, X. y Garnier, M. (2003). Spiroplasma citri, A Plant Pathogenic Mollicute: Relationships with Its Two Hosts, the Plant and the Leafhopper Vector. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 483–500. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052102.104034>
- CABI. (2020). *Dalbulus maidis* distribución. CABI. <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/datasheet/17847>
- Casuso, M. (2017). *Dalbulus maidis* (De Long y Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae): una plaga que va cobrando importancia en los maíces del sudoeste chaqueño. *Ministerio de Agroindustria*, 12. https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-dalbulus_maidis.pdf
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S. Y., Wang, H. y Siegfried, B. D. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>

- Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M. y Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10(11), 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.09.008>
- Claridge, M. F. y Den Hollander, J. (1983). The biotype concept and its application to insect pests of agriculture. *Crop Protection*, 2(1), 85–95. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(83\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0261-2194(83)90028-5)
- Clark, T.B., (1984). Diversity of spiroplasma host–parasite relationships. *Isr. J. Med. Sci.* 20, 995–997
- Cuadra, P. P. (2013). *Problemas Asociados Al Muestreo De Dalbulus Maidis De Long & Wolcott En Maiz En. 1990*, 29–55.
- Dávila-Berúmen, F., Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R. y Mauricio-Rico, J. A. (2014). Detection of phytoplasma in populations of Dalbulus, Empoasca, Graminella y Aceratagallia from the state of Zacatecas, Mexico. *Agrofaz*, 14(3), 39–45.
- de Luque, C., Martínez, G. y Rico, L. M. (2003). Una nueva enfermedad del maíz en Colombia transmitida por el saltahojas Dalbulus maidis (De Long & Woscott). *Fitopatología*, 38(4), 190–194.
- De Oliveira, Charles Martins, Lopes, J. R. S., Dos Santos Dias, C. T. y Nault, L. R. (2004). Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn leafhopper, Dalbulus maidis (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. *Environmental Entomology*, 33(5), 1192–1199. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-33.5.1192>
- de Oliveira, E., Ternes, S., Vilamiu, R., Landau, E. C. y Martins de Oliveira, C. (2015). Abundance of the insect vector of two different Mollicutes plant pathogens in the vegetative maize cycle. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5(1s), S117. <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2015.00050.x>
- de Remes Lenicov, A. M. M. y Virla, E. G. (1993). Homopteros auquenorrincos asociados al cultivo de trigo en la Republica Argentina. I. Analisis preliminar de la importancia relativa de las especies. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 28(4), 211–222. <https://doi.org/10.1080/01650529309360905>
- Delong, M. (1974). THE GENUS AMBLYSELLUS (HOMOPTERA: CICADELLIDAE): A KEY TO THE KNOWN SPECIES , WITH DESCRIPTIONS OF EIGHT NEW SPECIES. *The Canadian Entomologist*, 106, 841–849.
- Dietrich, C. (2005). Keys to the families of Cicadomorpha and Subfamilies and Tibres of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Florida Entomologist*, 88(4), 502–516.

- Drès, M. y Mallet, J. (2002). Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1420), 471–492. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1059>
- Ebbert, M. A. y Nault, L. R. (1994). Improved overwintering ability in *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) vectors infected with *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae). *Environmental Entomology*, 23(3), 634–644. <https://doi.org/10.1093/ee/23.3.634>
- Ebbert, Mercedes A. y Nault, L. R. (2001). Survival in *Dalbulus* leafhopper vectors improves after exposure to maize stunting pathogens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 100(3), 311–324. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00878.x>
- Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A. y Davis, T. S. (2018). Insect-Borne Plant Pathogens and Their Vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. *Annual Review of Entomology*, 63(September), 169–191. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043119>
- Flores-zamora, G. L. (2004). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BIOTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797), EN CULTIVOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN MÉXICO. 539–545.
- Flores, H. (2016). Guía técnica el cultivo del maíz. *Guía Técnica, El Cultivo Del Maiz*, 1, 40. <http://repiica.iica.int/docs/b3469e/b3469e.pdf>
- Galinat, W. C. (1992). *EVOLUTION*. 47.
- Gallun, R. L. (1977). Genetic Basis of Hessian Fly Epidemics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 287(1), 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1977.tb34241.x>
- García-Salazar, C., Whalon, M. E. y Rahardja, U. (1991). Temperature-dependent pathogenicity of the X-disease mycoplasma-like organism to its vector, *Paraphlepsius irroratus* (Homoptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology*, 20(6), 179–184. <https://doi.org/10.1093/ee/20.1.179>
- González, M., Jahnke, S., Morais, R. y Da Silva, G. (2014). Diversidad de insectos depredadores en área orizícola orgánica y de conservación, en Viamão, RS, Brasil TT - Diversity of predators' insects on organic rice field and conserved areas, in Viamão, RS, Brazil. *Revista Colombiana de Entomología*, 40(1), 120–128. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882014000100020&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v40n1/v40n1a2

0.pdf

- Govaerts, B., Vega, D., Chávez, X., Naro, L., San Vicent, F.M., Palacios, N., Pérez, M., González, G., Ortega, P., Carvajal, A., Arcos, A.L., Bolaños, J., Romero, N., Bolaños, J., Vanegas, J., Kropff, W., González, C.E., Navarro-Racinos, C., Ordoñez, L., Prager, S.D. y Tapasco, J. (2019). Maíz para Colombia Visión 2030. CIMMYT y CIAT, México.
- Granados, R.R. (1969). Electron microscopy of plants and insect vectors infected with the corn stunt disease agent. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 24, 173–187
- Harrison, R. G. (1980). Dispersal Polymorphisms in Insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11(1), 95–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000523>
- Hawkins, B. A. y Lawton, J. H. (1995). International Association for Ecology Latitudinal Gradients in Butterfly Body Sizes: Is There a General Pattern? *Source: Oecologia*, 102(1), 31–36. <http://www.jstor.org/stable/4220924>
- Heady, S. E., Madden, L. V. y Nault, L. R. (1985). Oviposition Behavior of Dalbulus Leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 78(6), 723–727. <https://doi.org/10.1093/aesa/78.6.723>
- Hernández-Avila, M., Garrido-Latorre, F. y López-Moreno, S. (2000). Diseño de estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México*, 42(2), 144–154.
- Hodkinson, I. D. (2005). Terrestrial insects along elevation gradients: Species and community responses to altitude. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 80(3), 489–513. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006767>
- ICA. (2016). *El ICA diseñó plan de trabajo para apoyar a maiceros del Huila*. Noticias ICA. <https://www.ica.gov.co/movil/noticias/4902.aspx>
- ICA. (2019a). *El ICA y AGROSAVIA hacen equipo para fortalecer la sanidad de los cultivos de maíz en el Huila*. Noticias ICA. <https://www.ica.gov.co/noticias/ica-agrosavia-fortalece-sanidad-cultivo-maiz-huila>
- ICA. (2019b). *Resolución No. 00012410 (14/08/2019)*. Instituto Colombiano Agropecuario. <https://www.ica.gov.co/getattachment/9490d261-c00d-4f8b-afd3-b518153da15e/2019R12410.aspx>
- Kassambara, A. y Mundt, F. (2017). *Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses* (R package version 1.0.5.).
- Knight, W. J. y Webb, M. D. (1993). The phylogenetic relationships between virus vector and other genera of macrosteline leafhoppers, including descriptions of new taxa (Homoptera: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Systematic Entomology*, 18(1), 11–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1993.tb00653.x>

- Krasnov, B., Ward, D. y Shenbrot, G. (1996). Body size and leg length variation in several species of darkling beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) along a rainfall and altitudinal gradient in the Negev Desert (Israel). *Journal of Arid Environments*, 34(4), 477–489. <https://doi.org/10.1006/jare.1996.0126>
- Lanteri, A.A., Loíacono, M. S. y Margaría, C. (2002). Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos. *Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática*, 2, 207–220.
- Lanteri, A. y Díaz, N. (1994). Systematic study and cladistic analysis fo the genus Aramigus Horn (Coleoptera : Curculionidae). *Transactions of the American Entomological Society*, 120(2), 113–144.
- Larsen, K. J. y Nault, L. R. (1994). Seasonal polyphenism of adult Dalbulus leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 87(3), 355–362. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.3.355>
- Larsen, Kirk J., Madden, L. V. y Nault, L. R. (1990). Effect of temperature and host plant on the development of the blackfaced leafhopper. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 55(3), 285–294. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1990.tb01373.x>
- Le, S., Josse, J. y Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1–18.
- Legrand. A. y Power, A. (1994). Inoculation and acquisition of maize bushy stunt mycoplasma by its leafhopper vector Dalbulus maidis. *Annals of Applied Biology*, 125: 115 – 122
- Liu, G., Ma, H., Xie, H., Xuan, N., Guo, X., Fan, Z., Rajashekar, B., Arnaud, P., Offmann, B. y Picimbon, J. F. (2016). Biotype characterization, developmental profiling, insecticide response and binding property of Bemisia tabaci chemosensory proteins: Role of CSP in insect defense. *PLoS ONE*, 11(5), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154706>
- Loladze, S., Jeffers, D., Castillo, A. y Muñoz, C. (2016). *El Complejo del Achaparramiento de Maíz*. 55. <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/17843/58049.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- M. Druetta, I. y Luna, M. P. (2018). EL ACHAPARRAMIENTO DEL MAÍZ POR CORN STUNT SPIROPLASMA (CSS) "2018-Año del centenario de la reforma universitaria. *Ministerio de Agroindustria*, 1.

- https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_eeaquimili_corn_stunt_spiroplasma_en_maiz.pdf
- Madden, L. V., Nault, L. R., Heady, S. E. y Styer, W. E. (1986). Effect of temperature on the population dynamics of three Dalbulus leafhopper species. *Annals of Applied Biology*, 108(3), 475–485. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1986.tb01986.x>
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M. y Hornik, K. (2019). *cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions* (R package version 2.1.0).
- Markham, P.G. (1983). Spiroplasmas in leafhoppers: A review. *Yale J. Biol. Med.* 56, 745–751
- Markham, P.G. y Alivizatos, A.S., (1983). The transmission of corn stunt spiroplasma by natural and experimental vectors. In: Gordon, D.T., Knoke, J.K., Nault, L.R., Ritter, R.M. (Eds.), *Proceedings of the International Maize Virus Disease Colloquium and Workshop*. Ohio State University, Wooster, OH, pp. 56–61
- Meneses, A. R., Querino, R. B., Oliveira, C. M., Maia, A. H. N., Paulo, R. y Silva, R. (2016). Seasonal and Vertical Distribution of Dalbulus maidis (Hemiptera: Cicadellidae) in Brazilian Corn Fields. *Florida Entomologist*, 99(4), 750–754.
- Moya-Raygoza, G., Palomera-Avalos, V. y Galaviz-Mejia, C. (2007). Field overwintering biology of Spiroplasma kunkelii (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) and its vector Dalbulus maidis (Hemiptera: Cicadellidae). *Annals of Applied Biology*, 151(3), 373–379. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2007.00185.x>
- Moya-Raygoza, G. (2002). *DISTRIBUCIÓN Y HÁBITATS DE DALBULUS SPP. (HOMOPTERA: CICADELLIDAE) DURANTE LA ESTACIÓN SECA EN MÉXICO*. 85, 119–128.
- Moya-Raygoza, G. y Nault, L. R. (1998). Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 91(5), 668–676. <https://doi.org/10.1093/aesa/91.5.668>
- Nault, L. R. (1979). Identification of Maize Viruses and Mollicutes and Their Potential Insect Vectors in Peru. *Phytopathology*, 69(8), 824. <https://doi.org/10.1094/phyto-69-824>
- Nault, Lowell R. y Ammar, E. D. (1989). Leafhoppers and planthoppers transmission of plant viruses. *Annual Review of Entomology*, 34, 503–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.34.1.503>
- Nielson, M. W. (1975). the Leafhopper Vectors of Phytopathogenic Viruses (Homoptera , Cicadellidae) Taxonomy , Biology , *USDA Agricultural Research Service Technical*

- Bulletin*, 1382(1382), 1–386.
- Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E. y Wagner, H. (2019). *Vegan: Community Ecology Package* (R package version 2.5-6.). <https://cran.r-project.org/package=vegan>
- Oliveira, E., Carvalho, R.V., Duarte, A.P., Andrade R.A., Resende, R.O., Oliveira, C. M. y Recco, P.C. 2002. Molicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 1 (2): 38-46
- Oliveira, C.M., Lopes, J.R.S., Dias, C.T.S., y Nault, L.R. (2004). Influence of latitude and elevation on polymorphism among populations of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Brazil. *Environmental Entomology*, 33(5), 1192 - 1199.
- Oliveira, E., Santos, J., Magalhaes, P. y Cruz, I. (2007). Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. *Bulletin of Insectology*, 60(2): 229 – 230. ISSN 1721 – 8861
- Oliveira, E., De Sousa, S. y Landau, E. (2011). Transmission of maize bushy stunt phytoplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper. *Bulletin of Insectology*, 64: 153 – 154. ISSN 1721 – 8861.
- Oliveira, Charles M., Lopes, J. R. S. y Nault, L. R. (2013). Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 147(2), 141–153. <https://doi.org/10.1111/eea.12059>
- Oliveira, Charles Martins De, Oliveira, E. De, Souza, I. R. P. De, Alves, E., Dolezal, W., Paradell, S., Lenicov, A. M. M. D. R. y Frizzas, M. R. (2013). Abundance and species richness of leafhoppers and planthoppers (Hemiptera: Cicadellidae and Delphacidae) in Brazilian Maize Crops. *Florida Entomologist*, 96(4), 1470–1481. <https://doi.org/10.1653/024.096.0427>
- Oliveira, E., Waquil, J. M., Fernandes, F. T., Paiva, E., Resende, R. O. y Kitajima, E. W. (1998). “Corn stunt spiroplasma” and “maize bushy stunt phytoplasma” in the maize crop in the central area of Brazil (in Portuguese with English abstract). *Fitopatologia Brasileira*, 23(1), 45–47.
- Paliwal, R. L. (2001). *Origen, evolución y difusión del Maíz*. Consultado en Enero de 2020. Disponible en,. Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura (FAO). <http://www.fao.org/3/x7650s03.htm>

- Palomera, V., Bertin, S., Rodríguez, A., Bosco, D., Virla, E. y Moya-Raygoza, G. (2012). Is there any genetic variation among native Mexican and Argentinian populations of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae)? *Florida Entomologist*, 95(1), 150–155. <https://doi.org/10.1653/024.095.0123>
- Park, D. S., Footitt, R., Maw, E. y Hebert, P. D. N. (2011). Barcoding bugs: Dna-based identification of the true bugs (insecta: Hemiptera: Heteroptera). *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018749>
- Pérez-silva, M. y Equihua-Martínez, A. (2007). *DISTINCIÓN MORFOLÓGICA DE DOS MORFOTIPOS DE Xyleborus volvulus (FABRICIUS) 1775 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE). 1775*, 955–960.
- Pérez, Silva, M., Equihua, Martínez, A., Estrada, Venegas, E. G., Viveros, Muñoz, Lilia, A., Valdez, Carrasco, J. M. y Sánchez, J. (2015). *Sinopsis De Especies Mexicanas Del Género Xyleborus Eichhoff , 1864*. 31(2), 239–250.
- Pinedo-Escatel, J. A., Becerra-Chiron, I. M., Torres-Moreno, R. y Pérez-Valencia, L. I. (2020). A new species of the grass-feeding leafhopper genus *Amblysellus* Slesman (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae) from western Mexico, with a checklist and key to species. *Zootaxa*, 4853(2), 292–300. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4853.2.10>
- Pinedo-Escatel, J. y Blanco-Rodríguez, E. (2016). Notas del género *Dalbulus* DeLong, 1950 (Hemiptera: Cicadellidae) en México. *Folia Entomológica Mexicana*, 2(1), 16–19.
- Producción Agrícola Mundial. (2020). *Producción Mundial de Maíz 2019/2020*. Producción Agrícola Mundial. <http://www.produccionagricolamundial.com/cultivos/maiz.aspx>
- Regassa, L. B. y Gasparich, G. E. (2006). Spiroplasmas: Evolutionary relationships and biodiversity. *Frontiers in Bioscience*, 11(SUPPL. 3), 2983–3002. <https://doi.org/10.2741/2027>
- Rodríguez-Zabala, J., González, R., Correa, M. M. y Gómez, G. F. (2016). Análisis morfométrico de dos poblaciones de *Anopheles (Anopheles) calderoni* (Diptera: Culicidae) del suroccidente colombiano. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 966–971. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.005>
- Santana, P. A., Kumar, L., Da Silva, R. S., Pereira, J. L. y Picanço, M. C. (2019). Assessing the impact of climate change on the worldwide distribution of *Dalbulus maidis* (DeLong) using MaxEnt. *Pest Management Science*, 75(10), 2706–2715. <https://doi.org/10.1002/ps.5379>
- Simonet, D. E., & Pienkowski, R. L. (1980). Temperature Effect on Development and

- Morphometrics of the Potato Leafhopper1. *Environmental Entomology*, 9(6), 798–800. <https://doi.org/10.1093/ee/9.6.798>
- Smith, R. J., Hines, A., Richmond, S., Merrick, M., Drew, A., & Fargo, R. (2000). Altitudinal variation in body size and population density of *Nicrophorus investigator* (Coleoptera: Silphidae). *Environmental Entomology*, 29(2), 290–298. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2000\)029](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2000)029)
- Struyf, A., Hubert, M., & Rousseeuw, P. J. (1996). Clustering in an object-oriented environment. *Journal of Statistical Software*, 1, 1–30. <https://doi.org/10.18637/jss.v001.i04>
- Sugio, A. y Hogenhout, S. 2012. The genoma biology of phytoplasma modulators of plants and insects. *Current Opinion in Microbiology*, 15: 247 – 254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.002>
- Tauber, M., Tauber, C., & Masaki, S. (1986). *Seasonal Adaptations of Insects* (Oxford Uni).
- Todd, J. L., Madden, L. V., & Nault, L. R. (1991). Comparative growth and spatial distribution of *Dalbulus* leaf hopper populations (Homoptera: Cicadellidae) in relation to maize phenology. *Environmental Entomology*, 20(6), 556–564. <https://doi.org/10.1093/ee/20.2.556>
- Triplehorn, B. W., & Nault, L. R. (1985). Phylogenetic Classification of the Genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and Notes on the Phylogeny of the Macrostelini. *Annals of the Entomological Society of America*, 78(3), 291–315. <https://doi.org/10.1093/aesa/78.3.291>
- Triplehorn, C., & Jhonson, N. (2005). *Abbreviations Used in the Figures* (E. Howe, E. Feldman, & L. Michel (eds.); seventh). Peter Marshall.
- Valarezo, O., Intriago, M., & Muñoz, X. (2013). Biología de la “chicharrita” *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) y confirmación de su capacidad como vector del complejo viral de la Cinta Roja del maíz. *La Técnica: Revista de Las Agrociencias*. ISSN 2477-8982, 9, 36. https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i9.546
- Van Nieuwenhove, G. A., Frías, E. A., & Virla, E. G. (2016). Effects of temperature on the development, performance and fitness of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong) (Hemiptera: Cicadellidae): Implications on its distribution under climate change. *Agricultural and Forest Entomology*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/afe.12118>
- Varon, F., & Sarria, G. (2007). Enfermedades del Maiz y su manejo. In *Bulletin of*

- Insectology* (Vol. 64, Issue 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vélez-Arango, A. M., Rafael Eduardo Arango, I., Diego Villanueva, M., Elizabeth Aguilera, G., & Clara Inés Saldamando, B. (2008). Identification of *Spodoptera frugiperda* biotypes (Lepidoptera: Noctuidae) through using mitochondrial and nuclear markers. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(2), 145–150.
- Virla, E., de Remes Lenicov, A. M. M., & Paradell, S. (1990). Presencia de *Dalbulus maidis* (Insecta, Homoptera, Cicadellidae) sobre el maíz y tesointe en la Argentina. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 66, 23–30.
- Virla, Eduardo, Paradell, S., & Díez, P. (2003). Estudios bioecológicos sobre la chicharrita del maíz “*Dalbulus maidis*” (Insecta - Cicadellidae) en Tucumán (Argentina). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 29(1), 17–25.
- Weintraub, P. G., & Beanland, L. A. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51(January 2016), 91–111. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>
- Zang, L. S., Chen, W. Q., & Liu, S. S. (2006). Comparison of performance on different host plants between the B biotype and a non-B biotype of *Bemisia tabaci* from Zhejiang, China. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121(3), 221–227. <https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00482.x>