



**Caracterización fenotípica y genotípica de  
poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon*  
(Lepidoptera: Noctuidae) en distintos cultivos  
hospederos y regiones de la Argentina**

**Ing. Agr. María Inés Herrero**

**2018**



I T A N O A

**Caracterización fenotípica y genotípica de poblaciones de  
*Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) en  
distintos cultivos hospederos y regiones de la Argentina**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas

**TESISTA**

**Ing. Agr. María Inés Herrero**

**DIRECTOR**

**Dra. María Gabriela Murúa**

**COMISIÓN DE SUPERVISIÓN DE TESIS**

**Dra. María Francisca Perera**

**Dr. Juan Rull**

**-2018**

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN**

## **AUTORIDADES**

### **RECTOR**

Ing. Agr. José García

### **VICERRECTOR**

Ing. Sergio Pagani

### **SECRETARIA ACADÉMICA**

Dra. Norma Carolina Abdala

## **CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Acreditado y categorizado A ante la Comisión Nacional de Acreditación Universitaria  
(CONEAU)

Resolución n° 750/13

### **DIRECTOR**

Dr. Atilio Pedro Castagnaro (Res. N° 542/2014)

### **CODIRECTORA**

Dra. Lucía Elena Claps (Fac. de Ciencias Naturales)

### **COMITÉ ACADÉMICO**

Dra. Silvina Graciela Fadda (CERELA)

Dr. Raúl Osvaldo Pedraza (Fac. de Agronomía y Zootecnia)

**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA**  
**AUTORIDADES**

**DECANO**

Prof. Ing. Agr. M. Sc. Roberto Daniel Corbella

**VICE DECANA**

Ing. Agr. Miriam Rosana Paz

**SECRETARIA ACADÉMICA**

Prof. Mag. Ing. Agr. Olga M. Baino

**SECRETARIO DE ASUNTOS ADMINISTRATIVOS**

Cn. Luis Maria R. Geria Reines

**SECRETARIO DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

Dr. Ing. Zoot. Harold Vega Parry

**SECRETARIO DE EXTENSIÓN**

Ing. Agr. Roque F. Budeguer

**HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO**

**PROFESORES TITULARES**

Dr. Salvador Chaila

Dr. Raúl Osvaldo Pedraza

**PROF. ASOCIADOS Y/O ADJUNTOS**

Lic. Jesús Manuel Arroyo

Ing. Zoot. Jorge Luis Fernández

**JEFES DE TRABAJOS PRÁCTICOS Y/O PROFESORES AYUDANTES**

Ing. Zoot. Juan José Jorrat

Ing. Agr. María Florencia Benimeli

**EGRESADO**

Ing. Agr. Carlos D. Gilio

**NO DOCENTE**

Sr. Pedro Alfredo Almirón

**ESTUDIANTES**

Sr. Marcos Anan Robinet

Srta. María Noelia Paz

Srta. Josefina Yisset Sopena

**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABAJO DE TESIS TITULADO**

**“Caracterización fenotípica y genotípica de  
poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera:  
Noctuidae) en distintos cultivos hospederos y regiones  
de la Argentina”**

**TESISTA**

Ing. Agr. María Inés Herrero

**DIRECTOR**

Dra. María Gabriela Murúa

**COMISIÓN DE SUPERVISIÓN DE TESIS**

Dra. María Francisca Perera

Dr. Juan Rull



**ESTACIÓN EXPERIMENTAL  
AGROINDUSTRIAL  
OBISPO COLOMBRES**  
Tucumán | Argentina



I T A N O A



Este trabajo de tesis fue realizado en la Sección Zoología Agrícola de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), en el Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), dependiente de la EEAOC y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. (CONICET) y en el laboratorio de entomología de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria de soja (EMBRAPA soja) en la ciudad de Londrina, Paraná, Brasil.

*“Defender la alegría como una trinchera  
defenderla del escándalo y la rutina  
de la miseria y los miserables  
de las ausencias transitorias  
y las definitivas”*

*Mario Benedetti*

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar este trabajo de tesis a través de la beca doctoral otorgada.

A las autoridades de la Estación Experimental Obispo Colombres (EEAOC), por permitirme formar parte de esta honorable institución y brindarme las instalaciones y recursos necesarios para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Atilio Castagnaro, como Director de ITANOA durante el tiempo que desarrollé mi trabajo, muchas gracias por abrirme las puertas de esta institución, y como codirector de beca, muchas gracias por los consejos y aportes.

A Gerardo Gastaminza, jefe de la sección zoología, muchas gracias por darme la oportunidad de trabajar en esta sección, por todos sus consejos desinteresados, preocupación y seguimiento de mis actividades. A Eduardo Willink, muchas gracias por sus valorables aportes a mi formación, por ser siempre una persona gentil y respetuosa.

A Gabriela Murúa, mi directora de tesis: no tengo palabras para agradecerte todo lo que hiciste por mí. Gracias por tu motivación, por creer en mí, por hacerme sentir que era capaz de lograr todo lo que me propusiera. Gracias por tus palabras de aliento y tus consejos, por ser siempre tan comprensiva y un pilar fundamental en el desarrollo de esta tesis. Tenerte como directora fue la bendición más grande de todo este trabajo. Gracias por todo.

A mis compañeros de Zoología, gracias por su colaboración cuando lo necesité y por todos los momentos compartidos. A Sofía Fogliata, muchas gracias por ayudarme con los análisis moleculares. Gracias a Augusto Casmuz por ser una excelente persona, y llevarme de colecta con su grupo cada vez que lo necesitaba. Gracias a Florencia, Luciana, Lucky, Norma, Perla y Pilar por todas las carcajadas compartidas y por recibirme siempre



con una sonrisa. Un especial agradecimiento a Lucky, por ser una persona llena de luz que me supo contener en el momento más difícil de mi vida.

A Daniel Sosa-Gómez, por abrirme las puertas de EMBRAPA soja para realizar allí todos los estudios moleculares de esta tesis. Por su ayuda desinteresada, y por ser no sólo un excelente profesional sino también una persona sublime, por hacerme sentir durante todo el tiempo que estuve en Brasil parte de su hermosa familia. A Jairo da Silva, técnico del laboratorio de Entomología, por su paciencia al introducirme en este nuevo mundo de la biología molecular, por su responsabilidad y claridad en las explicaciones, y por todas las risas compartidas.

A todo el equipo técnico del laboratorio de citología y marcadores moleculares de la Universidad Estadual de Londrina (UEL), a los profesores Paulo y Paulette Rúas por permitirme de manera gentil integrarme al laboratorio para realizar el trabajo con microsátélites. Un agradecimiento especial a Lucas Benicio Milanez por ayudarme e incentivar me en el arduo trabajo que significó optimizar esos cebadores, y siempre con la mejor onda.

A los miembros de mi comisión de supervisión, Francisca Perera y Juan Rull. Les agradezco por todo lo aprendido en cada reunión, y por hacerme sentir siempre cómoda y relajada, y darme aliento cuando las cosas no salían de acuerdo a lo esperado. Gracias a Juan por compartir su experiencia, y convertir cada reunión en una oportunidad de aprendizaje. Gracias Francisca por tu preocupación, tu buena predisposición y por tus invaluable aportes en todo lo referente a la biología molecular. Gracias por desempeñar tu tarea como miembro de la comisión y mucho más.

A la Dra. Lucía Claps, por ser siempre tan atenta, eficiente y expeditiva en el paso de toda mi documentación por el Doctorado en Ciencias Biológicas.

A la Agencia Nacional de promoción Científica y tecnológica por el apoyo financiero a través de los proyectos de investigación PICT N° 2015-3109 y PICTO N° 0112.

A mis amigas de siempre Noe, Cynthi y Vico por estar siempre, en los buenos y malos momentos.

A mi mamá Silvia, gracias por ser una excelente madre, por empujarme siempre hacia adelante, por tu inmenso amor y dulzura.

A mis tíos Rosi y Víctor, mis primos Vero y Seba, y mi abuelita Nely. Porque son un pilar fundamental y lleno de amor para mí.

A mi hermana Alejandra, por ser una de las mejores personas que conocí, tan buena, amorosa, paciente y siempre con las palabras justas. Dicen que la familia no se elige, pero si la vida me hubiera dado esa posibilidad, te elegiría una y mil veces.

A Mauricio Talassino: mi amor, mi amigo, mi todo... Gracias por ser la persona más alegre y gentil que conocí, y por esa sonrisa que me ilumina la vida. Gracias por la paciencia que me tenés y por haberme elegido como tu compañera de vida. Un te amo no es suficiente.

Finalmente, a mi papá Raúl. Por ser el amor y la ternura hecho persona, por esos ojos bellos y esos cachetes regordetes que tanto extraño estrujar. Te voy a amar por siempre, mi gordito hermoso, y guardo en mí el bello recuerdo de tu voz cantándome: "Te busco con los ojos, te llevo en el alma, en mi corazón". Sé que me cuidas desde arriba, y esto, todo esto te lo dedico a vos.

# Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	3

## Capítulo 1: Introducción general

1.1. <i>Helicoverpa gelotopoeon</i> , la oruga bolillera .....	6
1.1.1. Posición taxonómica.....	6
1.1.2. El complejo Heliiothinae .....	6
1.1.3. Origen y distribución geográfica .....	7
1.1.4. Biología y ciclo de vida de <i>H. gelotopoeon</i> .....	8
1.1.5. Plantas hospederas .....	10
1.1.6. Daños e importancia económica.....	11
1.1.7. Monitoreo de <i>H. gelotopoeon</i> .....	12
1.1.8. Manejo y control de la plaga .....	13
1.1.9. Variación fenotípica y/o genotípica.....	17
1.2. Especiación.....	18
1.2.1. Concepto de especie .....	18
1.2.2. Aislamiento reproductivo y barreras al flujo genético entre especies .....	19
1.2.3. Tipos de especiación.....	21
1.3. Genética de poblaciones .....	24
1.3.1. Flujo génico y estructura genética de las poblaciones.....	24
1.3.2. Uso de marcadores moleculares para el análisis genético de poblaciones .....	25
1.4. Hipótesis .....	29
1.5. Objetivo general .....	29
1.5.1. Objetivos específicos.....	29

## Capítulo 2: Tabla de vida y determinación del potencial biótico de *Helicoverpa gelotopoeon*

2.1. Introducción.....	32
2.2. Materiales y métodos.....	33

2.2.1. Recolección de las poblaciones .....	33
2.2.2. Cría de las poblaciones .....	33
2.2.3. Parámetros biológicos y reproductivos.....	35
2.2.4. Tabla de vida y parámetros poblacionales.....	36
2.2.5. Potencial biótico .....	36
2.2.6. Análisis de datos.....	37
2.3. Resultados.....	37
2.3.1. Diferencias sexuales en parámetros biológicos .....	37
2.3.2. Tablas de vida y parámetros poblacionales .....	38
2.3.3. Potencial biótico .....	41
2.4. Discusión .....	41

**Capítulo 3: Caracterización biológica y compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* provenientes de diferentes regiones de la Argentina**

3.1. Introducción.....	46
3.2. Materiales y métodos.....	48
3.2.1. Recolección de las poblaciones .....	48
3.2.2. Descripción de las regiones agroecológicas correspondientes a las localidades muestreadas .....	49
3.2.3. Cría de las poblaciones .....	51
3.2.4. Determinación de parámetros biológicos de poblaciones de diferentes regiones de la oruga bolillera.....	51
3.2.5. Determinación de compatibilidad reproductiva entre poblaciones de diferentes regiones de la oruga bolillera.....	52
3.2.6. Análisis de datos.....	53
3.3. Resultados.....	53
3.3.1. Parámetros biológicos y reproductivos de poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> provenientes de distintas regiones .....	53
3.3.2. Compatibilidad reproductiva entre poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> provenientes de distintas regiones .....	56
3.4. Discusión .....	59

## **Capítulo 4: Caracterización biológica y compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* provenientes de diferentes cultivos**

4.1. Introducción.....	64
4.2. Materiales y métodos.....	66
4.2.1. Recolección de las poblaciones .....	66
4.2.2. Cría de las poblaciones .....	68
4.2.3. Determinación de parámetros biológicos de poblaciones de diferentes plantas hospederas de la oruga bolillera .....	68
4.2.4. Determinación de compatibilidad reproductiva entre poblaciones de diferentes plantas hospederas de <i>H. gelotopoeon</i> .....	69
4.2.5. Análisis de datos .....	69
4.3. Resultados.....	70
4.3.1. Parámetros biológicos y reproductivos de poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> provenientes de distintas plantas hospederas .....	70
4.3.2. Compatibilidad reproductiva entre poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> provenientes de distintas plantas hospederas .....	72
4.4. Discusión .....	75

## **Capítulo 5: Diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* sobre la base de marcadores nucleares**

5.1. Introducción.....	79
5.2. Materiales y métodos.....	81
5.2.1. Recolección y cría de las poblaciones .....	81
5.2.2. Extracción de ADN .....	84
5.2.3. Obtención y caracterización de marcadores microsatélites .....	85
5.2.4. Análisis de datos .....	86
5.3. Resultados.....	88
5.3.1. Obtención y caracterización de marcadores microsatélites en <i>H. gelotopoeon</i> ....	88
5.3.2. Diversidad genética de poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> .....	90
5.3.4. Estructuración genética de poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> .....	92
5.4. Discusión .....	96

**Capítulo 6: Diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* sobre la base de marcadores mitocondriales**

6.1. Introducción.....	102
6.2. Materiales y métodos.....	103
6.2.1. Recolección y cría de las poblaciones .....	103
6.2.2. Extracción de ADN .....	105
6.2.3. Amplificación y secuenciación del ADN mitocondrial.....	105
6.2.4. Medidas de variabilidad genética de las poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> .....	106
6.2.5. Redes haplotípicas de las poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> .....	107
6.2.6. Estructura genética de poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> .....	107
6.2.7. Análisis filogenético de poblaciones de <i>H. gelotopoeon</i> .....	108
6.3. Resultados.....	108
6.3.1. Medidas de variabilidad genética .....	108
6.3.2. Redes haplotípicas .....	113
6.3.3. Estructura genética .....	116
6.3.4. Análisis filogenético .....	120
6.4. Discusión .....	124

**Capítulo 7: Conclusiones y consideraciones finales .....** 131

**Capítulo 8: Bibliografía .....** 135

## Resumen

*Helicoverpa gelotopoeon* (D.) (Lepidoptera: Noctuidae) es una plaga polífaga de la subfamilia Heliothinae que ocasiona daños a los cultivos de soja, garbanzo, algodón y alfalfa, entre otros. Algunas especies de este complejo han desarrollado resistencia a cultivos genéticamente modificados e insecticidas, lo cual ha llevado a incrementar el interés sobre la biología, diversidad genética y estructuración poblacional de *H. gelotopoeon*. El objetivo de este trabajo fue determinar la existencia de estructura genética de poblaciones de *H. gelotopoeon* en función de distintas plantas hospederas y regiones de la Argentina en base a características biológicas y moleculares. Los parámetros biológicos evaluados fueron: duración de los estados de huevo, larva y pupa, número de estadios larvales, masa pupal y longevidad de adultos. Los parámetros reproductivos evaluados fueron: número de espermatozoides, período de pre, ovi y postoviposición, fecundidad y fertilidad. Para los ensayos de compatibilidad reproductiva se realizaron cuatro tipos de cruzas: parentales, híbridas, retrocruzas y cruzas entre híbridos. Para la caracterización molecular se utilizaron marcadores nucleares (microsatélites) y mitocondriales (de las regiones Citocromo oxidasa I y Citocromo b), ya que se consideró que ambos marcadores podían proveer información complementaria y más precisa para entender la estructura poblacional de esta especie. A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, se observó que *H. gelotopoeon* completa su ciclo aproximadamente en 45 días en condiciones de laboratorio, observándose la mayor mortalidad en el estado de huevo y los primeros estadios larvales. Las poblaciones pertenecientes a distintos cultivos y regiones mostraron parámetros biológicos y reproductivos similares. A su vez, las cruzas intra e interpoblacionales no mostraron signos de incompatibilidad reproductiva, sugiriendo un flujo génico sustancial entre las poblaciones. Los marcadores nucleares microsatélites mostraron que las poblaciones de *H. gelotopoeon* no están estructuradas y

hay flujo génico entre ellas, correlacionándose este resultado con lo observado a nivel biológico. Sin embargo, los marcadores mitocondriales mostraron que en general existiría cierta estructuración genética entre las poblaciones de *H. gelotopoeon*. Se consideran diversas causas que podrían haber contribuido a esta estructuración, como ser: región geográfica, planta hospedera, año de recolección, influencia de plantas silvestres, distintos sistemas de manejo, etc. Se destaca también la necesidad de realizar más estudios, abarcando una escala geográfica mayor, así como otros cultivos y posibles hospederos silvestres a lo largo de varias campañas. Todo esto ayudará a comprender mejor el grado de flujo génico y la repercusión del comportamiento migratorio de *H. gelotopoeon* en las distintas campañas. Este trabajo de tesis constituye el primer estudio de caracterización biológica y genética de *H. gelotopoeon*, información que servirá para desarrollar estrategias de manejo de esta plaga en Argentina, sobre todo haciendo énfasis en el retraso del desarrollo de resistencia a insecticidas y cultivos Bt.



## Abstract

*Helicoverpa gelotopoeon* (D.) (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous pest of the subfamily Heliothinae that causes damage to soybean, chickpea, cotton and alfalfa crops, to name a few. Some species within this complex have developed resistance to genetically modified crops and insecticides, which has led to an increased interest in the biology, genetic diversity and population structure of *H. gelotopoeon*. The objective of this study was to determine the existence of genetic structure of *H. gelotopoeon* populations according to different host plants and regions of Argentina on the basis of biological and molecular characteristics. The biological parameters measured were: egg, larvae and pupa stage duration, number of larval instars, pupal mass and adult longevity. The reproductive parameters measured were: number of spermatophores, pre-, ovi- and post-oviposition periods, fecundity and fertility. To determine reproductive compatibility four types of crosses were performed: parental crosses, hybrid crosses, backcrosses and inter-hybrid mating crosses. Nuclear (microsatellites) and mitochondrial (from Cytochrome oxidase I and Cytochrome b regions) markers were used for molecular characterizations, since it was considered that both markers could provide complementary and more precise information in order to understand the population structure of this species. The results obtained from this study showed that *H. gelotopoeon* completed a single generation in approximately 45 days in laboratory conditions, and the highest mortality was observed in egg stage and the first larval instars. Populations from different crops and regions displayed similar biological and reproductive parameters. In addition, intra- and inter-population crosses did not show signs of reproductive incompatibility, suggesting that extensive gene flow occurs among populations. Microsatellite nuclear markers showed that *H. gelotopoeon* populations are not structured and gene flow occurs among them, which is consistent with biological results. However, mitochondrial markers

showed that in general there is certain genetic structure among *H. gelotopoeon* populations. Several causes are considered to have contributed to this genetic structure, such as: geographical region, host plant, collection date, wild plants influence, different management systems, etc. It is also important to perform more studies, encompassing a wider geographical scale, as well as other crops and possible wild hosts over several seasons. All of this would help to better understand the extent of gene flow and implications of migratory behaviour of *H. gelotopoeon* in different seasons. This study is the first report of biological and genetic characterization of *H. gelotopoeon*, information which will be helpful to develop management strategies for this pest in Argentina, particularly emphasizing in the delay of the development of resistance to insecticides and Bt crops resistance.

# Capítulo 1

---

## Introducción general



## **1.1. *Helicoverpa gelotopoeon*, la oruga bolillera**

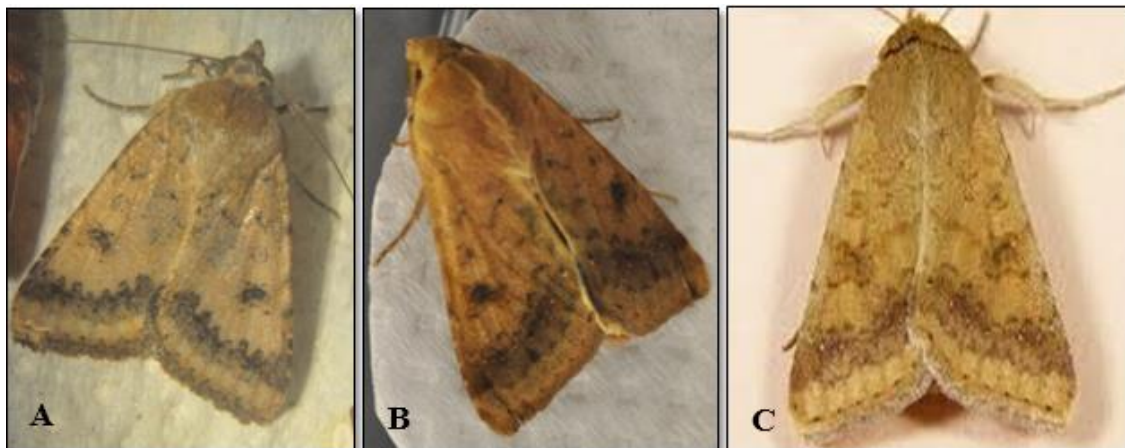
### **1.1.1. Posición taxonómica**

*Helicoverpa gelotopoeon* (Dyar) es un insecto del orden Lepidoptera, perteneciente a la familia Noctuidae, subfamilia Heliiothinae. Esta subfamilia comprende 381 especies descritas y distribuidas en 28 géneros (Pogue 2013). Dentro de esta subfamilia, las especies económicamente más importantes están incluidas dentro de los géneros *Helicoverpa* Hardwick y *Chloridea* Duncan. Las especies nativas de *Helicoverpa* en Sudamérica están divididas en dos grupos: (a) *gelotopoeon*, incluyendo *H. gelotopoeon*, *Helicoverpa titicacae* Hardwick, *Helicoverpa bracteae* Hardwick y *Helicoverpa atacamae* Hardwick; y (b) *zea*, incluyendo sólo *Helicoverpa zea* (Boddie). A su vez, las especies de *Chloridea* están representadas por *Chloridea virescens* (Fabricius), *Chloridea tergemina* (Felder y Rogenhofer) y *Chloridea subflexa* (Guenée) (Mitter et al. 1993, Pastrana 2004, Pogue 2013). Sin embargo, la detección reciente de *Helicoverpa armigera* (Hübner) en varios países de Sudamérica (Czepak et al. 2013, SENAVE 2013, Murúa et al. 2014, Kriticos et al. 2015) ha llevado a la inclusión de esta especie en el listado de los Heliiothinae presentes en Sudamérica.

### **1.1.2. El complejo Heliiothinae**

Actualmente, el complejo Heliiothinae de importancia agronómica en Argentina está compuesto por las especies *H. armigera*, *H. zea*, *C. virescens*, *C. subflexa* y *H. gelotopoeon* (Murúa et al. 2016). La diferenciación taxonómica basada en caracteres externos entre estas especies en los estados de huevo, larva y pupa es muy complicada

(Murúa et al. 2016). Sin embargo, los adultos pueden ser distinguidos por el patrón de las venas alares y sobre todo por la genitalia masculina mediante métodos taxonómicos tradicionales (Figura 1.1). Los caracteres taxonómicos son principalmente la forma de las valvas y la vesica y la forma y el número de los cornuti dentro del aedeago (Pogue 2004, Navarro et al. 2009). Por otro lado, Arneodo et al. (2015) diseñaron una herramienta molecular rápida y fácil para distinguir entre *H. armigera*, *H. zea* y *H. gelotopoeon*, que son las especies más complicadas de diferenciar entre sí. Esto genera nuevos desafíos, ya que antes de diseñar una determinada estrategia de control, es necesario poder identificar correctamente a estas especies.



**Figura 1.1.** Adultos de *Helicoverpa*. (A) *Helicoverpa gelotopoeon*, (B) *Helicoverpa armigera* y (C) *Helicoverpa zea*.

### 1.1.3. Origen y distribución geográfica

El género *Helicoverpa* necesita ser estudiado en el contexto de la subfamilia a la cual pertenece, Heliiothinae, que se considera que se ha diversificado en la segunda mitad de la era Cenozoica, es decir, hace aproximadamente veinte millones de años (Cho et al. 1995). Los orígenes de los linajes de este género no son claros pero probablemente

correspondan a Australia, ya que la especie basal de este género, *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) y otros antecesores del clado *Heliocheilus* se encuentran allí (Matthews 1999). Se considera que el linaje de estas especies posiblemente divergió en Australia debido a la naturaleza árida predominante en sus hábitats, caracterizados por lluvias variables y flora diversa a lo largo de grandes áreas. La diversificación subsecuente del género ha sido caracterizada a través de la migración y el establecimiento de especies aisladas alrededor del mundo, presumiblemente mediante eventos fundadores. La especie de ramificación más antigua encontrada fuera de Australia es justamente *H. gelotopoeon*, presente en Sudamérica (Goldsmith y Marec 2010).

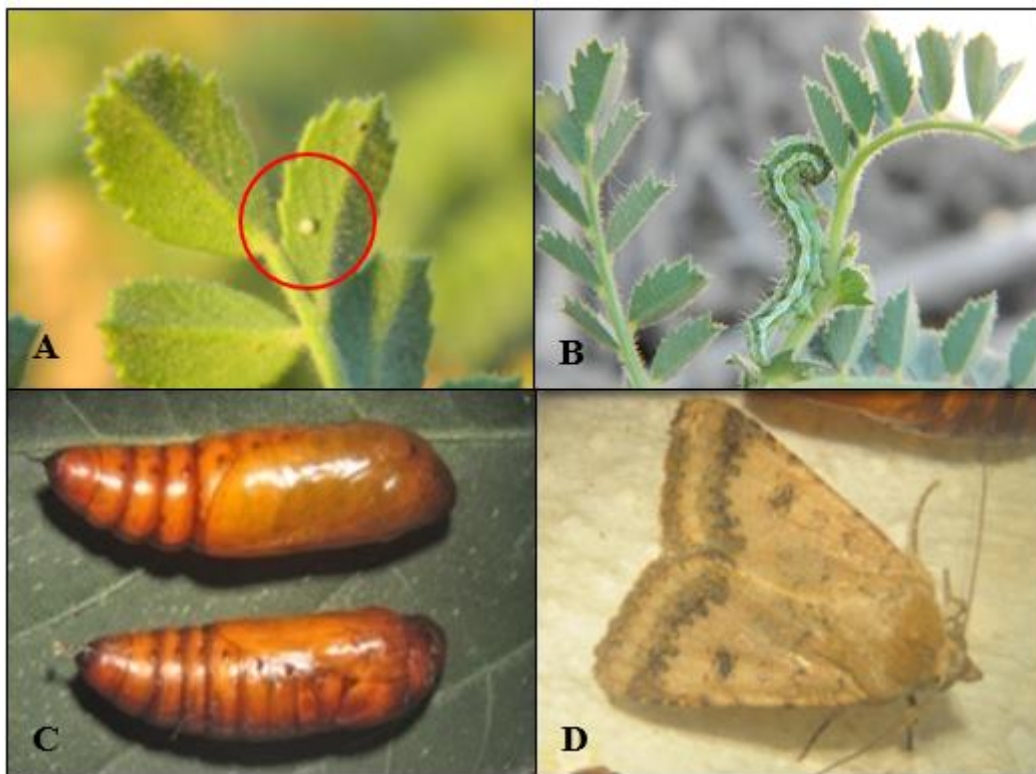
*Helicoverpa gelotopoeon* es una especie endémica de Sudamérica, ha sido reportada en la Argentina, Uruguay, Paraguay, Brasil y Chile (Hardwick 1965, Biezanko et al. 1974, González 1989, Pastrana 2004, Specht et al. 2005, Navarro et al. 2009, Candia 2013). Dentro de Argentina, se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Entre Ríos, Jujuy, La Rioja, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero, Río Negro y Tucumán (Hardwick 1965, Pastrana 2004).

#### **1.1.4. Biología y ciclo de vida de *H. gelotopoeon***

Las hembras de *H. gelotopoeon* depositan sus huevos individualmente en los brotes terminales de los cultivos. Los huevos son de color blanco perlado, estriados y de 0,5 mm de diámetro aproximadamente. El periodo embrionario es de tres días (Figura 1.2A). De estos huevos nacen larvas de color oscuro. Las larvas de esta especie presentan cinco estadios, alcanzando un tamaño entre 35 y 40 mm al final de su período larval, el cual se desarrolla entre 15 y 20 días (Figura 1.2B). La larva tiene cuerpo de grosor uniforme, segmentos bien marcados y el último segmento abdominal tiene una caída

particular en ángulo de 45 grados. La coloración es variable según el régimen alimenticio, desde castaño verdoso a castaño oscuro (Figura 1.3). Su cuerpo está cubierto de setas largas y claras. Se destaca a lo largo del cuerpo una banda lateral amarilla de forma zigzagueante y cuando cae al suelo, presenta el hábito de enroscarse en espiral sobre sí misma (Navarro et al. 2009). Posteriormente las larvas pupan en el suelo, siendo este el estadio en el que pasan las condiciones adversas durante el invierno (Margheritis y Rizzo 1965) (Figura 1.2C).

El adulto presenta las alas anteriores de color castaño amarillento, con una tenue banda subterminal y una mancha orbicular parda oscura. Las alas posteriores son de color castaño claro (Figura 1.2D). Esta especie completa su ciclo en aproximadamente 30 a 40 días (Navarro et al. 2009).



**Figura 1.2.** Detalle de los estados de desarrollo de *Helicoverpa gelotopoeon*. (A) Huevo, (B) Larva, (C) Pupa, (D) Adulto.



**Figura 1.3.** Larvas de *Helicoverpa gelotopoeon* mostrando distinta coloración

#### **1.1.5. Plantas hospederas**

*Helicoverpa gelotopoeon* es una plaga polífaga que ha sido citada alimentándose de varios cultivos y plantas hospederas tales como soja (*Glycine max* L.; Fabales: Fabaceae), garbanzo (*Cicer arietinum* L.; Fabales: Fabaceae), algodón (*Gossypium hirsutum* L.; Malvales: Malvaceae), girasol (*Helianthus annuus* L.; Asterales: Asteraceae), maíz (*Zea mays* L.; Poales: Poaceae), alfalfa (*Medicago sativa* L.; Fabales: Fabaceae), tomate (*Solanum lycopersicum* L.; Solanales: Solanaceae), lino (*Linum usitatissimum* L.; Malpighiales: Linaceae), poroto (*Phaseolus vulgaris* L.; Fabales: Fabaceae), papa (*Solanum tuberosum* L.; Solanales: Solanaceae), cebolla (*Allium cepa* L., Asparagales: Amaryllidaceae), arveja (*Pisum sativum* L., Fabales: Fabaceae) y también fue citada en malezas como *Physalis angulata* (L.; Solanales: Solanaceae) y *Carduus* spp (Asterales: Asteraceae) (Biezanko et al. 1974, González 1989, Cork y Lobos 2003, Navarro et al. 2009).



### 1.1.6. Daños e importancia económica

Es una oruga típicamente semillera ya que busca alimentos con elevados contenidos proteicos, atacando preferentemente las vainas de soja, las cápsulas del lino, las peras del algodón y los cascabullos del garbanzo (Parisi y Iannone 1978). En soja también suele actuar como cortadora de tallos, pecíolos e inflorescencias, así como defoliadora (Iannone y Leiva 1993) (Figura 1.4).

Entre los factores que favorecen su ataque, se destacan la ocurrencia de sequía, las altas temperaturas y la presencia de cultivos con entresurcos abiertos (por cultivares de ciclo corto, fecha de siembra o sequía), que son propicios para la oviposición de los adultos (Navarro et al. 2009). En sus primeros estadios la larva teje una tela de seda con la que pliega el folíolo donde se encuentra causando una defoliación leve y lo abandona a partir del tercer estadio larval, dando comienzo al corte de brotes terminales y pecíolos. Vacía cápsulas de lino, consume flores y semillas de girasol, frutos de tomate y peras de algodón. En alfalfa y trébol, ataca brotes, hojas y flores (Navarro et al. 2009).

Estudios realizados en garbanzo por Moscardó et al. (2013), determinaron una disminución en el rendimiento de garbanzo de hasta el 38% producido por esta plaga. Así mismo, Scalora et al. (2012) reportaron que *H. gelotopoeon* es capaz de dañar el 81,80% del stand de plantas de soja. También hay reportes de que esta especie puede consumir 340 cm<sup>2</sup> de hojas de soja (Navarro et al. 2009) y que las larvas de los últimos estadios pueden consumir hasta 15 granos de soja (Iannone y Leiva 1993). Por lo tanto, si se tiene en cuenta que Argentina es el tercer productor mundial de soja (18 millones de ha de acuerdo a Bolsa de cereales 2018), la ocurrencia de esta especie inflige grandes pérdidas económicas para el país.



**Figura 1.4.** Daños producidos por *Helicoverpa gelotopoeon* en distintas etapas y cultivos. (A y B) Daños en garbanzo en etapa vegetativa, (C y D) Daños en garbanzo en etapa reproductiva, (E) Daños en soja en etapa vegetativa y (E) Daños en soja en etapa reproductiva (F)

### 1.1.7. Monitoreo de *H. gelotopoeon*

El monitoreo, tanto de huevos, larvas y adultos, es fundamental para aplicar estrategias de manejo eficientes. Para el monitoreo de larvas se recomienda el uso del paño vertical, evaluándose el número de larvas por metro lineal de cultivo y discriminándolas en orugas chicas (<1 cm) y grandes (>1 cm) (Figura 1.5B) (Scalora et al. 2012). También se recomienda la observación directa de brotes ya que *H. gelotopoeon* acostumbra en sus primeros estadios plegar el folíolo en donde se encuentra, pudiendo pasar de esta manera desapercibida. Esta observación directa de brotes es importante ya que permite también detectar los huevos (Figura 1.5A) (Scalora et al. 2014). Para el monitoreo de adultos se pueden utilizar trampas de luz y feromonas, siendo esta última la

más común (Figura 1.5C). Para ello se recomienda una revisión semanal para determinar el número de adultos de *H. gelotopoeon* capturados (Scalora et al. 2012, 2014).

Considerando que esta especie es difícil de identificar, tanto en estado de larva como adulto, debido a su semejanza con las otras especies del complejo Heliiothinae presentes en el Noroeste Argentino (*H. armigera*, *H. zea* y *C. virescens*), es importante realizar una correcta identificación a fin de corroborar que la especie se trata con seguridad de *H. gelotopoeon*.



**Figura 1.5.** Tipos de monitoreo de *Helicoverpa gelotopoeon*. (A) Monitoreo mediante observación directa de brotes, (B) Monitoreo mediante paño vertical y (C) Monitoreo mediante trampa de feromonas.

### 1.1.8. Manejo y control de la plaga

Dentro de las estrategias utilizadas para el control de la plaga se destacan las siguientes:

Control químico: Es una de las herramientas de mayor eficacia para el control de orugas bolilleras. Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta especie pertenece a un

género que cuenta con numerosos antecedentes de resistencia a insecticidas (Forrester et al. 1993, Armes et al. 1996, Pietrantonio et al. 2007), por lo cual la rotación de insecticidas con diferentes modos de acción resulta fundamental.

Otro aspecto a tener en cuenta es el hábito propio de las larvas de los primeros estadios que se encuentran protegidas dentro del brote (Figura 1.6A). En este caso, las mismas morirán por ingestión y no por contacto, siendo fundamental garantizar la calidad de la aplicación, procurando cubrir toda la hoja y utilizar productos de acción translaminar para llegar al blanco. Estudios realizados en la EEAOC indicaron que se obtuvieron mejores controles cuando las aplicaciones fueron realizadas sobre larvas pequeñas principalmente; las larvas grandes ingresan al interior de las vainas a consumir los granos, lugar donde es difícil lograr una llegada aceptable de los insecticidas (Figura 1.6B) (Herrero et al. 2015).

En estos casos, cuando la bolillera está comiendo sólo los granos y tiene una parte del cuerpo introducida dentro de las vainas, se deben utilizar insecticidas con poder de volteo, para detener el daño inmediatamente, e insecticidas de contacto (ya que están ingiriendo granos que difícilmente sean alcanzados por el insecticida). Además, es fundamental la calidad de la aplicación en bajo volumen y con gotas chicas y concentradas (Álvarez y Abbate 2013).



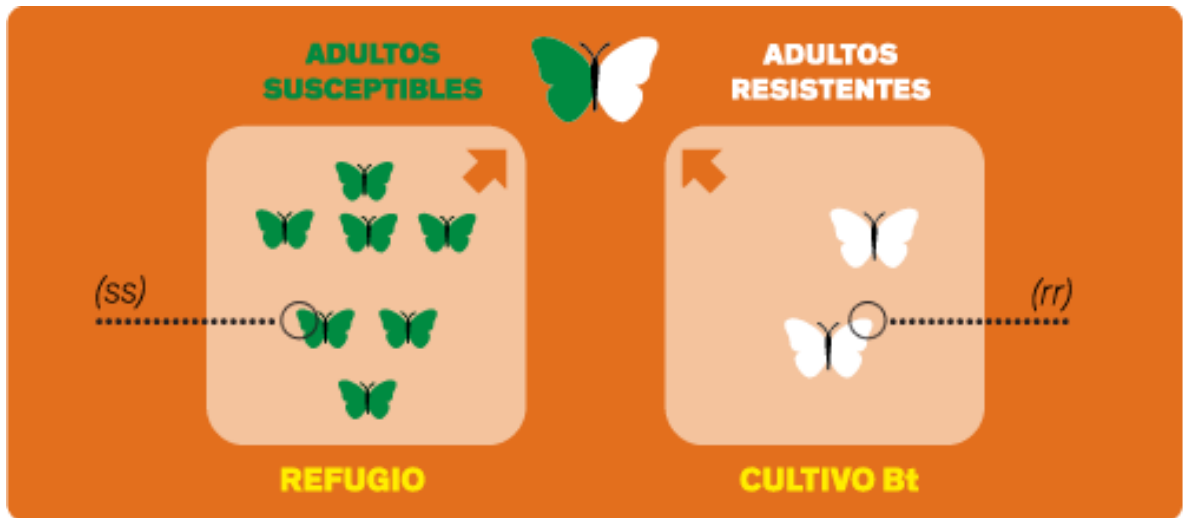
**Figura 1.6.** Aspectos comportamentales de *Helicoverpa gelotopoeon* a considerar para su control. (A) Larva pequeña protegida dentro del brote, (B) Larva del último estadio ingresando al cascabullo.

Control biológico: No hay alternativas de control biológico desarrolladas para el manejo de *H. gelotopoeon*. Sin embargo, hay reportes de ciertos enemigos naturales afectando a esta especie, como por ejemplo nematodos del género *Steinernema* (Caccia et al. 2014), baculovirus (Ferrelli et al. 2016) y el parasitoide ocasional *Campoletis grioti* (Murúa et al. 2009).

Cultivos Bt: Actualmente, para el manejo de esta plaga en el cultivo de soja y algodón, una de las herramientas más recomendadas es la tecnología Bt que presenta toxinas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). La principal preocupación con respecto a esta tecnología es la aparición de la resistencia a las endotoxinas Bt, ya que el uso masivo de estos cultivos ejerce una alta presión de selección sobre la población de insectos blanco. Esto trae aparejado un alto riesgo de desarrollo de resistencia si no se realiza un manejo adecuado (Roca 2002). Una de las estrategias actuales se basa en el uso de “refugios”, es decir parcelas de cultivos convencionales (no Bt) o de plantas hospederas naturales dentro del lote Bt, cuyo objetivo es garantizar nuevas generaciones de insectos susceptibles que se crucen con aquellos especímenes resistentes que eventualmente

puedan surgir del cultivo Bt, a fin de garantizar una descendencia también susceptible que siga siendo controlada por tecnología Bt (Tabashnik y Carrière 2008, García Degano et al. 2009). Sin embargo, para que estos individuos puedan ser considerados efectivamente como una fuente de susceptibilidad para el manejo de la resistencia, las plantas hospederas alternativas deben contener una población capaz de cruzarse al azar con los individuos que emerjan de los cultivos Bt (Martel et al. 2003, Tabashnik y Carrière 2008) (Figura 1.7). Por lo tanto, las medidas que se adopten (uso de refugios de cultivos convencionales o plantas hospederas naturales como pasturas), deben contemplar el grado de flujo génico entre individuos provenientes de distintas plantas hospederas y/o regiones. Si bien aún no se han detectado biotipos para especies del género *Helicoverpa*, se sabe que los biotipos encontrados para otras especies plagas presentan diferencias genéticas y mecanismos de aislamiento reproductivo (Pashley 1986, Groot et al. 2010, Velásquez-Vélez et al. 2011).

Esto agrega complejidad al problema, ya que se restringiría aún más el espectro de plantas hospederas fuente de individuos susceptibles.



**Figura 1.7.** Esquema representando la función de un refugio en la generación de individuos susceptibles al cultivo Bt. (Fuente: Dow AgroSciences)

### 1.1.9. Variación fenotípica y/o genotípica

No existen estudios sobre la variación fenotípica y/o genotípica de poblaciones de *H. gelotopoeon*. Sin embargo, hay numerosos estudios al respecto para otras especies de *Helicoverpa* (Manjunath et al. 1970, Silva et al. 2017, 2018).

Hay estudios que sugieren que *H. armigera* podría ser categorizada en biotipos, basados en sus preferencias por plantas hospederas y donde se encontró que estos biotipos no se aparean al azar (Bhattacharjee y Gupta 1972). Kranthi et al. (1997) encontraron variación en mecanismos metabólicos variables mediando la resistencia a piretroides en *H. armigera*, sugiriendo que esto podría estar relacionado a que las poblaciones utilizadas para el estudio provenían de diferentes cultivos. Del mismo modo, también se registraron respuestas diferenciales a feromonas (Tamhankar et al. 2003) y parasitoides (Manjunath et al. 1970) para poblaciones de *H. armigera*.

Por otro lado, Vijaykumar et al. (2007) y Silva et al. (2017) no encontraron diferencias significativas en parámetros biológicos y reproductivos cuando trabajaron con poblaciones de *H. armigera* provenientes de distintos cultivos y/o regiones.

En cuanto a estudios genéticos, análisis realizados con marcadores moleculares revelaron poblaciones estructuradas para *H. armigera* y *C. virescens* (Bashasab et al. 2004, Scott et al. 2005, Subramanian y Mohankumar 2006, Khiaban et al. 2010, Domingues et al. 2012, Yenagi et al. 2012, Behere et al. 2013). Sin embargo, otros autores encontraron para estas mismas especies poblaciones no estructuradas (Vassal et al. 2008, Albernaz et al. 2012, Asokan et al. 2012, Mastrangelo et al. 2014, Silva et al. 2018), con lo cual se puede concluir que la estructuración poblacional de los Heliothinae no presenta un patrón definido y es necesario estudiar cada situación en particular.

El estudio fenotípico y genotípico de las poblaciones de una especie plaga influye en la implementación de estrategias de manejo adecuadas, ya que el hábito polífago de algunas especies puede provocar la aparición de biotipos (Drès y Mallet 2002), los cuales pueden presentar diferencias en parámetros biológicos, reproductivos, aspectos comportamentales y/o polimorfismos genéticos (Lu y Adang 1996). La falla en reconocer estos biotipos puede complicar los esfuerzos para su erradicación, dado que distintos biotipos pueden responder de manera diferente a las mismas medidas de control.

## **1.2. Especiación**

### **1.2.1. Concepto de especie**

Cualquier proceso que implique la aparición de independencia genética o ecológica es un factor de especiación, siendo estos factores los que en conjunto han



generado la gran abundancia de categorías de seres vivos que pueblan la tierra (Perfectti 2002).

Aunque el concepto de especie es básico dentro de la biología, no hay un claro consenso para su definición, como se pone claramente de manifiesto por el gran número de intentos de definición de “especie” que han ido apareciendo a lo largo de los años (de Queiroz 2007).

Sin embargo, la definición que más se ajusta a los objetivos del presente estudio, es el concepto biológico de especie propuesto por Mayr en 1942 según el cual se define a una especie como: “Grupos de poblaciones con capacidad real o potencial de entrecruzarse entre sí, que están aislados reproductivamente de otros grupos similares”. Esta definición es la más utilizada por los biólogos evolutivos interesados en identificar los mecanismos de especiación, puesto que establece criterios tangibles (reproducción sexual y viabilidad de la descendencia) sujetos al escrutinio experimental de especiación.

Si bien la mayoría de los investigadores aceptan que la especiación es más o menos un proceso continuo en el cual la variación genética se vuelve segregada entre las poblaciones, la ruta exacta hacia la especiación continúa siendo discutida (Turelli et al. 2001).

### **1.2.2. Aislamiento reproductivo y barreras al flujo genético entre especies**

El aislamiento reproductivo puede ser producido por diversas barreras reproductivas, que se pueden clasificar en precigóticas y postcigóticas, dependiendo de en qué momento actúan. Las barreras precigóticas implican impedimentos para la formación de cigotos. Las barreras postcigóticas, por otro lado, resultan de todas aquellas situaciones en las que los cigotos, o los individuos adultos en caso de que lleguen a

completar su desarrollo, tienen prácticamente anulada su eficacia biológica (Coyne y Orr 2004).

Las barreras precigóticas engloban todas aquellas situaciones que implican que las dos especies no puedan aparearse:

-Aislamiento temporal: Ocurre cuando las poblaciones no coinciden en sus periodos reproductivos (Templeton 1989).

-Aislamiento por diferenciación de hábitat: Ocurre frecuentemente entre especies que se han especializado en un determinado recurso o hábitat y la fecundación se localiza en un mismo hábitat. Otro ejemplo es cuando los migrantes entre poblaciones sufren una supervivencia reducida porque están pobremente adaptados a su hábitat no nativo. Esta inviabilidad de los inmigrantes puede reducir directamente el flujo génico entre las poblaciones al disminuir la tasa de encuentros de apareamiento heteropoblacionales (Nosil et al. 2005, Matsubayashi et al. 2010).

-Aislamiento etológico: Se produce cuando individuos de sexo opuesto pero de especies diferentes se encuentran pero no se reconocen como potenciales parejas sexuales (Ehrman 1964, Dobzhansky et al. 1967, Nosil et al. 2005).

-Aislamiento mecánico o fisiológico: Aparece cuando hay una imposibilidad morfológica para que se produzca la transferencia de gametos, debido principalmente a que las genitalias de ambas especies han divergido sustancialmente (Eberhard 1985, 2009, 2010, Sirot 2003, Hosken y Stockley 2004).

Las barreras postcigóticas pueden deberse a incompatibilidades genéticas entre genomas divergentes, causados por interacciones negativas entre genes que difieren entre las poblaciones, cuando estos genes son reunidos en los híbridos (Rice y Hostert 1993, Rundle y Whitlock 2001). Estas incompatibilidades reducen la eficacia biológica de los

híbridos y no dependen de una interacción ecológica entre fenotipo y ambiente. Dentro de estas barreras encontramos la mortalidad de los cigotos, la inviabilidad de los híbridos y la esterilidad de los híbridos. Los cigotos híbridos pueden no desarrollarse y abortarse al poco tiempo de su formación o bien durante alguna fase más tardía de su desarrollo/metamorfosis (Dobzhansky 1937, Muller 1942). Sin embargo, algunos híbridos pueden presentar heterosis o vigor híbrido, aunque por el contrario, generalmente son estériles. La inviabilidad y esterilidad de los híbridos puede aparecer tanto en F1 como en F2 o en los retrocruzamientos con los parentales (Coyne y Orr 2004, Johnson 2008). A veces los híbridos no presentan ningún problema reproductivo, pero pueden tener su eficacia biológica reducida frente a las especies parentales. Eso es lo que se conoce como “subdominancia ecológica” (Dobzhansky 1937, Muller 1942). Esto puede producirse cuando la eficacia biológica del híbrido es reducida a causa de una desigualdad entre los fenotipos intermedios del híbrido y el ambiente. En este caso, los híbridos F1 son intermedios entre las formas parentales en caracteres adaptativos y por lo tanto exhiben una eficacia biológica menor en la planta hospedera/ ambiente que la forma parental nativa (Matsubayashi et al. 2010).

### **1.2.3. Tipos de especiación**

Existen varios criterios para clasificar los tipos de especiación, siendo el más empleado el espacial. De esta manera, de acuerdo a los patrones de separación geográfica que presentan las poblaciones en proceso de divergencia, se puede distinguir la especiación alopátrica, parapátrica y simpátrica.

La especiación alopátrica consiste en la separación geográfica de un acervo genético continuo, de tal forma que se lleguen a producir dos o más poblaciones geográficas aisladas (Mayr 1963, Campbell et al. 1999).

La especiación parapátrica se produce sin una separación geográfica completa de las poblaciones. De hecho, la especie hija puede compartir parte del rango de distribución con la especie madre e hibridar en las zonas de contacto (Gravilets et al. 2000).

La especiación simpátrica, por último, implica la divergencia de algunos demos hasta conseguir independencia evolutiva dentro de un mismo espacio geográfico, es decir, es la evolución del aislamiento reproductivo sin barreras geográficas (Berlocher y Feder 2002, Bolnick y Fitzpatrick 2007). Este tipo de especiación ha estado íntimamente relacionada a la entomología desde el año 1867, cuando Benjamin Walsh propuso que muchos insectos específicos de una planta hospedera surgieron en el proceso de cambiar y adaptarse a nuevas especies de plantas. Walsh fue inspirado por el cambio de *Rhagoletis pomonella* (Walsh), del espino (*Crataegus* spp.) a la manzana domesticada (*Malus pumila* Borkh), formando lo que se conoce como “raza de hospedero”, siendo este uno de los modelos más conocidos de especiación simpátrica (Walsh 1867).

Desde entonces, si bien la aceptación de la especiación simpátrica ha tenido sus altibajos, en las últimas décadas, con la evidencia de razas de hospedero en insectos y divergencia ecológica en peces, la especiación simpátrica ha ganado una aceptación mucho más amplia. Es así que un número cada vez mayor de casos de diferenciación asociada al hospedero ha sido documentada en insectos (Berlocher y Feder 2002, Dopman et al. 2002, Funk et al. 2002, Simon et al. 2003, Wang et al. 2017).

En relación a esto, Drès y Mallet (2002) elaboraron una definición actualizada de raza hospedera, construida a partir de los criterios enunciados en Jaenike (1981) y Bush

(1992). Según ellos, las razas de hospedero son grupos de poblaciones que son definidas de la siguiente manera:

- Usan diferentes taxones de hospederos en su estado silvestre.
- Consisten en individuos que exhiben “fidelidad al hospedero”, es decir, están asociados a hospederos particulares.
- Coexisten en simpatría en al menos una parte de su rango.
- Están genéticamente diferenciadas en más de un locus.
- Están más diferenciadas genéticamente de poblaciones en otro hospedero en simpatría (y al mismo tiempo) que de algunas poblaciones distantes geográficamente en el mismo hospedero.
- Muestran una correlación entre la elección del hospedero y la elección de la pareja.
- Experimentan flujo génico a una tasa apreciable (aproximadamente  $m \geq 1\%$  por generación)

Finalmente, es probable que las especies de diferentes razas de hospedero:

- Tengan mayor eficacia biológica en los hospederos nativos que los alternativos.
- Produzcan híbridos menos aptos que las formas parentales.

Sin embargo, recientes trabajos sobre insectos fitófagos han mostrado que el proceso frecuentemente extendido de especiación puede tener múltiples modalidades involucrando etapas tanto simpátricas como alopátricas (Feder et al. 2003, Xie et al. 2007).

### **1.3. Genética de poblaciones**

La genética de poblaciones es el estudio teórico y experimental del modo en que se hereda la variación genética en las poblaciones y cómo cambia esa variación en el tiempo y en el espacio (Griffiths et al. 2002). La variabilidad genética provee la materia prima para todo cambio evolutivo.

El concepto moderno postula que el cambio evolutivo se produce por los efectos combinados de varias fuerzas: selección natural, flujo génico, deriva génica y mutación (Merrell 1981). Justamente, un foco primario de la genética de poblaciones molecular es hacer inferencias acerca de la contribución de cada una de estas fuerzas para producir los patrones de variación en las secuencias de ADN que se observan en la actualidad en determinadas poblaciones (Hartl y Clark 1997).

#### **1.3.1. Flujo génico y estructura genética de las poblaciones**

El flujo génico es el movimiento de genes de una población a otra (Mallet 2001). El flujo génico es indudablemente uno de los procesos más importantes en la genética de poblaciones. En su ausencia, la combinación de mutación, deriva génica y selección natural ocasiona que las poblaciones diverjan genéticamente unas de otras, mientras que en presencia del flujo génico las poblaciones pueden ser mantenidas como unidades (Freeland 2005). Si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, entonces todas las poblaciones evolucionan de manera conjunta, pero si es muy bajo, las poblaciones de una especie empiezan a divergir y pueden evolucionar casi independientemente. Si continúa la diferenciación, puede llegar a surgir aislamiento

reproductivo y en consecuencia el establecimiento de linajes evolutivamente independientes (es decir, se da un proceso de especiación) (Eguiarte et al. 2015).

A su vez, la estructura genética puede ser descripta como la distribución de la variación genética como el resultado de la migración, selección, mutación, deriva génica y factores relacionados (Roderick 1996).

El estudio de la estructura genética de una especie es de vital importancia porque permite identificar poblaciones que requieren ser consideradas como distintas unidades de manejo. Esto adquiere importancia en el marco del manejo integrado de plagas, ya que poblaciones genéticamente diferentes pueden variar en su susceptibilidad a enemigos naturales y otras tácticas de control (Joyce et al. 2014). Por lo tanto, el éxito en la implementación de una herramienta de manejo adecuada para una determinada especie, dependerá en gran medida de la capacidad para determinar correctamente la estructura genética de sus poblaciones.

### **1.3.2. Uso de marcadores moleculares para el análisis genético de poblaciones**

Actualmente, avances en la biología molecular proveen herramientas poderosas que permiten revelar variaciones genéticas. Los marcadores moleculares permiten, entre otras cosas, cuantificar la diversidad genética, estimar la deriva génica, medir la endogamia, identificar fósiles, caracterizar nuevas especies e inferir patrones históricos de dispersión. Los marcadores moleculares son una fuente muy grande de información dado que son capaces de generar datos de las moléculas altamente variables de ADN que pueden ser encontradas en casi todos los seres vivos (Freeland 2005).

Los diferentes tipos de marcadores se distinguen principalmente por la forma en que se generan, la capacidad para detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y el

comportamiento de tipo dominante o co-dominante (Simpson 1997). Los marcadores “ideales” cumplen una serie de características, entre las que se destacan (Kesawat y Das 2009):

- Altamente polimórficos,
- Herencia codominante,
- Fácil generación,
- Comportamiento selectivo neutral,
- Bajo costo,
- Fácil y rápido análisis,
- Ocurrencia frecuente en el genoma
- Alta reproducibilidad

Los marcadores moleculares pueden generarse tanto a partir del ADN nuclear como del ADN mitocondrial (ADNmt) (Freeland 2005). El ADNmt está involucrado en la respiración celular; en insectos contiene 13 genes codificantes de proteínas, 22 ARNs de transferencia y dos ARNs ribosómicos. La mayoría de las secuencias son únicas, no son repetitivas y hay poca evidencia de secuencias espaciadoras entre genes o secuencias intervinientes entre genes transcritos. Aunque se ha encontrado reorganización en algunos genes mitocondriales en diferentes especies animales, en general la estructura, tamaño y organización de sus genes es relativamente conservada. En la mayoría de los animales, el ADNmt es heredado maternalmente, lo que significa que se transmite de las madres a sus hijos (Freeland 2005).

Hay varias razones por las cuales los marcadores de ADNmt han sido usados extensivamente en la genética de poblaciones de animales. Primero, el ADNmt es relativamente fácil para trabajar. Su tamaño pequeño, sumado a la organización



conservada de los genes, permite que muchos pares de cebadores universales amplifiquen regiones del ADN de la mitocondria en una amplia variedad de vertebrados e invertebrados. Esto significa que los datos pueden ser obtenidos sin ningún conocimiento previo de la secuencia del ADNmt de una especie (Freeland 2005).

En segundo lugar, aunque la organización de los genes es conservada, la tasa de mutación es alta (ha sido estimada en  $5,7 \times 10^8$  por sitio por año) (Brown et al. 1982). Esto significa que el ADNmt revela niveles de polimorfismo relativamente altos y por lo tanto con frecuencia revelarán múltiples linajes genéticos tanto dentro como entre las poblaciones (Freeland 2005).

La tercera propiedad relevante del ADNmt, es su falta de recombinación general, lo que significa que la descendencia usualmente tendrá (sin tener en cuenta la mutación) exactamente el mismo genoma mitocondrial que la madre. Esto significa que los linajes individuales pueden ser rastreados a través del tiempo y el espacio con relativa facilidad, razón por la cual son muy usados en filogeografía (Freeland 2005).

Finalmente, como el ADNmt es haploide y heredado uniparentalmente, es efectivamente un cuarto del tamaño poblacional del ADN nuclear diploide. Como hay menos copias de ADNmt con las cuales comenzar, es relativamente sensible a eventos demográficos como cuellos de botella. Esto ocurre cuando el tamaño de la población es temporalmente reducido; aún si la población se recupera rápidamente, tendrá pocos haplotipos mitocondriales sobrevivientes comparado con los genotipos nucleares (Freeland 2005).

Sin embargo, en eucariontes, la mayor parte de la información genética se encuentra contenida en el núcleo de la célula. El ADN nuclear se encuentra empaquetado y asociado a proteínas histonas, conformando los cromosomas (Klug et al. 2006). El ADN nuclear contiene regiones únicas (de una sola copia) y no únicas (duplicadas) o regiones

repetitivas (Stansfield 1992). Se considera que los organismos diploides tienen dos copias de cada locus en los pares homólogos de los cromosomas, llamadas alelos, sin tener en cuenta si contienen regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones) (Alcántara 2007).

Los marcadores nucleares ofrecen la promesa de casi ilimitados loci para el análisis de la estructura genética (Roderick 1996). En forma general, son amplificados (vía PCR, de sus siglas en inglés de “polymerase chain reaction”) usando cebadores de ADN que flanquean una región en particular y las variantes en tamaño resultantes pueden ser visualizadas a través de la electroforesis. Dentro de los marcadores nucleares, los microsatélites ofrecen un conjunto valorable de variación genética que es particularmente útil cuando otros métodos muestran variabilidad insuficiente. Además, son marcadores codominantes, lo que permite distinguir a los heterocigotas (Roderick 1996).

Tanto el ADNmt como el nuclear se han usado extensivamente en estudios filogenéticos y evolutivos, aunque los genomas nucleares son de mayor preferencia, porque en general evolucionan más rápidamente que los de las organelas y porque su mayor tamaño genómico proporciona un número mucho más alto de polimorfismos. Por otra parte, la información evolutiva que ambos tipos de genomas (mitocondrial y nuclear) aportan es distinta y complementaria en aquellas especies (la mayoría) en que las organelas son heredadas uniparentalmente (Pérez de la Vega 1997).

Por lo tanto, teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de la información provista por los genomas de distinta herencia, es interesante estudiar las ventajas que ofrece el uso de múltiples marcadores moleculares que tengan modos de herencia contrastantes (Freeland 2005).

Teniendo en cuenta todo lo previamente mencionado y considerando la falta de información sobre la biología, compatibilidad reproductiva y genética de poblaciones de

*H. gelotopoeon*, en el marco de esta tesis doctoral se realizaron estos estudios. Esta investigación permitirá aportar conocimientos sobre los aspectos básicos de esta plaga en vistas de proponer estrategias para un manejo adecuado de la especie en Argentina.

#### **1.4. Hipótesis**

Las características biológicas y la distribución de plantas hospederas de *H. gelotopoeon* favorecen la aparición de biotipos que pueden ser caracterizados a nivel molecular y biológico.

#### **1.5. Objetivo general**

Determinar la naturaleza de la estructura genética de las poblaciones de *H. gelotopoeon* en función de distintas plantas hospederas y regiones de la Argentina en base a características biológicas y moleculares.

##### **1.5.1. Objetivos específicos**

1. Caracterizar los parámetros biológicos de poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de diferentes cultivos de distintas regiones de la Argentina.
2. Determinar el grado de compatibilidad reproductiva entre las poblaciones de *H. gelotopoeon* recolectadas en diferentes cultivos de distintas regiones de Argentina.
3. Determinar la presencia de biotipos o “strains” de *H. gelotopoeon* a través de la detección de polimorfismos genéticos.

**4.** Analizar la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *H. gelotopoeon* sobre la base de marcadores moleculares.

**5.** Establecer si las diferencias biológicas y el grado de compatibilidad reproductiva detectadas entre las distintas poblaciones de *H. gelotopoeon* se correlacionan a aquellas obtenidas a nivel molecular.

# Capítulo 2

---

**Tabla de vida y determinación del potencial biótico de *Helicoverpa gelotopoeon***



## 2.1. Introducción

El desarrollo de una estrategia de control adecuada, con el mínimo uso de pesticidas, requiere el conocimiento básico de la dinámica poblacional de la plaga (Pascua y Pascua 2002). Esto permite oportunamente predecir, planear, programar, organizar e integrar todos los métodos posibles de control. La información obtenida, posibilita diagnosticar la situación con respecto a una plaga antes de que se desarrolle (Romero 2004). En este sentido, las tablas de vida son una importante herramienta para entender las dinámicas poblacionales de los insectos y para generar conocimientos básicos para estudios adicionales, tales como análisis de comportamiento, cría masiva, respuesta a agentes y métodos de control, entre otros. Estas proveen una descripción resumida de la tasa específica de mortalidad por rango de edad, supervivencia para cada estado de desarrollo y reproducción y son útiles para revelar el máximo potencial de crecimiento de una población. El potencial biótico, a su vez, revela la máxima capacidad reproductiva de un organismo bajo condiciones ambientales óptimas (Silveira Neto et al. 1976). Desde el punto de vista del manejo de plagas, es muy importante conocer el estado más susceptible de una plaga y por ende los periodos más oportunos para su control (Kakde et al. 2014).

Actualmente no hay estudios utilizando tablas de vida, parámetros poblacionales ni evaluaciones del potencial biótico de *H. gelotopoeon*. Por lo tanto, para contribuir con información útil para el manejo de esta especie plaga, el objetivo de este capítulo fue la construcción de una tabla de vida y la estimación de parámetros poblacionales y el potencial biótico de esta especie criada sobre dieta artificial bajo condiciones controladas.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Recolección de las poblaciones**

Se recolectaron adultos de *H. gelotopoeon* en enero de 2017 con una trampa de luz en un campo comercial de soja en la localidad de San Agustín, departamento Cruz Alta, provincia de Tucumán, Argentina. Estos adultos fueron identificados acorde a los trabajos de Velasco de Stacul et al. (1969) y Navarro et al. (2009). Los adultos recolectados fueron colocados en jaulas cilíndricas con red metálica (40 cm de altura y 20 cm de diámetro) y transportados al laboratorio. Estas jaulas fueron colocadas en cámaras bajo condiciones controladas ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70-75% HR, 14: 10 L:O de fotoperiodo artificial) para iniciar las colonias experimentales. Se depositaron algunos individuos como especímenes voucher en la colección de insectos de la Sección Zoología Agrícola, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes.

### **2.2.2. Cría de las poblaciones**

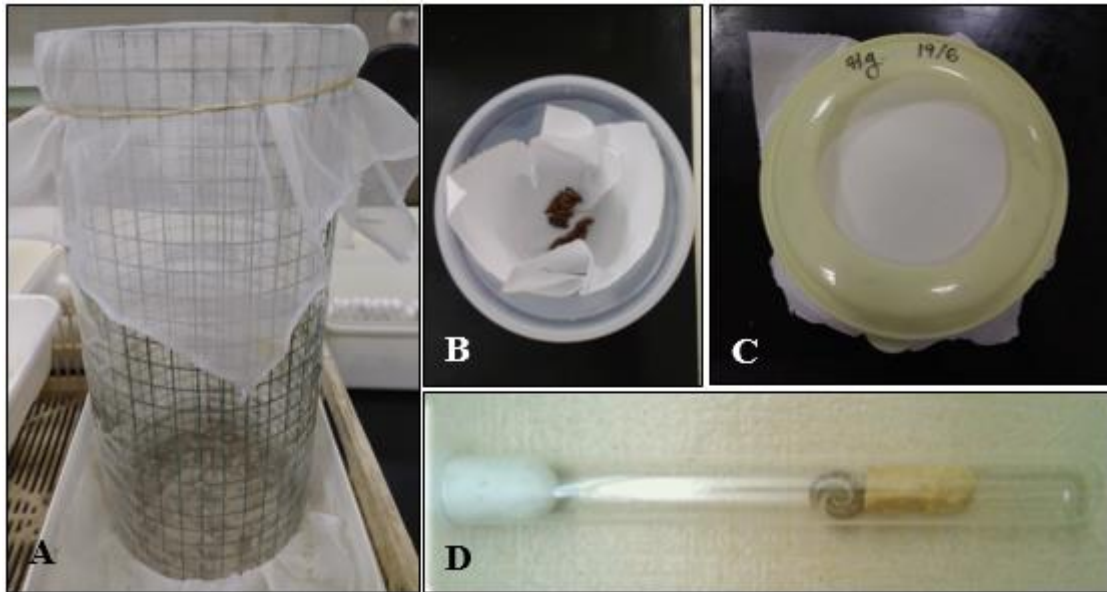
Los adultos recolectados en el campo comercial fueron colocados en cinco jaulas de oviposición similares a las descritas arriba con aproximadamente 25 hembras y 25 machos por jaula. Para permitir la aireación, ambos extremos de la jaula fueron cubiertos con tela de nylon. Esta población fue mantenida en la misma cámara bajo las mismas condiciones controladas a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70-75% HR y 14: 10 L:O de fotoperiodo artificial. La comida para adultos fue provista a través de un algodón saturado con una mezcla de agua y miel (1:1 vol:vol), que fue reemplazado todos los días. Las jaulas fueron revisadas todos los días para determinar la oviposición y la mortalidad de adultos.

Los huevos depositados fueron recolectados y colocados en recipientes plásticos de 750 ml. Una vez que emergieron, las larvas neonatas fueron ubicadas individualmente en tubos de vidrio con dieta artificial que incluía harina de garbanzo (Grandiet®, Buenos Aires, Argentina), germen de trigo (Grandiet®, Buenos Aires, Argentina), levadura de cerveza (Calsa®, Tucumán, Argentina), agar-agar (Todo Droga®, Córdoba, Argentina), vitamina C (Anedra®, Buenos Aires, Argentina), ácido sórbico (Anedra®, Buenos Aires, Argentina), benzoato de sodio (Todo Droga®, Córdoba, Argentina), suplemento vitamínico con aminoácidos (Ruminal®, Buenos Aires, Argentina), sales de Wesson (Todo Droga®, Córdoba, Argentina) y metilparaben (Todo Droga®, Córdoba, Argentina) (Murúa et al. 2003).

La dieta fue reemplazada cada dos o tres días. A medida que las larvas pupaban, las pupas fueron colocadas en recipientes de plástico con papel filtro humedecido hasta la emergencia de los adultos (Figura 2.1).

Luego de establecer una colonia para cada población, los individuos de la segunda y tercera generación fueron usados para estos estudios.





**Figura 2.1.** Elementos y materiales utilizados para la cría de los distintos estados de desarrollo de *Helicoverpa gelotopoeon*. (A) Jaula para adultos, (B) Recipiente para pupas, (C) Recipiente para huevos y (D) Tubos para individualización de larvas.

### 2.2.3. Parámetros biológicos y reproductivos

De la colonia experimental de *H. gelotopoeon*, se eligieron al azar 241 huevos para analizar el tiempo de desarrollo y la supervivencia de los diferentes estados (huevo, estadios larvales, pupa y adulto) y la proporción sexual resultante.

Cada huevo fue examinado por separado. Luego, en el estado de pupa, el sexo fue determinado de acuerdo a la forma y la posición de las aberturas genitales. Este procedimiento permitió evaluar los parámetros biológicos para ambos sexos, incluso durante su estado larval. Las larvas fueron revisadas diariamente para determinar la transición (muda) al siguiente estadio a través de la observación de cápsulas cefálicas, o la mortalidad.

#### 2.2.4. Tabla de vida y parámetros poblacionales

Se acondicionaron cohortes conformadas por una hembra virgen y un macho virgen (menos de 24 horas de edad) dentro de una jaula de oviposición cilíndrica, similares a las descritas anteriormente, para determinar la longevidad de los adultos y los parámetros reproductivos de las hembras.

La supervivencia de adultos y la oviposición de las hembras fueron registradas diariamente para calcular la supervivencia específica por edad ( $l_x$ , número de hembras vivas a la edad  $x$ ) y la fecundidad específica por edad ( $m_x$ , número de prole femenina producida por hembras a la edad  $x$ ). Estos parámetros fueron usados para construir las tablas de vida y para estimar los parámetros poblacionales de *H. gelotopoeon*.

Los parámetros poblacionales estimados fueron: tasa neta de reproducción [ $R_0 = \sum (l_x m_x)$ ], tiempo generacional [ $T = \sum (x l_x m_x) / \sum (l_x m_x)$ ], tasa intrínseca de crecimiento ( $r = \ln R_0 / T$ ), tiempo de duplicación poblacional ( $DT = \ln 2 / r$ ) y tasa finita de crecimiento ( $\lambda = e^r$ ). Se utilizaron las metodologías descritas por Carey (1993, 1995). Se usó un total de 31 cohortes para el ensayo.

#### 2.2.5. Potencial biótico

Luego de establecer los parámetros biológicos, el potencial biótico (PB) fue calculado usando la ecuación descrita en Silveira Neto et al. (1976):  $PB = (sr*d)^n - er$ , donde: (sr) proporción de sexos calculada como el número de hembras dividido por el número de hembras más machos; (d) individuos viables por hembra; (n) número de generaciones por año o 365 días dividido por el ciclo de vida total; y (er) resistencia ambiental. Se asumió que no había  $er$  ya que los insectos fueron criados en el laboratorio.

### **2.2.6. Análisis de datos**

Los parámetros biológicos entre machos y hembras de *H. gelotopoeon* fueron comparados usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (Lehmann 1975) ( $P < 0,05$ ). Todos los datos fueron analizados usando IBM SPSS Statistics (IBM Corp 2013), versión 22.0.

## **2.3. Resultados**

### **2.3.1. Diferencias sexuales en parámetros biológicos**

Todos los adultos utilizados para este estudio fueron previamente identificados como *H. gelotopoeon* (Velasco de Stacul et al. 1969, Navarro et al. 2009).

Un total de 95 adultos, 52 hembras y 43 machos, fueron usados para determinar los parámetros biológicos de *H. gelotopoeon*. La duración de cada estado de desarrollo está presentada en la Tabla 2.1. Los parámetros biológicos que mostraron diferencias significativas entre macho y hembra fueron: duración del estado de pupa ( $W = 2043$ ;  $P = 0,005$ ), longevidad de adultos ( $W = 1918$ ;  $P = 0,004$ ) y ciclo de vida ( $W = 2143$ ;  $P = 0,008$ ), que tuvieron una mayor duración para los machos (Tabla 2.1). La progenie tuvo una proporción de sexos de 1,19:1 (H:M). No se encontraron diferencias en la masa pupal ( $265,50 \pm 3,41$  mg y  $265,40 \pm 3,41$  mg para hembras y machos respectivamente) ni en la duración del ciclo larval entre ambos sexos.

**Tabla 2.1.** Duración en días (promedio  $\pm$  EE) de los estados de huevo, larva y pupa, longevidad de adultos y ciclo total para ambos sexos de *Helicoverpa gelotopoeon*.

Parámetros	Hembra	n	Rango	Macho	n	Rango
Huevo	3,2 $\pm$ 0,08a	52	2 - 5	3,2 $\pm$ 0,08a	43	2 - 5
Ciclo larval	13,9 $\pm$ 0,12a	52	13 - 17	13,9 $\pm$ 0,15a	43	12 - 16
Pupa	12,8 $\pm$ 0,17a	52	10 - 16	13,6 $\pm$ 0,22b	43	12 - 19
Longevidad adulto	16,8 $\pm$ 0,80a	52	6 - 34	19,4 $\pm$ 0,84b	43	8 - 32
Ciclo total	46,8 $\pm$ 0,82a	52	36 - 64	50,3 $\pm$ 0,72b	43	43 - 62

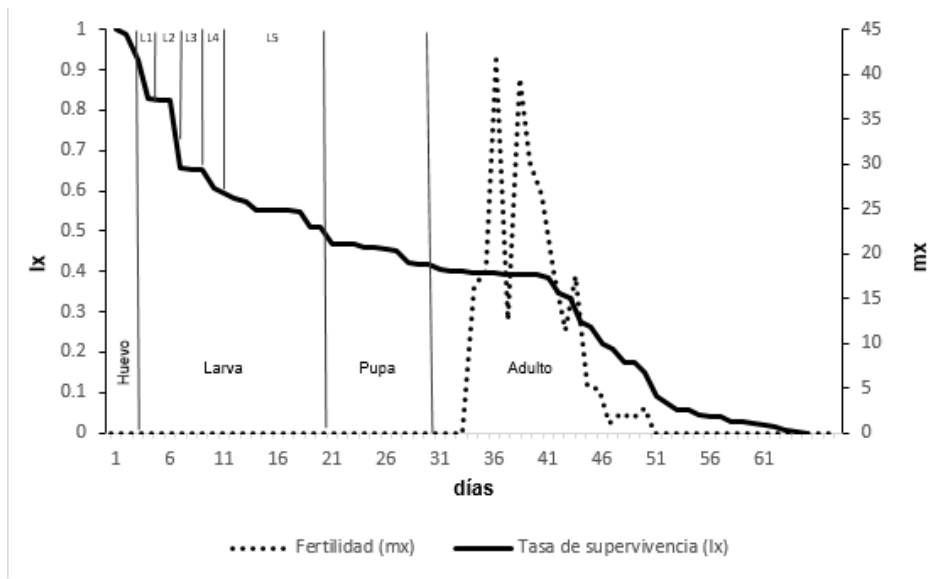
Valores sucedidos por las mismas letras dentro de una fila no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Wilcoxon ( $P > 0.05$ )

### 2.3.2. Tablas de vida y parámetros poblacionales

La tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) para *H. gelotopoeon* fue 95,49, lo cual indica que una hembra podría producir, en promedio, otras  $95,49 \pm 0,45$  nuevas hembras durante toda su vida. Debido a que el valor de “ $R_0$ ” fue mayor a 1, la población de *H. gelotopoeon* bajo condiciones de laboratorio aumentó en tamaño.

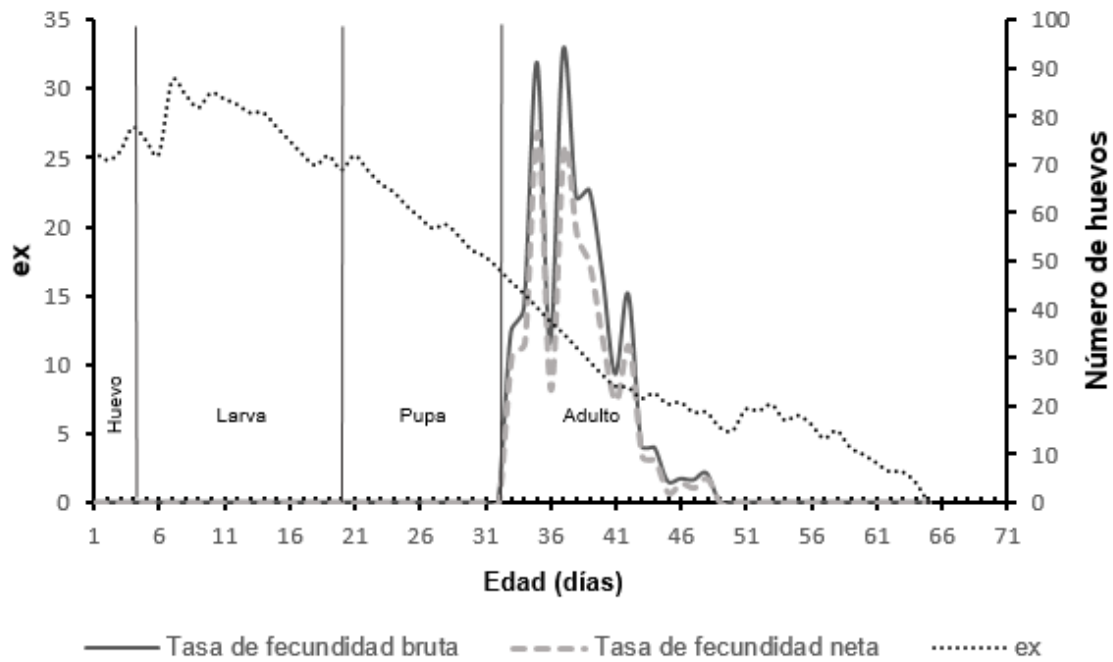
El tiempo generacional promedio (T) fue 37,53 días y la tasa intrínseca de incremento poblacional “r” fue 0,12, indicando que la población estuvo creciendo a una tasa de aproximadamente 0,12 hembras/hembra/día. El tiempo de duplicación poblacional (DT) fue 5,70 días, y la tasa finita de crecimiento ( $\lambda$ ) 1,13.

La relación entre la fecundidad específica por edad ( $m_x$ ) y la supervivencia específica por edad ( $l_x$ ) se encuentra ilustrada en la Figura 2.2. La máxima tasa de crecimiento poblacional ocurrió en el día 33, representada por la primera intersección entre las líneas de fecundidad específica y supervivencia. La fecundidad tuvo dos picos: uno en el día 35 y el otro en el día 37 del ciclo de vida de *H. gelotopoeon*.



**Figura 2.2.** Relación entre fertilidad (mx) y tasa de supervivencia (lx) de *Helicoverpa gelotopoeon* criada con dieta artificial.

La tasa de fecundidad bruta fue 565,87, la tasa de fecundidad neta fue 496,07, y el número promedio de huevos depositados por día 18,6. Las curvas de fecundidad bruta y neta diaria se encuentran representadas en la Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Expectativa de vida ( $ex$ ), fecundidad bruta y neta diaria de individuos de *Helicoverpa gelotopoeon* criados con dieta artificial.

Considerando el análisis de supervivencia (Figura 2.2), de los 241 huevos criados en dieta artificial, solo 123 individuos (51,04%) completaron el estado larval y sobrevivieron hasta el estado de pupa. De esos 123 individuos, sólo 98 (40%) alcanzaron el estado de adulto. Los machos y hembras tuvieron una supervivencia similar; del total de individuos que alcanzaron el estado de adulto, 49,63% fueron hembras y el 50,36% fueron machos. La curva de supervivencia (Figura 2.2) mostró una mayor tasa de mortalidad durante el estado de huevo y los primeros estadios larvales. Luego, declinó lentamente hasta la muerte del último adulto. Esta curva de  $lx$  se asemeja a la curva de supervivencia teórica tipo III (Rabinovich 1978).

La curva de expectativa de vida (Figura 2.3) mostró cuatro periodos de alta mortalidad para esta especie. El primer periodo fue desde el estado de huevo hasta el primer estadio larval, el segundo y tercer periodo ocurrieron desde el segundo al tercer

estadio larval y desde el tercero al cuarto estadio larval respectivamente, y el cuarto ocurrió antes del estado de pupa. En general, la supervivencia fue menor en los estadios larvales más tempranos comparados con los más tardíos, sugiriendo que la probabilidad de morir fue mayor en los primeros estadios larvales.

### **2.3.3. Potencial biótico**

Considerando una proporción de sexos de 0,54%, ausencia de resistencia ambiental, y los siguientes valores para la ecuación de PB,  $d = 496,07$  y  $n = 7,54$ , el PB de *H. gelotopoeon* fue  $2,026 \times 10^{18}$  individuos por hembra por año.

## **2.4. Discusión**

En este estudio se evaluaron los parámetros poblacionales y el potencial biótico de una plaga importante de soja en Argentina. Ya que no hay información publicada con respecto a estudios usando tablas de vida para *H. gelotopoeon*, los resultados de este capítulo, fueron comparados con los de otras especies de este género, con énfasis en *H. armigera*.

En este estudio, los machos tuvieron un estado pupal, longevidad y ciclo de vida más largo que las hembras. Observaciones similares fueron realizadas por Wu y Wang (2012) para el estado pupal de *H. armigera* cuando la criaron a 23°C. Razmjou et al. (2013) y Naseri et al. (2014) también encontraron que los machos de *H. armigera* tuvieron una longevidad y ciclo de total más largo que las hembras. De acuerdo a Slansky (1980), la reducción en la longevidad de la hembra parece deberse a la reproducción, causada por

una pérdida de energía durante la oviposición, reduciendo las fuentes disponibles para el mantenimiento somático.

También se observó que esta especie tiene una fuerte emergencia protogínica (es decir, las hembras emergieron antes que los machos) (Degen et al. 2015), lo cual puede ser inadecuado para la sincronización reproductiva bajo condiciones de laboratorio. Las hembras emergieron en promedio dos noches antes que los machos. De acuerdo a Wu y Wang (2012), quienes encontraron resultados similares para *H. armigera*, esto podría ser atribuido a la duración significativamente más larga de pupas de machos comparada con la de las hembras.

Sin embargo, algunos autores que trabajaron con otras especies de Noctuidae tales como *Spodoptera litura* (Fabricius) (Li et al. 2014) y *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Taylor y Shields 1990), incluyendo a *H. armigera* (Chen et al. 2014), consideran a la protoginia como una estrategia para prevenir la depresión por endogamia, dado que es menos probable que las hembras tempranamente emergidas se crucen con sus hermanos.

La tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) de hembras de *H. gelotopoeon* fue menor que la citada en *H. armigera* por Singh y Yadav (2009), Gomes et al. (2017) y Silva et al. (2017) (332,43; 566 y 303,66 respectivamente). La tasa intrínseca de crecimiento ( $r$ ) y la tasa finita de crecimiento poblacional ( $\lambda$ ) sin embargo, mostraron valores similares cuando se compararon con otros estudios de *H. armigera* (Choudhury et al. 2012, Razmjou et al. 2013, Naseri et al. 2014, Silva et al. 2017). El tiempo transcurrido entre generaciones fue en general menor que el encontrado para *H. armigera* (Dabhi y Patel 2007, Singh y Yadav 2009, Jha et al. 2014, Gomes et al. 2017) (45,26; 42,62; 46,60 y 47,11 respectivamente) y el tiempo necesario para que la población de *H. gelotopoeon* duplique el tamaño (DT) fue similar a algunos estudios de *H. armigera* (Choudhury et al. 2012, Razmjou et al. 2013) y *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Wang et al. 2008). Estos



resultados sugieren que esta especie tiene una alta capacidad para incrementar el tamaño de sus poblaciones bajo condiciones controladas de cría y probablemente bajo condiciones de campo.

La máxima tasa de crecimiento poblacional ocurrió entre los días 32 y 34, lo cual fue antes de lo encontrado para *H. armigera* por Silva et al. (2017) (días 37 y 39).

El alto valor de PB ( $2,026 \times 10^{18}$ ) de *H. gelotopoeon* indica que cada hembra puede producir más de 2 trillones de descendientes. Sin embargo, este resultado es menor al obtenido por Silva et al. (2017) para *H. armigera* ( $PB = 2,016 \times 10^{22}$ ). Estas diferencias podrían ser atribuidas a la mayor fecundidad de *H. armigera*.

Las curvas de expectativa de vida (*ex*) identificaron las edades críticas de mortalidad. Los individuos de *H. gelotopoeon* criados en dieta artificial sufrieron una mayor mortalidad durante los estados tempranos (desde huevo hasta el tercer estadio larval). Este resultado es consistente con los de Liu et al. (2004), que encontraron que la mortalidad larval de *H. armigera* fue mayor entre el primer y segundo estadio larval para todas las plantas hospederas evaluadas, excepto el algodón. Vargas y Nishida (1980) observaron la misma tendencia para *H. zea*. Considerando la curva de supervivencia, los resultados de este estudio son similares a aquellos obtenidos por Jha et al. (2014), quienes encontraron que sólo la mitad de los individuos de *H. armigera* completaron el estado larval y sobrevivieron hasta el estado de pupa. El máximo valor de fecundidad específica (*mx*)/día fue 41,54 hembras/hembra en el día 35 del ciclo de vida de *H. gelotopoeon*. Este valor es menor que el encontrado por Singh y Yadav (2009), quienes observaron 70,33 hembras/hembra para *H. armigera*.

La fecundidad promedio de *H. gelotopoeon* criada con dieta artificial fue de 496 huevos fértiles/hembra, lo cual es menor a lo observado para *H. armigera* por Silva et al. 2017, quien encontró valores de 592,01 a 914,76 huevos fértiles por hembra. El espacio

entre las curvas de fecundidad neta y bruta en la Figura 2.3 representa la diferencia entre el número de huevos depositados con respecto al número de huevos eclosionados.

Es esencial entender los parámetros demográficos de una plaga para desarrollar un programa de manejo integrado de plagas, dado que estos parámetros proveen la tasa de crecimiento poblacional de una especie tanto para la generación actual como para las sucesivas (Frel et al. 2003).

El presente estudio provee información novedosa sobre parámetros de tabla de vida y potencial biótico de *H. gelotopoeon*. Esta información sirve de base para obtener modelos de predicción útiles para el uso a campo que incluyan factores bióticos y abióticos que puedan influenciar la supervivencia, tasa de desarrollo, fecundidad y fertilidad. También permitirá conocer la efectividad de la aplicación de determinadas estrategias de control, al contrastar tablas de vida que contemplen el crecimiento y la dinámica poblacional con y sin la influencia de dicha táctica de manejo. Por lo tanto, teniendo en cuenta todo lo previamente expuesto, estos resultados son de gran utilidad para planificar e implementar estrategias para el futuro desarrollo de programas de manejo integrado de esta plaga en Sudamérica.

# Capítulo 3

---

**Caracterización biológica y compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* provenientes de diferentes regiones de la Argentina**



### 3.1. Introducción

Los insectos herbívoros representan un grupo diverso de especies con un amplio rango de distribuciones y potencial adaptativo (Wei et al. 2015, Bagley 2016). La variación genética entre poblaciones naturales puede deberse a varios factores, entre los que se incluyen el aislamiento geográfico y el aislamiento ecológico. Las barreras geográficas que limitan la dispersión y consecuentemente llevan al aislamiento por distancia parecen ser particularmente importantes en la divergencia poblacional en diversos taxones (Wang et al. 2017).

Varias poblaciones pertenecientes a la misma especie se alimentan de diferentes plantas hospederas en diferentes regiones y estas poblaciones separadas están sujetas probablemente a diferentes presiones selectivas. Si las poblaciones se aislan geográficamente y las diferencias genéticas aumentasen, podrían surgir nuevas especies. Esto se considera como uno de los caminos usuales para que la especiación ocurra y es conocido como especiación alopátrica (Pérez Contreras 1999). De hecho, la visión convencional de la especiación es que tiene lugar alopátricamente (Mayr 1963, Bush 1975, Hammond 1980).

De acuerdo a Wright (1951), cuando se estudian las posibles causas de especiación, las diferencias genéticas que tienden a prevenir los apareamientos entre poblaciones son las que mejor explican el proceso de especiación. La adaptación a ambientes ecológicos diferentes, puede resultar en la evolución de la incompatibilidad reproductiva entre poblaciones (Matsubayashi et al. 2010).

Las poblaciones de distintas regiones geográficas generalmente muestran varios niveles de incompatibilidad reproductiva y exhiben diferentes características biológicas porque han estado geográficamente aisladas, han experimentado diferentes presiones de selección y/o adaptado a varios ambientes locales (Diehl y Bush 1984, Hopper et al. 1993)

Es entonces esperable que especies de insectos fitófagos ampliamente distribuidas experimenten diferentes presiones selectivas en diferentes partes de su área de distribución (Pérez Contreras 1999).

Como ya se mencionó, *H. gelotopoeon*, es una especie que se encuentra ampliamente distribuida en el sur de Sudamérica y en numerosas provincias de nuestro país, encontrándose expuesta de esta manera a diferentes condiciones climáticas, geográficas, hidrográficas y de relieve según cada región donde está presente.

Son numerosos los estudios que existen sobre poblaciones alopátricas dentro de una misma especie de lepidópteros (Imada et al. 2011, Lukhtanov 2012, Lukhtanov et al. 2015, Zlatkov y Huemer 2017). Dentro del género *Helicoverpa*, también se realizaron este tipo de estudios, especialmente para *H. armigera*, obteniendo como resultado la existencia de compatibilidad reproductiva entre poblaciones provenientes de distintos países, representando de esta manera una sola especie alrededor del mundo (Paterson 1991, Colvin et al. 1994).

Poblaciones genéticamente diferentes, como las poblaciones alopátricas, pueden variar en su susceptibilidad a tácticas de control (Joyce et al 2014); por lo tanto, es esencial entender la biología y la estructura genética de poblaciones de *H. gelotopoeon* para el desarrollo de estrategias de manejo sustentables.

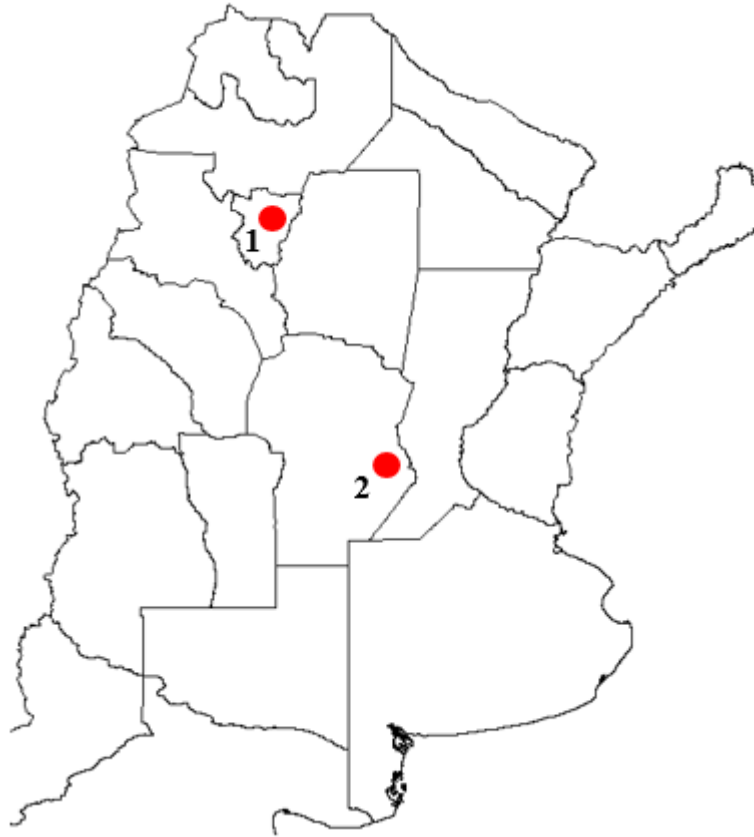
En base a lo expuesto, el objetivo de este capítulo fue caracterizar parámetros biológicos y reproductivos y determinar la compatibilidad reproductiva de dos poblaciones de *H. gelotopoeon* recolectadas en las provincias de Córdoba y Tucumán en Argentina.

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Recolección de las poblaciones**

Se recolectaron poblaciones en el cultivo de garbanzo en dos provincias distintas: San Agustín (depto. Cruz Alta, provincia de Tucumán, Argentina) y Marcos Juárez (provincia de Córdoba, Argentina) (Figura 3.1). Estas provincias pertenecen a las regiones del Noroeste Argentino y Pampeana, respectivamente (Stratta et al. 2015, Zárate y Mendicino 2015).

En cada sitio se recolectó un mínimo de 200 larvas las cuales fueron ubicadas individualmente en tubos de vidrio (12 cm de alto y 1.5 cm de diámetro) con trozos de dieta artificial cuya composición fue detallada previamente en el Capítulo 2. Las larvas recolectadas fueron llevadas a laboratorio y colocadas en cámaras de cría bajo condiciones controladas ( $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 70-75% HR, 14:10 L:O de fotoperiodo artificial) hasta la emergencia de los adultos. Luego, todos los adultos que emergieron fueron examinados usando la genitalia masculina, para confirmar la especie conforme a Velasco de Stacul et al. (1969). Algunos de estos individuos de cada una de estas poblaciones fueron depositados como especímenes voucher en la colección de insectos de la Sección Zoología Agrícola, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes.



**Figura 3.1.** Ubicación geográfica de los lugares en los que se realizó la recolección de las poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon*. **1:** San Agustín, Tucumán (garbanzo), **2:** Marcos Juárez, Córdoba (garbanzo).

### **3.2.2. Descripción de las regiones agroecológicas correspondientes a las localidades muestreadas**

Las poblaciones de *H. gelotopoeon* utilizadas en este capítulo y en los sucesivos fueron recolectadas de cinco localidades, ubicadas en diferentes zonas agroecológicas:

#### Región pampeana:

Esta región es una amplia planicie que se caracteriza por presentar excelentes condiciones edáficas y climáticas que permiten el desarrollo de cultivos de producción agrícola y la ganadería. El clima es templado con temperaturas benignas; las medias de

verano oscilan entre los 20 y 25°C y las de invierno entre los 5 y los 12°C con un promedio anual de 17°C. Las lluvias son abundantes, decreciendo hacia el Oeste (Stratta et al. 2015).

#### Región NEA (Noreste Argentino):

El clima de esta región es subtropical, caracterizado por un largo verano y por un extenso periodo libre de heladas, que permite el desarrollo de la producción agrícola de cultivos industriales como el algodón (*Gossypium hirsutum* L.; Malvales: Malvaceae), la yerba mate (*Ilex paraguarensis* A. St. Hill; Aquifoliales: Aquifoliaceae) el té (*Camellia sinensis* L. Ericales: Theaceae) y el arroz (*Oryza sativa* Poales: Poaceae). Las precipitaciones disminuyen de este a oeste entre 1800 mm a 600 mm, al igual que las temperaturas medias anuales que varían entre 22°C a 16 y 18°C (Ferraris y Cieza 2015). Los suelos son típicos de áreas de calidad y húmedas, con diverso grado de desarrollo y capacidad para la práctica agrícola, hay zonas con suelos muy fértiles, profundos de gran capacidad productiva y zonas con suelos poco evolucionados de menor capacidad productiva (Ferraris y Cieza 2015).

#### Región NOA (Noroeste Argentino):

El mosaico de paisajes que presenta la región, cuenta con variados recursos que han permitido el desarrollo de una economía mixta, agrícola y ganadera, minera y forestal, turística e industrial. Desde el punto de vista natural se trata de una región muy heterogénea. En ella se encuentran diversidad de climas, desde el subtropical serrano con lluvias abundantes en el Este hasta el árido de altura en el Oeste, con temperaturas medias anuales que oscilan de 18°C a 22°C (Zárate y Mendicino 2015, SMN 2018).



### **3.2.3. Cría de las poblaciones**

El procedimiento de cría utilizado fue el mismo al previamente descrito en el Capítulo 2.

Luego de establecer una colonia para cada población, individuos de la segunda a la cuarta generación fueron usados para los ensayos de biología y compatibilidad reproductiva de *H. gelotopoeon*.

### **3.2.4. Determinación de parámetros biológicos de poblaciones de diferentes regiones de la oruga bolillera**

De cada colonia experimental de *H. gelotopoeon*, una vez emergidas las larvas, se seleccionaron cinco grupos al azar (en total 120 y 90 larvas de las provincias de Tucumán y Córdoba, respectivamente) para analizar los siguientes parámetros: duración de los estadios larvales y el estado de pupa, masa pupal (obtenida 24 h después de la pupación) y la proporción de sexos.

De los adultos obtenidos, un grupo de aproximadamente 35 hembras y 35 machos de la población de Tucumán, y 22 hembras y 22 machos de la población de Córdoba fueron seleccionados al azar para determinar la duración de huevo, longevidad de adultos y parámetros reproductivos. Una hembra virgen y un macho virgen de 24 h de edad, de la misma población, fueron colocados en jaulas cilíndricas de oviposición similares a aquellas descritas anteriormente (25 cm de alto y 15 cm de diámetro). Los adultos fueron mantenidos en estas jaulas y se registró diariamente la mortalidad y oviposición hasta que los dos adultos murieron. Las hembras muertas fueron disectadas para establecer el

número de espermatozoides presentes en su tracto digestivo para determinar si había ocurrido la cópula o no (Perfectti 2002, Rhainds 2010).

Los parámetros registrados fueron: preoviposición, oviposición y postoviposición (días que la hembra sobrevive después de realizar la última oviposición), fecundidad total (número de huevos depositados por una hembra durante todo su período de vida), duración del estado de huevo, fertilidad total (porcentaje de huevos eclosionados) y longevidad de los adultos.

### **3.2.5. Determinación de compatibilidad reproductiva entre poblaciones de diferentes regiones de la oruga bolillera**

Se realizó un experimento de cruzas para determinar la compatibilidad reproductiva entre las poblaciones de Tucumán y Córdoba, de acuerdo a las metodologías descritas por Pashley y Martin (1987), Murúa et al. (2008) y Fogliata et al. (2016). Para determinar la compatibilidad, se usó una hembra virgen y un macho virgen de 24 h de edad. Se realizaron cuatro tipos de cruzas: 1) Cruzas parentales usando padres de la misma población, 2) Cruzas híbridas usando un padre de cada población, 3) Retrocruzas con el progenitor femenino como el padre recurrente y retrocruzas con el progenitor masculino como el padre recurrente y 4) Cruzas entre híbridos F1 de las distintas poblaciones.

Un subconjunto de prole larval (F<sub>1</sub>) de cada cruce fértil fue monitoreado para evaluar la supervivencia y luego criado hasta la adultez. Los parámetros medidos para determinar la compatibilidad fueron: presencia de espermatozoides, períodos de preoviposición, oviposición y postoviposición, fecundidad y fertilidad.

### **3.2.6. Análisis de datos**

Los parámetros biológicos entre las poblaciones de Tucumán y Córdoba fueron comparados usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (Lehmann 1975) ( $P < 0.05$ ). Para los datos de compatibilidad reproductiva, debido al alto número de combinaciones, los parámetros de todas las cruzas parentales fueron comparados con los resultados de los otros tipos de cruzas (cruzas híbridas, retrocruzas y cruzas entre híbridos) usando el test de Kruskal-Wallis (1952) ( $P < 0.05$ ).

Para todos los estudios, los periodos de preoviposición, oviposición y postoviposición fueron comparados para aquellas hembras que pusieron huevos. La fecundidad total fue comparada para todas las hembras incluyendo aquellas que no pusieron huevos. Para la fertilidad total, hembras que pusieron huevos pero no tenían espermátóforos no fueron incluidas. Los análisis estadísticos fueron realizados usando IBM SPSS Statistics (IBM Corp 2013), versión 22.0.

## **3.3. Resultados**

### **3.3.1. Parámetros biológicos y reproductivos de poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de distintas regiones**

Todos los adultos provenientes de Córdoba y Tucumán fueron identificados como *H. gelotopoeon* basandose en la morfología de la genitalia masculina (Velasco de Stacul 1969).

En total, se emplearon 35 y 22 cruzas parentales para determinar los parámetros biológicos y reproductivos de las poblaciones de Tucumán y Córdoba, respectivamente.

La duración de cada estado de desarrollo y los parámetros reproductivos están presentados en la Tabla 3.1. Los parámetros biológicos que presentaron diferencias entre las dos poblaciones fueron: duración del estado de huevo ( $W = 3969$ ;  $P = 0.0005$ ), tercer estadio larval ( $W = 7055$ ;  $P = 0.0014$ ) y la longevidad de la hembra ( $W = 294.50$ ;  $P = 0.0438$ ), que tuvieron mayor duración para la población de Tucumán y la masa pupal ( $W = 1982$ ,  $P = 0.0066$ ) que fue mayor para la población de Córdoba. El único parámetro reproductivo que presentó diferencias significativas fue el periodo de preoviposición ( $W = 451$ ;  $P = 0.0155$ ), que fue de mayor duración para la población de Tucumán.

**Tabla 3.1.** Duración en días (media  $\pm$  EE) de los estados de huevo, larva (L1-L5) y pupa, masa pupal (mg), longevidad de macho y hembra (días), proporción de sexos (H:M) y ciclo de vida de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* recolectadas en Tucumán y Córdoba en el cultivo de garbanzo.

Parámetros	Población Tucumán	n	Rango	Población Córdoba	n	Rango
Huevo	4,07 $\pm$ 0,13a	9507	2-7	3,41 $\pm$ 0,13b	9689	2-6
L1	2,54 $\pm$ 0,06a	116	2-4	2,7 $\pm$ 0,07a	87	2-4
L2	2,24 $\pm$ 0,08a	116	1-4	2,04 $\pm$ 0,06a	87	1-4
L3	1,94 $\pm$ 0,04a	111	1-3	1,73 $\pm$ 0,09b	83	1-4
L4	2,14 $\pm$ 0,07a	111	1-6	1,99 $\pm$ 0,08a	82	1-4
L5	5,81 $\pm$ 0,14a	108	2-11	5,87 $\pm$ 0,14a	62	3-9
Ciclo larval	14,75 $\pm$ 0,18a	107	13-24	14,24 $\pm$ 0,18a	62	12-19
Pupa	12,79 $\pm$ 0,34a	90	9-20	11,86 $\pm$ 0,33a	49	8-17
Masa pupal	224 $\pm$ 5,6a	61	149-310	253 $\pm$ 9,3b	34	131-434
Longevidad hembra	12,68 $\pm$ 0,8a	35	4-21	9,75 $\pm$ 1,07b	22	4-17
Longevidad macho	13 $\pm$ 1,06a	35	2-23	11,18 $\pm$ 0,98a	22	4-19
Proporción de sexos ♀:♂	1: 1,04	90		1: 1,3	49	
Espermatóforos por hembra	1,29 $\pm$ 0,12a	35	1-4	1,27 $\pm$ 0,12a	22	1-3
Periodo de preoviposición	4,91 $\pm$ 0,31a	34	3-10	3,81 $\pm$ 0,42b	21	1-8
Periodo de oviposición	5,44 $\pm$ 0,68a	34	1-17	4,86 $\pm$ 0,63a	21	1-11
	1,74 $\pm$ 0,39a	34	0-8	2,19 $\pm$ 0,47a	21	0-7

Periodo de postoviposición						
Fecundidad	340,74 ± 51,49a	35	0-1326	517,68 ± 84,11a	22	0-1397
Fertilidad	79,73 ± 1,55a	33	44-92	84,35 ± 1,81a	19	63-98

Valores sucedidos por las mismas letras dentro de una fila no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Wilcoxon ( $P > 0,05$ )

### 3.3.2. Compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de distintas regiones

En total, se realizaron 57 cruzas parentales, 35 cruzas entre híbridos, 93 retrocruzas y 56 cruzas entre híbridos entre las poblaciones de Tucumán y Córdoba (Tabla 3.2). No se observaron diferencias significativas en los parámetros reproductivos entre las dos poblaciones. En general, todas las cruzas híbridas, retrocruzas y cruzas entre híbridos mostraron valores similares a ambas cruzas parentales para todos los parámetros (Tablas 3.2 y 3.3).

**Tabla 3.2.** Número (media  $\pm$  EE) (N) de espermatozoides por hembra, duración de los periodos de preoviposición, oviposición y postoviposición, fecundidad y fertilidad de las cruzas parentales, híbridas, retrocruzas y cruzas entre híbridos de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* recolectadas en las provincias de Tucumán y Córdoba, Argentina.

	<b>Espermatozoides por hembra</b>	<b>Periodo de preoviposición (d)</b>	<b>Periodo de oviposición (d)</b>	<b>Periodo de postoviposición (d)</b>	<b>Fecundidad</b>	<b>Fertilidad</b>
<b>Cruzas parentales</b>	1,28 $\pm$ 0,09a (57)	4,49 $\pm$ 0,26a (55)	5,22 $\pm$ 0,49a (55)	1,91 $\pm$ 0,3a (55)	409,04 $\pm$ 46,31a (55)	81,45 $\pm$ 1,22a (52)
<b>Cruzas híbridas</b>	0,86 $\pm$ 0,11a (35)	4,36 $\pm$ 0,26a (28)	5,18 $\pm$ 0,62a (28)	1,71 $\pm$ 0,38a (28)	366,81 $\pm$ 60,58a (26)	75,96 $\pm$ 2,73a (23)
<b>Retrocruzas</b>	1,19 $\pm$ 0,11a (93)	4,51 $\pm$ 0,26a (75)	4,83 $\pm$ 0,36a (75)	2,41 $\pm$ 0,27a (75)	375,26 $\pm$ 37,52a (70)	77,68 $\pm$ 1,43a (58)
<b>Cruzas entre híbridos</b>	1,27 $\pm$ 0,15a (56)	5,03 $\pm$ 0,38a (36)	6,06 $\pm$ 0,54a (36)	2,44 $\pm$ 0,37a (36)	297,88 $\pm$ 40,81a (43)	77,95 $\pm$ 1,67a (33)

Valores sucedidos por las mismas letras dentro de una columna no son significativamente diferentes de acuerdo al Test de Kruskal-Wallis ( $P > 0,05$ )

**Tabla 3.3.** Número (media  $\pm$  EE) (N) de hembras copuladas, fecundidad y fertilidad de cada craza y retrocraza de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* usando poblaciones recolectadas en Tucumán (T) y Córdoba (C) en Argentina.

Tipos de cruzas	♀	♂	Nº parejas	Hembras copuladas	Fecundidad	Fertilidad
Cruzas parentales	T	T	35	35	340,74 $\pm$ 51,49 (35)	79,73 $\pm$ 1,55 (33)
Cruzas parentales	C	C	22	22	517,68 $\pm$ 84,11 (22)	89,35 $\pm$ 1,81 (19)
Cruzas híbridas	T	C	17	13	389,23 $\pm$ 85,03 (13)	71,53 $\pm$ 3,82 (12)
Cruzas híbridas	C	T	18	13	344,38 $\pm$ 89,30 (13)	80,80 $\pm$ 3,50 (11)
Retrocruzas	C	F <sub>1</sub> (C♀ x T♂)	16	12	379,08 $\pm$ 101,32 (12)	82,07 $\pm$ 2,08 (10)
Retrocruzas	C	F <sub>1</sub> (T♀ x C♂)	14	10	280 $\pm$ 99,19 (10)	76,61 $\pm$ 5,38 (9)
Retrocruzas	T	F <sub>1</sub> (C♀ x T♂)	12	12	473,58 $\pm$ 78,91 (12)	77,72 $\pm$ 3,63 (11)
Retrocruzas	T	F <sub>1</sub> (T♀ x C♂)	13	8	183,38 $\pm$ 87,50 (8)	79,64 $\pm$ 4,40 (5)
Retrocruzas	F <sub>1</sub> (C♀ x T♂)	C	8	5	563,40 $\pm$ 140,97 (5)	68,70 $\pm$ 6,95 (4)
Retrocruzas	F <sub>1</sub> (C♀ x T♂)	T	10	8	507,75 $\pm$ 137,12 (8)	72,93 $\pm$ 4,74 (7)
Retrocruzas	F <sub>1</sub> (T♀ x C♂)	C	10	8	268,75 $\pm$ 89,81 (8)	80,50 $\pm$ 1,52 (7)
Retrocruzas	F <sub>1</sub> (T♀ x C♂)	T	10	7	390,29 $\pm$ 108,70 (7)	78,73 $\pm$ 1,21 (5)
Cruzas entre híbridos	F <sub>1</sub> (T♀ x C♂)	F <sub>1</sub> (C♀ x T♂)	16	12	260,67 $\pm$ 72,55 (12)	78,49 $\pm$ 3,37 (9)
Cruzas entre híbridos	F <sub>1</sub> (T♀ x C♂)	F <sub>1</sub> (T♀ x C♂)	14	10	176,30 $\pm$ 49,03 (10)	75,14 $\pm$ 5,16 (7)
Cruzas entre híbridos	F <sub>1</sub> (C♀ x T♂)	F <sub>1</sub> (C♀ x T♂)	15	14	406,50 $\pm$ 79,76 (14)	79,10 $\pm$ 2,05 (12)
Cruzas entre híbridos	F <sub>1</sub> (C♀ x T♂)	F <sub>1</sub> (T♀ x C♂)	11	7	318,14 $\pm$ 120,19 (7)	78,12 $\pm$ 4,30 (5)



### 3.4. Discusión

En este capítulo se compararon caracteres demográficos biológicos y reproductivos y la compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *H. gelotopoeon* recolectadas de garbanzo en dos provincias de Argentina.

Las poblaciones de Tucumán y Córdoba mostraron características biológicas y reproductivas similares cuando fueron criadas en dieta artificial en el laboratorio. Sin embargo, se encontraron diferencias en el periodo de incubación, tercer estadio larval, longevidad de la hembra, masa pupal y periodo de preoviposición. Estos parámetros fueron mayores para la población de Tucumán, pero la masa pupal fue mayor para la población de Córdoba.

Los resultados de este estudio mostraron que las poblaciones de la oruga bolillera de las provincias de Tucumán y Córdoba completan una generación (de huevo a adulto) en aproximadamente 40 y 38 días bajo condiciones de laboratorio, respectivamente. Un tiempo de desarrollo diferente fue citado por Navarro et al. (2009) para esta especie, pero Naseri et al. (2009) para *H. armigera* encontró un tiempo similar. El período de incubación para ambas poblaciones fue similar a aquel observado por Navarro et al. (2009), pero fue más corto que el encontrado por Urretabizkaya et al. (2010). Se encontraron cinco estadios larvales en ambas poblaciones y este resultado fue similar al descrito por Iannone y Leiva (1993) y Sharma et al. (2011) para *H. gelotopoeon* y *H. armigera*, respectivamente. El tiempo de desarrollo larval fue similar al encontrado por Iannone y Leiva (1993), Urretabizkaya et al. (2010) y Navarro et al. (2009) para *H. gelotopoeon*.

La duración del estado pupal fue más corta que la publicada por otros estudios (Iannone y Leiva 1993, Urretabizkaya et al. 2010), pero los valores fueron consistentes con aquellos obtenidos por Naseri et al. (2009) y Mironidis (2014) para *H. armigera*.

Ningún estudio previo ha examinado la masa pupal de *H. gelotopoeon*, pero en general fue menor que aquella observada para *H. armigera* (Arghand et al. 2014) y *H. zea* (Giolo et al. 2006).

Los adultos de las poblaciones de *H. gelotopoeon* tuvieron un tiempo de supervivencia similar al verificado por Simmons y Lynch (1990), Liu et al. (2004), Naseri et al. (2009), y Pérez y Suris (2012) para *H. zea*, *H. armigera* y *C. virescens*.

La proporción de sexos encontrada para las poblaciones de *H. gelotopoeon* de Tucumán y Córdoba (1 hembra: 1 macho) fue similar a aquella encontrada por Álvarez Hernández et al. (2010) para *C. virescens* criada en hojas y cascabullos de garbanzo.

El número de espermátóforos encontrados en las hembras disectadas fue en general uno para ambas poblaciones. Valores similares fueron obtenidos por Coombs et al. (1993) para *H. armigera* y *H. punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) y por Callahan (1958) y Navarro (1987) para *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Los periodos de preoviposición, oviposición y postoviposición fueron similares a aquellos encontrados para *H. armigera* (Sharma et al. 2011). Navarro et al. (2009) reportaron una fecundidad mayor para *H. gelotopoeon* que la registrada en el presente estudio. Sin embargo, los resultados de fecundidad obtenidos en este trabajo fueron similares a los de Urretabizkaya et al. (2010) para la misma especie.

Ningún estudio previo ha examinado la fertilidad de *H. gelotopoeon*. Aun así, nuestros resultados mostraron valores menores a aquellos observados para *C. virescens* (Méndez Barceló 2003) y *H. zea* (Navarro 1987), pero mayores a aquellos encontrados para *H. armigera* (Laster y Sheng 1995, Ali et al. 2009) (Tabla 3.1).

Las cruza intra- e interpoblaciones revelaron que las poblaciones de *H. gelotopoeon* de las regiones Noroeste y Pampeana en Argentina no presentaron evidencia de incompatibilidad precigótica o postcigótica, sugiriendo que las poblaciones de *H. gelotopoeon* de Córdoba y Tucumán pertenecen a una sola especie de amplio rango geográfico en Argentina (Tablas 3.2 y 3.3).

No hay estudios previos que hayan comparado parámetros biológicos y reproductivos entre diferentes poblaciones de *H. gelotopoeon*. Sin embargo, Silva et al. (2017) compararon los parámetros biológicos, la fecundidad y fertilidad entre tres poblaciones de *H. armigera* provenientes de diferentes lugares y plantas hospederas de Brasil. Los autores no encontraron diferencias significativas en los parámetros reproductivos, la longevidad y ciclo larval cuando compararon las tres poblaciones. Ellos adjudicaron esta falta de diferenciación probablemente a la reciente expansión de esta plaga en Sudamérica.

Tampoco hay estudios de compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de distintas regiones geográficas. Sin embargo, Colvin et al. (1994) estudiaron la compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *H. armigera* provenientes de distintos países (África, India, China y Australia). Estos autores observaron que todas las cruza producían descendencia viable, sugiriendo que existe flujo génico entre estas poblaciones y por lo tanto que *H. armigera* existe como una sola especie a lo largo de todo su rango geográfico.

Las especies altamente migratorias generalmente exhiben muy poca diferenciación geográfica a lo largo de su rango de distribución; esto se debe a que la movilidad por el vuelo previene el aislamiento genético y la diferenciación al promover el flujo génico (Mayr 1963, Waples 1987, Pogson et al. 1995, Sun et al. 2015). Los resultados de este trabajo indican claramente que no hay signos de aislamiento geográfico, dado que las dos poblaciones se

cruzaron exitosamente en ambas direcciones. Esto sustenta la presuposición de que un flujo génico sustancial ocurre entre las poblaciones de *H. gelotopoeon*, probablemente debido a la capacidad de migración de largo alcance de las especies de Heliothinae, la cual ha sido ampliamente documentada (Hartstack et al. 1982, Farrow y Daly 1987, Gregg et al. 1995, Westbrook 2008, Westbrook y Lopez 2010).

Sin embargo, estudios futuros deberían contemplar evaluaciones específicas de la capacidad de dispersión de *H. gelotopoeon*, así como también inspeccionar otras fuentes de aislamiento precigótico, como ser problemas en el apareamiento a larga distancia debido a señales de cortejo divergentes (e.g. distinta composición de feromonas o respuesta cruzada a las mismas). Esto permitirá ampliar y complementar los estudios de compatibilidad reproductiva de esta especie, así como interpretar de manera más concisa los resultados observados.

# Capítulo 4

---

**Caracterización biológica y compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* provenientes de diferentes cultivos**



## 4.1. Introducción

Los insectos fitófagos son uno de los grupos más exitosos en la naturaleza en términos de diversidad biológica, constituyendo cerca del 46% de todas las especies de insectos (Strong et al. 1984, Mitter et al. 1988). Debido a que muchos insectos fitófagos están especializados ecológicamente, la diversificación extensiva en este grupo es generalmente considerada como el resultado de la especiación ecológica (Futuyma y Moreno 1988; Jaenike 1990, Funk et al. 2002), en la cual la especialización promueve la selección divergente y el desarrollo de barreras reproductivas que llevan a la formación de nuevas especies (Funk et al. 2006, Forister et al. 2012, Nosil 2012). La investigación sobre los insectos fitófagos y sus adaptaciones a sus plantas hospederas ha jugado un rol principal en el desarrollo del concepto biológico de especiación (Berlocher y Feder 2002, Drès y Mallet 2002, Funk et al. 2002, Matsubayashi et al. 2010, Forister et al. 2012).

La evolución de razas genéticamente distintas dentro de una sola población parece estar bastante difundida entre los insectos fitófagos que se alimentan de múltiples especies de plantas hospederas. La presión de selección asociada a cada planta hospedera puede conducir al aislamiento reproductivo y eventualmente a la formación de razas simpátricas en la población del insecto, a pesar de las distribuciones superpuestas de las especies de plantas hospederas (Mopper 1996).

Diferentes especies de plantas hospederas pueden diferir en su química y estructura morfológica. Por lo tanto, la selección puede actuar en direcciones contrastantes entre poblaciones de insectos que se alimenten sobre especies diferentes, favoreciendo caracteres opuestos en las diferentes plantas hospederas (Matsubayashi et al. 2010).

Individuos de la misma especie de insecto, e incluso individuos pertenecientes a la misma población, pueden mostrar diferentes preferencias de planta hospedera en diferentes puntos de su área de distribución (Pashley 1986; Karban y Myers 1989, Pérez Contreras 1999).

Como ya se mencionó, *H. gelotopoeon* es una plaga polífaga y se encuentra citada en numerosas especies, tales como soja, garbanzo, algodón, girasol, maíz, alfalfa, tomate, lino, poroto, papa, cebolla, arveja y también fue citada en malezas como *Physalis angulate* y *Carduus* spp (Cork y Lobos 2003). Sin embargo, no se conoce si sus poblaciones están compuestas por razas de hospedero, o presentan preferencias a distintas plantas hospederas. Sin embargo, para *H. armigera*, Jallow y Zalucki (1996) realizaron un estudio en el cual comprobaron que individuos de poblaciones australianas de esta especie exhibían distintos grados de preferencia por ciertas plantas hospederas, siendo el maíz, el sorgo y el tabaco sus favoritas, demostrando a su vez que estas preferencias eran heredables en las siguientes tres generaciones evaluadas en el ensayo.

Este tipo de estudios adquiere importancia si se tiene en cuenta que actualmente, las plantas genéticamente modificadas (GM) que expresan los genes de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringensis* (Bt) son una estrategia viable y muy utilizada para controlar las principales plagas de lepidópteros. Sin embargo, *H. armigera*, *H. zea*, y *C. virescens* han desarrollado resistencia a insecticidas y proteínas *Bt* Cry (Forrester et al. 1993, Tay et al. 2015).

Aunque varias estrategias han sido propuestas para retrasar la evolución de la resistencia a los cultivos Bt, el uso de refugios ha sido reconocido como un componente importante del manejo de la resistencia para los cultivos transgénicos (Tabashnik 1994, Alstad y Andow 1995, Gould 1998).

Como ya fue mencionado previamente, la adaptación a diferentes plantas hospederas puede reducir el flujo génico entre las poblaciones de insectos fitófagos, lo que podría llevar al aislamiento reproductivo (Groot et al. 2011). Bajo estas circunstancias, un refugio perdería su función, ya que estas poblaciones no podrían aparearse entre ellas al azar. Por lo tanto, son necesarios estudios sobre la diversidad genética y el flujo génico entre poblaciones de insectos plaga y el posible intercambio de alelos entre poblaciones asociadas a la planta hospedera para diseñar estrategias de manejo de la resistencia para el complejo de *Heliothinae*.

En base a todo lo mencionado, el objetivo de este capítulo fue evaluar los parámetros biológicos y reproductivos y determinar la compatibilidad reproductiva entre dos poblaciones de *H. gelotopoeon* recolectadas en las plantas hospederas de soja y alfalfa en el Noroeste de Argentina.

## **4.2. Materiales y métodos**

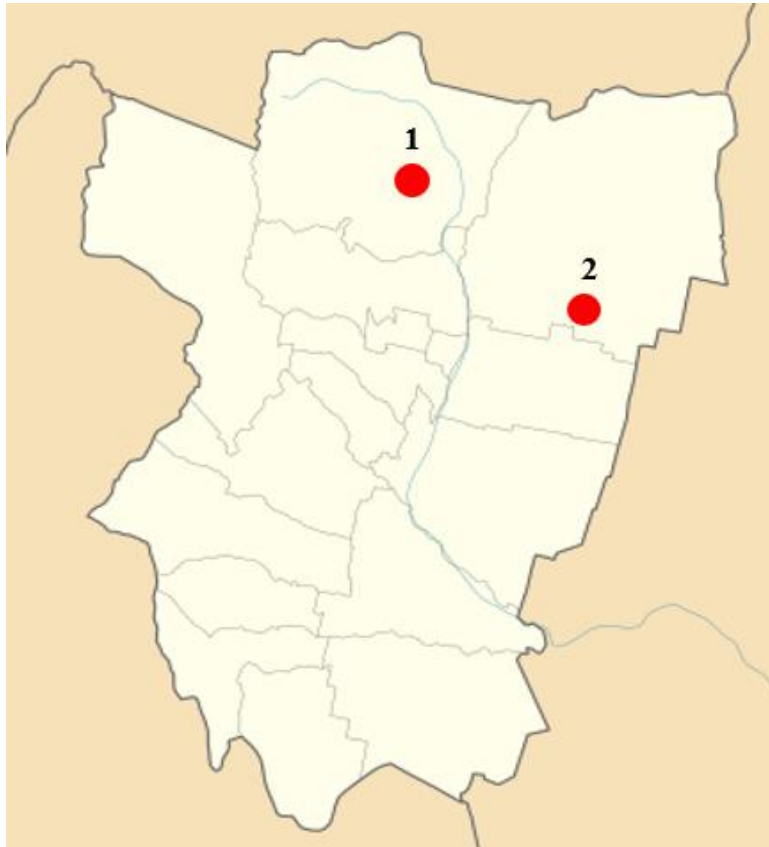
### **4.2.1. Recolección de las poblaciones**

Se recolectaron poblaciones en las plantas hospederas de soja y alfalfa en dos localidades de la provincia de Tucumán, Argentina: San Agustín (Depto. Cruz Alta) y Vipos (Depto. Trancas) (Figura 4.1).

En cada sitio se recolectó un mínimo de 200 larvas las cuales fueron colocadas individualmente en tubos de vidrio (12 cm de alto y 1.5 cm de diámetro) con trozos de dieta artificial, cuya composición fue previamente descripta en el Capítulo 2. Las larvas recolectadas fueron llevadas a laboratorio y colocadas en cámaras de cría bajo condiciones



controladas ( $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 70-75% HR, 14:10 L:O de fotoperiodo artificial) hasta la emergencia de los adultos. Luego, todos los adultos que emergieron fueron examinados usando la genitalia masculina, para confirmar la especie conforme a Velasco de Stacul et al. (1969). Los insectos recolectados de cada una de estas poblaciones fueron depositados como especímenes voucher en la colección de insectos de la Sección Zoología Agrícola, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes.



**Figura 4.1.** Ubicación geográfica de los lugares en los que se realizó la recolección de las poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* en la provincia de Tucumán. **1:** Vipos (alfalfa), **2:** San Agustín (soja).

#### **4.2.2. Cría de las poblaciones**

El procedimiento de cría utilizado fue el mismo al previamente descrito en el Capítulo 2.

#### **4.2.3. Determinación de parámetros biológicos de poblaciones de diferentes plantas hospederas de la oruga bolillera**

De cada colonia experimental de *H. gelotopoeon*, una vez emergidas, se seleccionaron cinco grupos de larvas neonatas al azar (en total 126 y 95 larvas de las plantas hospederas de soja y alfalfa, respectivamente) para analizar los siguientes parámetros: duración de los estadios larvales y el estado de pupa, masa pupal (obtenida 24 h después de la pupación) y la proporción de sexos.

De los adultos obtenidos, un grupo de aproximadamente 46 hembras y 46 machos de la población de soja, y 33 hembras y 33 machos de la población de alfalfa fueron seleccionados al azar para determinar la duración de huevo, longevidad y parámetros reproductivos.

Para los estudios de los parámetros reproductivos se procedió con la misma metodología descrita anteriormente y se evaluaron los mismos parámetros.

#### **4.2.4. Determinación de compatibilidad reproductiva entre poblaciones de diferentes plantas hospederas de *H. gelotopoeon***

La metodología utilizada para determinar la compatibilidad reproductiva entre las poblaciones de soja y alfalfa fue la misma que la previamente descrita en el Capítulo 3.

#### **4.2.5. Análisis de datos**

Los parámetros biológicos entre las poblaciones de soja y alfalfa fueron comparados usando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (Lehmann 1975) ( $P < 0.05$ ). Para los datos de compatibilidad reproductiva, debido al alto número de combinaciones, el desempeño de todas las cruzas parentales fue comparado con los resultados de los otros tipos de cruzas (cruzas híbridas, retrocruzas y cruzas entre híbridos) usando el test de Kruskal-Wallis (1952) ( $P < 0.05$ ).

Para todos los estudios, los periodos de preoviposición, oviposición y postoviposición fueron comparados para aquellas hembras que pusieron huevos. La fecundidad total fue comparada para todas las hembras incluyendo aquellas que no pusieron huevos. Para la fertilidad total, las hembras que pusieron huevos, pero no tenían espermátóforos, no fueron incluidas. Los análisis estadísticos fueron realizados usando IBM SPSS Statistics (IBM Corp 2013), versión 22.0.

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Parámetros biológicos y reproductivos de poblaciones de *H. gelatopoeon* provenientes de distintas plantas hospederas**

En total, se evaluaron 46 y 33 cruzas parentales para determinar los parámetros biológicos y reproductivos de las poblaciones de soja y alfalfa, respectivamente. La duración de cada estado de desarrollo y los parámetros reproductivos se presentan en la Tabla 4.1.

Los parámetros biológicos que presentaron diferencias significativas entre las poblaciones de soja y alfalfa fueron el segundo estadio larval ( $W= 9305$ ;  $P= 0.003$ ), el cuarto estadio larval ( $W= 6754$ ;  $P= 0.02$ ); estos parámetros tuvieron mayor duración en la población de alfalfa, y el ciclo total ( $W= 1630$ ,  $P= 0.032$ ), que fue de mayor duración para la población de soja. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros reproductivos entre ambas poblaciones.

**Tabla 4.1.** Duración en días (media  $\pm$  EE) de los estados de huevo, larva (L1-L5) y pupa, masa pupal (mg), longevidad de macho y hembra (días), proporción de sexos (H:M) y ciclo de vida de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* recolectadas en soja y alfalfa en la provincia de Tucumán, Argentina.

Parámetros	Población soja	n	Rango	Población alfalfa	n	Rango
Huevo	3,00 $\pm$ 0,06a	12229	2-5	3,08 $\pm$ 0,07a	9894	2-4
L1	2,98 $\pm$ 0,07a	126	2-6	2,86 $\pm$ 0,06a	95	2-4
L2	2,02 $\pm$ 0,05a	106	1-4	2,26 $\pm$ 0,07b	86	1-4
L3	2,07 $\pm$ 0,04a	98	1-4	2,06 $\pm$ 0,06a	79	1-4
L4	2,32 $\pm$ 0,07a	90	1-4	2,77 $\pm$ 0,13b	73	1-9
L5	4,92 $\pm$ 0,09a	85	3-6	4,91 $\pm$ 0,09a	66	3-6
Ciclo larval	14,15 $\pm$ 0,14a	85	11-18	14,54 $\pm$ 0,15a	66	12-17
Pupa	11,35 $\pm$ 0,16a	59	8-15	10,98 $\pm$ 0,19a	56	8-14
Masa pupal	238,98 $\pm$ 3,73a	59	165-307	231,76 $\pm$ 5,09a	56	114-294
Longevidad hembra	14,5 $\pm$ 0,99a	46	6-26	13,66 $\pm$ 1,16a	33	6-33
Longevidad macho	19,39 $\pm$ 1,30a	46	5-31	15,65 $\pm$ 1,26a	33	5-24
Ciclo total	45,49 $\pm$ 0,92a	47	32-59	42,97 $\pm$ 0,88b	42	35-61
Proporción de sexos ♀:♂	1,18:1a	59		1:1,28a	56	
Espermatóforos por hembra	1,11 $\pm$ 0,11a	46	0-3	1,39 $\pm$ 0,32a	33	0-5
Periodo de preoviposición	4,33 $\pm$ 0,36a	33	1-9	5,38 $\pm$ 0,47a	26	1-10
Periodo de oviposición	6,09 $\pm$ 0,52a	33	1-13	5,19 $\pm$ 0,64a	26	1-14

Periodo de postoviposición	5,00 ± 0,69a	33	1-19	4,19 ± 0,51a	26	0-10
Fecundidad	330,51 ± 34a	37	0-770	366,44 ± 0,76a	27	0-1182
Fertilidad	77,57 ± 4,98a	33	0-100	79,62 ± 4,97a	26	0-99,12

Valores sucedidos por las mismas letras dentro de una fila no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Wilcoxon ( $P > 0,05$ )

#### **4.3.2. Compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de distintas plantas hospederas**

En total, se realizaron 79 cruzas parentales, 42 cruzas híbridas, 115 retrocruzas y 65 cruzas entre híbridos entre las poblaciones de soja y alfalfa (Tabla 4.2).

El único parámetro reproductivo que presentó diferencias significativas entre las dos poblaciones fue el periodo de postoviposición ( $H= 13.35$ ;  $P= 0.003$ ). El resto de los otros parámetros no mostraron diferencias significativas. En general, todas las cruzas híbridas, retrocruzas y cruzas entre híbridos mostraron valores similares a ambas cruzas parentales para todos los parámetros (Tablas 4.2 y 4.3).

**Tabla 4.2.** Número (media  $\pm$  EE) de espermátóforos por hembra, duración de los periodos de preoviposición, oviposición y postoviposición, fecundidad (número de huevos por hembra) y fertilidad (porcentaje de eclosión) de las cruzas parentales, híbridas, retrocruzas y cruzas entre híbridos de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* recolectadas en soja y alfalfa en la provincia de Tucumán, Argentina.

	Espermátóforos por hembra	Periodo de preoviposición (d)	Periodo de oviposición (d)	Periodo de postoviposición (d)	Fecundidad	Fertilidad
<b>Cruzas parentales</b>	1,23 $\pm$ 0,11a (79)	4,79 $\pm$ 0,29a (59)	5,69 $\pm$ 0,40a (59)	4,64 $\pm$ 0,44b (59)	345,67 $\pm$ 30,03a (64)	78,47 $\pm$ 3,51a (59)
<b>Cruzas híbridas</b>	1,07 $\pm$ 0,13a (42)	3,77 $\pm$ 0,40a (26)	5,73 $\pm$ 0,51a (26)	3,15 $\pm$ 0,55a (26)	376,41 $\pm$ 53,38a (31)	69,72 $\pm$ 6,98a (26)
<b>Retrocruzas</b>	0,97 $\pm$ 0,07a (115)	4,60 $\pm$ 0,30a (72)	5,01 $\pm$ 0,27a (72)	3,13 $\pm$ 0,27a (72)	298,00 $\pm$ 2,33a (84)	76,87 $\pm$ 3,16a (58)
<b>Cruzas entre híbridos</b>	1,18 $\pm$ 0,10a (65)	4,51 $\pm$ 0,30a (43)	4,95 $\pm$ 0,43a (43)	2,74 $\pm$ 0,35a (43)	250,26 $\pm$ 34,26a (53)	80,34 $\pm$ 3,67a (43)

Valores sucedidos por las mismas letras dentro de una columna no son significativamente diferentes de acuerdo al Test de Kruskal-Wallis ( $P > 0,05$ )

**Tabla 4.3.** Número (media  $\pm$  EE) de hembras copuladas, fecundidad y fertilidad de cada tipo de cruce de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* usando poblaciones recolectadas en soja (S) y alfalfa (A) en Tucumán, Argentina.

Tipos de cruces			N° parejas	Hembras copuladas	Fecundidad	Fertilidad
	♀	♂				
Cruzas parentales	S	S	46	36	339,69 $\pm$ 34,21 (36)	77,57 $\pm$ 4,98 (33)
Cruzas parentales	A	A	33	27	366,44 $\pm$ 54,09 (27)	79,61 $\pm$ 4,97 (26)
Cruzas híbridas	S	A	16	13	317,38 $\pm$ 87,27 (13)	58,6 $\pm$ 13,23 (11)
Cruza shíbridas	A	S	26	18	419,05 $\pm$ 67,63 (18)	77,86 $\pm$ 6,91 (15)
Retrocruzas	A	F1 (A♀ x S♂)	12	8	261,00 $\pm$ 72,30 (8)	86,82 $\pm$ 3,85 (6)
Retrocruzas	A	F1 (S♀ x A♂)	10	7	285,43 $\pm$ 65,17 (7)	67,83 $\pm$ 13,88 (6)
Retrocruzas	S	F1 (A♀ x S♂)	11	9	352,11 $\pm$ 70,14 (9)	61,61 $\pm$ 15,47 (9)
Retrocruzas	S	F1 (S♀ x A♂)	12	8	238,12 $\pm$ 71,25 (8)	81,84 $\pm$ 5,40 (6)
Retrocruzas	F1 (A♀ x S♂)	A	12	10	259,20 $\pm$ 64,94 (10)	74,21 $\pm$ 14,47 (8)
Retrocruzas	F1 (A♀ x S♂)	S	10	5	428,60 $\pm$ 51,25 (5)	85,41 $\pm$ 3,36 (5)
Retrocruzas	F1 (S♀ x A♂)	A	22	14	316,50 $\pm$ 60,03 (14)	70,28 $\pm$ 5,53 (14)
Retrocruzas	F1 (S♀ x A♂)	S	26	23	290,95 $\pm$ 46,73 (23)	84,24 $\pm$ 5,18 (18)
Cruzas entre híbridos	F1 (S♀ x A♂)	F1 (A♀ x S♂)	14	11	344,36 $\pm$ 99,73 (11)	82,86 $\pm$ 5,25 (9)
Cruzas entre híbridos	F1 (S♀ x A♂)	F1 (S♀ x A♂)	15	9	169,88 $\pm$ 60,93 (9)	75,07 $\pm$ 15,80 (6)
Cruzas entre híbridos	F1 (A♀ x S♂)	F1 (A♀ x S♂)	21	20	236,50 $\pm$ 45,36 (20)	81,30 $\pm$ 4,66 (19)
Cruzas entre híbridos	F1 (A♀ x S♂)	F1 (S♀ x A♂)	15	13	247,46 $\pm$ 77,30 (13)	79,31 $\pm$ 10,04 (9)



#### 4.4. Discusión

En este capítulo se compararon características biológicas y reproductivas y se determinó la compatibilidad reproductiva entre dos poblaciones de *H. gelotopoeon* recolectadas en diferentes plantas hospederas en Tucumán, Argentina.

Las poblaciones de soja y alfalfa criadas en dieta artificial, mostraron características biológicas y reproductivas similares. Sin embargo, se encontraron diferencias en la duración del segundo y cuarto estadio larval y en el ciclo total. La duración de estos parámetros fue mayor para la población de alfalfa pero el ciclo total fue mayor para la población de soja (Tabla 4.1). Los resultados de estos estudios mostraron que las poblaciones de la oruga bolillera de las plantas hospederas de soja y alfalfa tardan 45 y 43 días, respectivamente, en completar una sola generación (de huevo a adulto) bajo condiciones de laboratorio. Aunque la diferencia es sólo de dos días, es plausible que esta demora en el desarrollo pueda exacerbarse bajo condiciones de campo. Esta situación podría llevar a una asincronía en la emergencia de adultos en las siguientes generaciones por lo que podrían no tener lugar cruces exitosas entre las poblaciones de *H. gelotopoeon*. Considerando que los refugios idealmente deberían producir adultos en sincronía con los adultos producidos por los cultivos Bt, esta asincronía podría representar un problema para la eficacia de esta estrategia. Jakka et al. (2014) encontraron que una asincronía de emergencia de 2-3 días en *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep. Noctuidae) disminuiría significativamente la eficacia de los refugios. Sin embargo, estudios realizados por Vijaykumar et al. (2007) en *H. armigera* reportaron que incluso con diferencias fenológicas, se mantuvo una alta probabilidad de apareamientos entre poblaciones de esta especie debido al patrón de emergencia escalonada y generaciones superpuestas. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo más estudios, por ejemplo, sobre

dinámica de poblaciones y tiempo de desarrollo de *H. gelotopoeon* en cultivos Bt para poder llegar a conclusiones más robustas.

La duración de los estados de huevo, larva, pupa y adulto, la proporción de sexos y el número de estadios larvales fueron similares a aquellos observados para *H. gelotopoeon* (Navarro et al. 2009, Iannone y Leiva 1993) y *H. armigera* (Ali et al. 2009, Sharma et al. 2011, Jha et al. 2012, Amer y El-Sayed 2014, Reigada et al. 2016).

El número de espermátóforos encontrados en las hembras disectadas fue generalmente uno para ambas poblaciones. Valores similares fueron obtenidos por Coombs et al. (1993) para *H. armigera* y *H. punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) y por Callahan (1958) y Navarro (1987) para *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae).

Los valores de fecundidad y fertilidad en general fueron similares a aquellos reportados para *H. gelotopoeon* (Urretabizkaya et al. 2010) y *H. armigera* (Nasreen y Mustafa 2000, Sharma et al. 2011).

Las diferentes cruzas realizadas entre las poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de las plantas hospederas de soja y alfalfa no presentaron signos de incompatibilidad precigótica y postcigótica, sugiriendo que ambas poblaciones de *H. gelotopoeon* pueden aparearse libremente.

No existen trabajos previos con respecto a estudios de compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de distintas plantas hospederas. No obstante, Vijaykumar et al. (2007) evaluó la compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *H. armigera* de ocho plantas hospederas. Estos autores encontraron que estas poblaciones eran capaces de aparearse exitosamente, producir descendencia viable y de mantener su capacidad reproductiva en generaciones subsecuentes. Concluyeron, de esta manera, que estas plantas hospederas podrían jugar un rol importante como refugios naturales. Estudios

llevados a cabo por Green et al. (2003) y Ravi et al. (2005) en *H. armigera* también encontraron varias especies de plantas hospederas que podrían actuar como importantes fuentes de refugio para las plantaciones de algodón *Bt*.

Los resultados obtenidos en este capítulo indican claramente que no hay signos de aislamiento por asociación a la planta hospedera entre las poblaciones de soja y alfalfa, dado que se aparearon libremente sin reducción en su capacidad reproductiva. Esta falta de aislamiento permite el intercambio genético entre estas poblaciones, lo cual puede ser explicado por el comportamiento generalista de esta especie (Navarro et al. 2009).

# Capítulo 5

---

**Diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* sobre la base de marcadores nucleares**



## 5.1. Introducción

Los insectos comprenden la mayor cantidad de especies en todo el reino animal y poseen una vasta diversidad genética por lo general inexplorada, que puede ser estudiada utilizando técnicas de marcadores moleculares (Behura 2006).

En los insectos, los marcadores de ADN son usados para obtener información cruda sobre la cual se pueden hacer estimaciones sobre diversidad genética y flujo génico entre especies, identificar haplotipos y linajes o inferir flujos migratorios e historiales de colonización, entre otras aplicaciones (Hale y Singh 1991, Yoon y Aquadro 1994, Salvato et al. 2002, Llewellyn et al. 2003, Bosio et al. 2005). Además, los datos moleculares pueden proveer los medios para diferenciar las especies simpátricas de las especies parapátricas y alopátricas (Ballinger-Crabtree et al. 1992, Wilkerson et al. 1993, Margonari et al. 2004). El flujo génico y las variaciones genéticas dentro y entre especies de insectos, medidas a partir de datos de marcadores, son críticas para establecer una explicación significativa para la estructura y dinámica poblacional (Cervera et al. 2000, Wong et al. 2000, Takami et al. 2004, Mendelson y Shaw 2005).

Los entomólogos, con una frecuencia cada vez mayor, manejan los sistemas refinados de marcadores y están aplicando nuevas técnicas para estudiar los genomas de los insectos de manera más eficiente. Las tendencias actuales de aplicación de técnicas de marcadores de ADN en diversos dominios de estudios ecológicos de insectos muestran que los marcadores moleculares, incluyendo los microsatélites, han contribuido significativamente en los progresos para entender las bases genéticas de la diversidad de insectos y para mapear loci de caracteres cuantitativos y/o genes importantes desde el punto de vista agronómico (Behura 2006).

Los microsatélites, o las secuencias de repetición simple (SSRs, Simple Sequence Repeats, o STR, Short Tandem Repeats), a los cuales la literatura hace también referencia como número variable de repeticiones en tándem (VNTRs, Variable Number of Tandem Repeats), pueden ser encontrados a lo largo de los genomas nucleares de la mayoría de los eucariotes y en menor cantidad, en procariotes (Jarne y Lagoda 1996, Vaughan y Lloyd 2003). También han sido identificados en el cloroplasto de plantas (Cato y Richardson 1996, Chung et al. 2006) así como en genomas mitocondriales de plantas y animales (Hoelzel et al. 1994, Soranzo et al. 1999, van Oppen et al. 2000, Rajen-drakumar et al. 2007).

Los microsatélites son regiones de ADN que consisten en repeticiones en tándem de 1-6 pares de bases (pb). El número de repeticiones puede variar de 5 a 20 (Goodfellow 1992, Vaughan y Loyd 2003, Ellegren 2004). La cantidad de especies para las que se han caracterizado loci de microsatélites está creciendo casi diariamente y las secuencias que flanquean los loci de microsatélites son generalmente conservadas entre especies relacionadas, lo que significa que los cebadores de microsatélites algunas veces pueden ser usados para generar datos de múltiples especies. Esto se conoce como transferibilidad, y ha sido citado para muchas especies de Heliiothinae (Grasela y McIntosh 2005).

Los microsatélites mutan mucho más rápido que la mayoría de los otros tipos de secuencias, con tasas de mutación estimadas alrededor de  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  eventos por locus por replicación en levaduras (Strand et al. 1993) y alrededor de  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  en ratones (Dallas 1992). Estas altas tasas de mutación significan que en general hay múltiples alelos en cada locus y este alto nivel de polimorfismo los hace adecuados para inferir eventos poblacionales genéticos relativamente recientes. Los microsatélites son codominantes, abundantes (representando ~3% del ADN del genoma humano), relativamente distribuidos de manera

uniforme a lo largo de la parte eucromática de los genomas (Ellegren 2004, Schlotterer 2004), económicos, robustos y reproducibles (Weber y May 1989, Schuelke 2000).

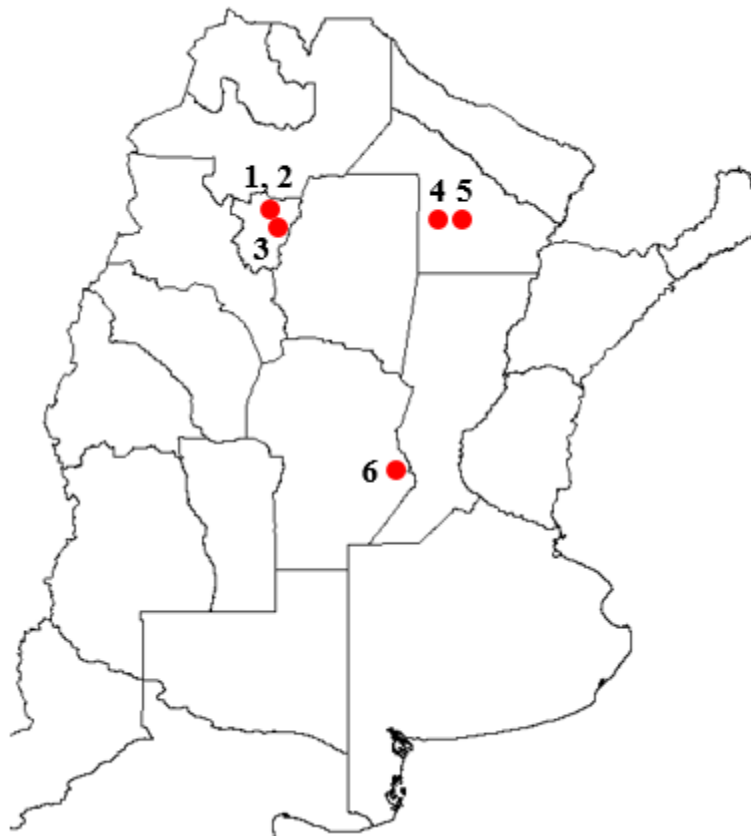
En conclusión, la alta variabilidad, la naturaleza codominante y su disponibilidad cada vez mayor, han hecho de los microsatélites poderosos marcadores para el mapeo genético, el estudio de la diversidad genética y la concreción de estudios poblacionales y evolutivos en especies eucariotas incluyendo mamíferos, plantas y, por supuesto, insectos (Wang et al. 2009).

No es casual que los microsatélites hayan sido uno de los marcadores más utilizados recientemente en estudios de estructuración poblacional para especies del complejo *Heliathinae* (Scott et al. 2003, Scott et al. 2005, Endersby et al. 2006, Scott et al. 2006, Subramanian y Mohankumar 2006, Vassal et al. 2008, Khiaban et al. 2010, Perera y Blanco 2011, Domingues et al. 2012, Silva et al. 2018). En este sentido, un mejor entendimiento de las diferencias genéticas de una plaga polífaga como *H. gelotopoeon* puede ser muy útil para entender la estructura y las dinámicas poblacionales, su comportamiento y respuesta a varias presiones de selección. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue analizar la variabilidad y estructura genética dentro y entre poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de distintas regiones y plantas hospederas de la Argentina mediante la utilización de marcadores microsatélites.

## **5.2. Materiales y métodos**

### **5.2.1. Recolección y cría de las poblaciones**

Para el análisis genético de poblaciones de *H. gelotopoeon* se utilizaron las mismas técnicas de recolección y de cría previamente mencionadas en el capítulo 2. Las poblaciones utilizadas y la distancia geográfica entre ellas se detallan en la Figura 5.1 y en las Tablas 5.1 y 5.2.



**Figura 5.1.** Ubicación geográfica de los lugares en los que se realizó la recolección de las poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon*. **1:** San Agustín, Tucumán (garbanzo), **2:** San Agustín, Tucumán (soja), **3:** Vipos, Tucumán (alfalfa), **4:** Las Breñas, Chaco (Trampa luminosa), **5:** Saenz Peña, Chaco (soja), **6:** Marcos Juárez, Córdoba (garbanzo)



**Tabla 5.1.** Detalle de los sitios de muestro, georeferencias, fechas de recolección, plantas hospederas, número de individuos y código de las poblaciones de *H. gelotopoeon* utilizadas para este análisis.

Región geográfica	Provincia	Localidad	Coordenadas geográficas	Fecha de recolección	Planta hospedera	Nº de ind.	Código
Noroeste	Tucumán	Cruz Alta	26°50'21''S	Enero 2016	Soja	34	Tuc.Soja**
			64°51'32''W	Septiembre 2014	Garbanzo	37	Tuc.Garb**
		Trancas	26°28'S 65° 18'W	Diciembre 2015	Alfalfa	27	Tuc.Alf**
Noreste	Chaco	Sáenz Peña	26°47'22''S 60°27'03''W	Febrero 2014	Soja	26	Cha.Soja
		Las Breñas	27° 05'20''S 61° 06' 20''W	Febrero 2016	Trampa luminosa*	34	Cha.Alg
		Marcos Juárez	32°43'14,25''S 62°07'00,30''W	Octubre 2014	Garbanzo	38	Cba.Garb**

\*Los individuos fueron recolectados de una trampa luminosa que se encontraba en un campo de algodón.

\*\*Poblaciones utilizadas para los estudios de los capítulos 3 y 4.

**Tabla 5.2.** Distancia geográfica existente entre las poblaciones de *H. gelotopoeon* expresada en kilómetros.

	Tuc.Soja	Tuc.Garb	Tuc.Alf	Cha.Soja	Cha.Alg	Cba.Garb
Tuc.Soja	0,00	0,00	60,31	437,5 0	373,00	705,40
Tuc.Garb		0,00	60,31	437,5 0	373,00	705,40
Tuc.Alf			0,000	483,30	422,10	760,40
Cha.Soja				0,00	72,94	678,80
Cha.Alg					0,00	633,70
Cba.Garb						0,00

### 5.2.2. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total a partir de 198 adultos de *H. gelotopoeon* usando el protocolo de Rogers y Bendich (1988), con algunas modificaciones. Se utilizaron solo la cabeza y las patas de cada individuo para evitar la posible contaminación por presencia de microorganismos como bacterias, protozoos y nematodos que ocurren naturalmente en la hemolinfa (Fuxa et al. 2000, Sosa-Gómez et al. 2002).

Se maceraron las cabezas y patas de los individuos en 480 µl de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8, 2M NaCl, 70 mM EDTA, 1% β-Mercaptoetanol); se adicionó CTAB 10% y se homogeneizó. Posteriormente se incubó a baño maría a 65°C durante 5 minutos, se adicionó Proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó nuevamente a 65°C durante 60 minutos. Luego se agregaron 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos para separar las dos fases. Se extrajo el sobrenadante, que fue transferido a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se adicionaron 400 µl de isopropanol y 10M de acetato de amonio para precipitar el ADN. Se mantuvo a -20°C por dos horas y se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante con cuidado y se lavó el pellet con 300 µl de etanol 70%; se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionaron 100,8 µl de solución de RNAsa (40 µg/ml) en tampón TE. Finalmente, se incubaron las muestras a 37°C durante un mínimo de 30 minutos para degradar el ARN.

La integridad del ADN fue verificada por electroforesis, conducida en un tampón TBE 1X, a 120V por una hora en gel de agarosa 1%, teñido con 10 mg/ml de Bromuro de Etidio y visualizado en un transiluminador L-PIX- ST y L-PIX IMAGE 7.1 M Pixel, utilizando el programa de captura de imagen L-PIX IMAGE 1.0.1 (Loccus Biotecnología,

São Paulo, SP). La concentración de ADN fue determinada con un espectrómetro Nanodrop 8000 (Thermo scientific, Wilmington, DE) y las muestras que mostraron tener ADN en cantidad y calidad suficiente fueron diluidas para obtener la concentración de las diluciones de trabajo de 10 ng de ADN total/ $\mu\text{l}$  y almacenadas en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### **5.2.3. Obtención y caracterización de marcadores microsatélites**

El ADN genómico de los adultos de *H. gelotopoeon* fue sujeto a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 20 cebadores de microsatélites (Ji et al. 2003, Scott et al. 2004) desarrollados por estos autores para *H. armigera* (Tabla 5.3). Estos loci fueron evaluados bajo diferentes condiciones para lograr amplificar estas regiones y sometidos a genotipado individual en un secuenciador automático. Para la lectura en el secuenciador automático, se añadió una secuencia adicional M13 (5'- TGTA AACGACGGCCAGT-3') a la extremidad 5' del cebador forward de cada locus, posibilitando el marcado de los productos de PCR con fluorescencias (Schuelke 2000).

Las reacciones de amplificación fueron realizadas con un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  conteniendo 2  $\mu\text{L}$  de DNA (5 ng/ $\mu\text{L}$ ); 4,5  $\mu\text{L}$  de Taq Green; 0,08  $\mu\text{L}$  del Primer forward (10  $\mu\text{M}$ ); 0,21  $\mu\text{L}$  del Primer reverse (10  $\mu\text{M}$ ); 0,21  $\mu\text{L}$  de M13 marcado con fluorescencia y 3  $\mu\text{L}$  de agua. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador PTC 200 (MJ Research). En la reacción de amplificación las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente a  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguida por 35 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos, alineamiento a diferentes temperaturas dependiendo del primer (Tabla 5.3) por 40 segundos, y extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos. El protocolo de PCR finalizó con una extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y

luego se mantuvo a 4°C. Un control sin ADN de la muestra fue sometido con cada cebador para descartar contaminación.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de poliacrilamida al 7% a 80V por 15 min y 200V por 220 min en un tampón de TBE 5X. Las muestras que amplificaron correctamente fueron sometidas a electroforesis en el secuenciador automático ABI-PRISM 3500 xL (Applied Biosystems), utilizando como marcador de peso molecular GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems). La lectura de los fragmentos amplificados para cada genotipo fue realizada en el programa GeneMarker v.2.4 (SoftGenetics LLC, State College, PA).

#### **5.2.4. Análisis de datos**

De los 20 locus probados, con seis se lograron amplificar todas las muestras mientras que con los 14 restantes no se obtuvieron datos contundentes. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ), el número de marcadores polimórficos y el porcentaje de polimorfismo fueron estimados con el programa GenAlex v. 6.41 (Peakall y Smouse 2006). La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y el número de marcadores generados fueron estimados usando el programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier y Lischer 2010). La riqueza alélica (AR) fue estimada con el programa FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2002) y el contenido de información polimórfica (PIC) con el programa Cervus v. 3.0 (Marshall et al. 1998).

La diversidad genética de las poblaciones de *H. gelotopoeon* fue calculada usando los siguientes programas: 1) MicroChecker v. 2.2.1 (Van Oosterhout et al. 2004) para verificar la presencia de alelos nulos, alelos “*drop-out*”, picos “*stutters*” y otros errores de genotipado; 2) GenAlex v. 6.41 (Peakall y Smouse 2006) para calcular el número total de alelos (A), número de alelos únicos (Nu), número promedio de alelos (Na), número efectivo de alelos

por locus ( $N_e$ ) y la heterocigosidad observada ( $H_o$ ); 3) Arlequin v. 3.5 (Excoffier y Lischer 2010) para calcular la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), el coeficiente de endogamia (FIS) y posibles desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg; y 4) FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2002) para calcular la riqueza alélica (AR).

Con respecto al análisis de la estructura genética, fueron utilizados los siguientes programas: 1) Arlequin v. 3.11 (Excoffier y Lischer 2010) para calcular el AMOVA (Análisis de la varianza molecular), el cual describe la partición de la variación genética dentro y entre las poblaciones, y también permite estimar la diferenciación genética poblacional par a par usando el índice  $F_{st}$  (Weir y Cockerham 1984) con 10000 permutaciones para estimaciones de significancia; 2) Structure v. 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) para verificar la posible estructura genética entre las poblaciones por medio de inferencia Bayesiana, usando el modelo de ancestralidad “admixture ancestry model”, con alelos correlacionados. Las estimaciones del número de poblaciones ( $K$ ), fueron realizadas variando de uno a veinte ( $K = 1$  a  $20$ ) (Evanno et al. 2005), reproduciendo 20 corridas para cada valor de  $K$ , con 50.000 interacciones en el “*burn-in*” y 500.000 interacciones en la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC); 3) El aplicativo Structure Harvester v. 0.6.94 (Earl y Von Holdt 2012) fue utilizado para estimar el valor de  $K$  que mejor se ajusta a los datos, basándose en los criterios propuestos por Evanno et al. (2005) ( $\Delta K$ ) y Pritchard y Wen (2004) (likelihood  $\ln(K)$ ); 4) CLUMPP v. 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg 2007) y DISTRICT v. 1.1 (Rosenberg 2004), programas usados para generar el gráfico de la estructuración genética; 5) GenAlex fue utilizado para realizar el gráfico del Análisis de Coordenadas Principales y el test de Mantel, utilizado para determinar si existe correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética; 6) el paquete R-adeget (Jombart 2008) para realizar el análisis discriminante de

coordenadas principales (DAPC) con el fin de determinar la estructuración poblacional de *H. gelotopoeon*.

### **5.3. Resultados**

#### **5.3.1. Obtención y caracterización de marcadores microsatélites en *H. gelotopoeon***

Para los seis microsatélites utilizados, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) varió entre 0,09 (HgelSSR2) y 0,68 (HgelSSR1) y entre 0,31 (HgelSSR6) y 0,71 (HgelSSR1) respectivamente. En total, se encontraron 52 alelos en los seis loci de microsatélites para los 196 individuos de *H. gelotopoeon*. El número más alto de marcadores fue producido por el locus HgelSSR1. Este marcador también demostró ser muy informativo, con un contenido de información polimórfica de 0,73 y el mayor valor de riqueza alélica (8,10) (Tabla 5.3).

El programa MicroChecker indicó alelos nulos en cinco loci, pero no mostró evidencia de “*drop-out*” de alelos, ni de error de genotipado debido a “*stuttering*”.

**Tabla 5.3.** Descripción de los seis loci microsatélites aislados de *Helicoverpa gelotopoeon* y resultados para cada uno de los cebadores flanqueantes.

Locus	Cebador (5' – 3')	Motivo de repetición	pb <sup>1</sup>	Ta (°C) <sup>2</sup>	Ho <sup>3</sup>	He <sup>4</sup>	A <sup>5</sup>	MP <sup>6</sup>	%P <sup>7</sup>	AR <sup>8</sup>	PIC <sup>9</sup>
HgelSSR1	F: TAGGTGATTGTGGCTCAGTTTT R: CAAACCCATCAGCAAATGCAAC	(TGC)2GAT(TGY)4GAT	228-288	63	0,68	0,71	12	12	100%	8,10	0,73
HgelSSR2	F: CACCACCTGACATAACGC R: AAGGAGCAGCAATTGCAAGC	(CTG)2(TTG)3(CTG)5(TTG)2	162	60,60	0,09	0,43	6	6	100%	3,65	0,41
HgelSSR3	F: CAGGACATGCAATGATGAG R: TTTGATACTGAGTCTGATGTG	(CAN)46CTTCAA(CAG)2(CAA)3	223-288	58,30	0,23	0,44	10	10	100%	4,66	0,43
HgelSSR4	F: TCCACACAGTTTGCATTATGA R: CACCACCTGACATAACGC	(ATTT) <sub>5</sub>	161	59,60	0,14	0,52	6	6	100%	4,81	0,54
HgelSSR5	F: TGTTACTTGGGTTTCCTGAATA R: ACCACCGACACGTGCCGACTTC	(GYT) <sub>25</sub>	166-196	59,40	0,22	0,71	11	11	100%	6,64	0,72
HgelSSR6	F: ACGCGAGCACCAACTGTAA R: GAGACCAATAGCAGTAGTTC	(TC) <sub>5</sub>	53	62,10	0,32	0,31	7	7	100%	3,81	0,29
Media					<b>0,28</b>	<b>0,52</b>	<b>8,70</b>	<b>8,70</b>	<b>100%</b>	<b>5,28</b>	<b>0,52</b>

<sup>1</sup>pb Tamaño de los alelos en pares de bases; <sup>2</sup>Ta – Temperatura de alineamiento; <sup>3</sup>Ho Heterocigosidad observada; <sup>4</sup>He Heterocigosidad esperada; <sup>5</sup>A Número de alelos por locus; <sup>6</sup>MP Marcadores polimórficos; <sup>7</sup>%P Porcentaje de polimorfismo; <sup>8</sup>AR Riqueza alélica; <sup>9</sup>PIC Contenido de información polimórfica

### 5.3.2. Diversidad genética de poblaciones de *H. gelotopoeon*

El genotipado de los 196 individuos de *H. gelotopoeon* recolectados en distintas plantas hospederas y regiones de Argentina, mostró un promedio de 29 alelos por población. El número de alelos por población varió de 21 (Cha.Soja) a 31 (Tuc.Soja y Cha.Alg), con una media de alelos por locus ( $N_A$ ) y alelos efectivos (NE) variando de 3,50 a 5,17 y 2,03 a 3,03 respectivamente (Tabla 5.4). La riqueza alélica varió de 4,30 (Tuc.Garb) a 4,92 (Tuc.Soja) con una media de 4,40. La única población que no presentó alelos únicos fue Cha.Soja; para el resto varió entre valores de 1 a 6 alelos únicos por población. La heterocigosis observada promedio para todas las poblaciones fue de 0,280, encontrándose entre valores de 0,24 (Cba.Garb) y 0,30 (Tuc.Garb y Tuc.Alf) y la heterocigosis esperada promedio fue 0,52 encontrándose entre valores de 0,42 (Cha.Soja) a 0,60 (Tuc.Soja) (Tabla 5.4).

La estimación de la heterocigosis observada fue menor que la esperada para todas las poblaciones, y el Fis presentó valores significativos en la mayoría de las poblaciones. También se observaron desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en todas las poblaciones, variando de tres a cinco loci por población.



**Tabla 5.4.** Parámetros de diversidad genética de *Helicoverpa gelotopoeon* obtenidos a partir de seis marcadores microsatélites.

Población	A <sup>1</sup>	Nu <sup>2</sup>	RA <sup>3</sup>	Na <sup>4</sup>	Ne <sup>5</sup>	Ho <sup>6</sup>	He <sup>7</sup>	F <sub>is</sub> <sup>8</sup>	EHW <sup>9**</sup>
Tuc.Soja	31	1	4,92	5,17	3,03	0,28	0,60	0,36*	3 HgelSSR2, 4, 5
Tuc.Garb	30	1	4,30	5,00	2,38	0,30	0,53	0,32*	3 HgelSSR 2, 4, 5
Tuc.Alf	29	4	4,65	4,83	2,24	0,30	0,50	0,08	5 HgelSSR 2, 3, 4, 5, 6
Cha.Soja	21	0	3,43	3,50	2,03	0,27	0,42	-0,10	4 HgelSSR 2, 3, 4, 5
Cha.Alg	31	6	4,59	5,17	2,45	0,29	0,53	0,26*	4 HgelSSR 2, 3, 4, 5
Cba.Garb	30	3	4,52	5,00	2,52	0,24	0,55	0,39*	5 HgelSSR 1, 2, 3, 4, 5
<b>Media</b>	<b>29</b>	<b>3</b>	<b>4,40</b>	<b>4,78</b>	<b>2,44</b>	<b>0,28</b>	<b>0,52</b>		

<sup>1</sup>A Número total de alelos; <sup>2</sup>Nu Número de alelos únicos; <sup>3</sup>RA Riqueza alélica; <sup>4</sup>Na Número medio de alelos; <sup>5</sup>Ne Número de alelos efectivos; <sup>6</sup>Ho Heterocigosidad observada; <sup>7</sup>He Heterocigosidad esperada; <sup>8</sup>F<sub>is</sub> Coeficiente de endogamia; <sup>9</sup>EHW Equilibrio de Hardy-Weinberg; \* Valor significativo para el coeficiente de endogamia (F<sub>is</sub>); \*\*Número y nombre de los loci con desvío de EHW.

### 5.3.3. Estructuración genética de poblaciones de *H. gelotopoeon*

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) indicó que la mayor parte de la variación ocurre dentro de las poblaciones (95,76%), mientras que apenas el 4,24% ocurre entre ellas (Tabla 5.5).

La estimación de la diferenciación genética par a par (Fst) indicó una diferenciación genética baja entre poblaciones. Los mismos resultados se obtuvieron al comparar las agrupaciones realizadas por planta hospedera y región (Tabla 5.5).

Al comparar las poblaciones, las estimaciones de Fst mostraron una diferenciación genética de baja a moderada (Tabla 5.6), con los mayores valores representados al comparar las poblaciones de Cha.Soja y Cha.Alg.

**Tabla 5.5.** Análisis de la varianza molecular (AMOVA) utilizando Fst de seis microsatélites para poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* agrupadas por población, plantas hospederas y regiones.

Modelo	Fuente de variación	g.l.	Índices de fijación	Porcentaje de variación
<b>A. Poblaciones</b>	Entre poblaciones	5	FST: 0,04242	4,24
	Dentro de las poblaciones	386		95,76
<b>B. Plantas hospederas</b>	Entre plantas hospederas	3	FCT: 0,00152	-0,15
	Entre poblaciones dentro de las plantas hospederas	2	FSC: 0,04366	4,37
	Entre las poblaciones	386	FST: 0,04221	95,78
<b>C. Regiones</b>	Entre regiones	2	FCT: -0,02167	-2,17
	Entre poblaciones dentro de las regiones	3	FSC: 0,05761	6,10
	Entre las poblaciones	386	FST: 0,03719	94,86

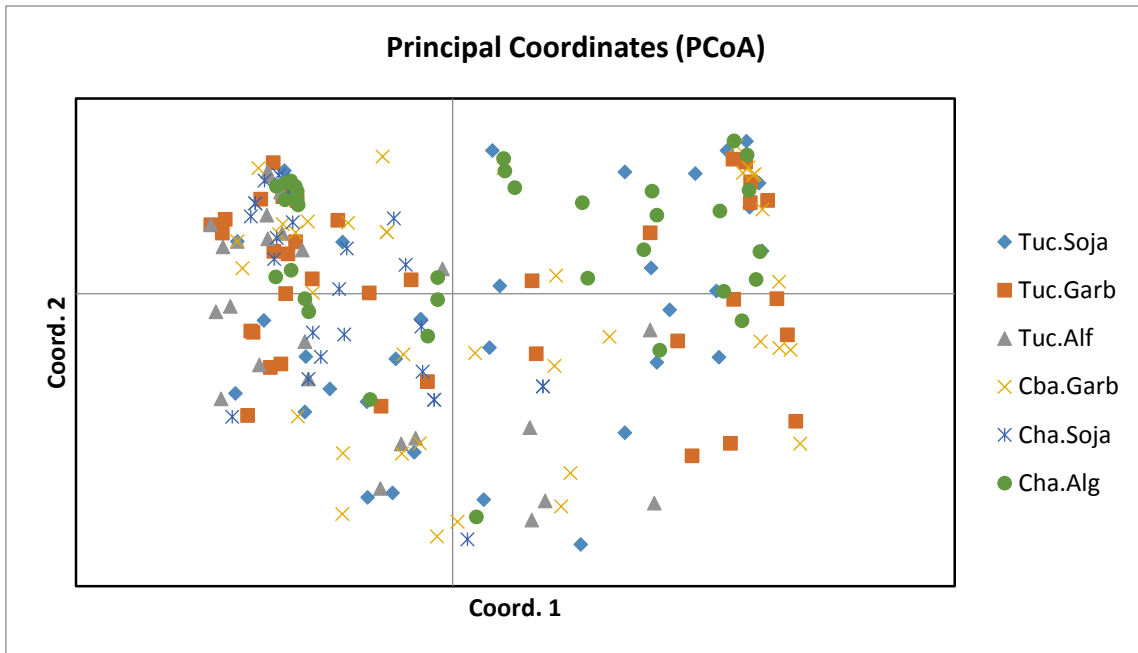
**Tabla 5.6.** Valores estimados de diferenciación genética par a par de Fst de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon*.

<b>Tuc.Soja</b>	<b>Tuc.Garb</b>	<b>Tuc.Alf</b>	<b>Cba.Garb</b>	<b>Cha.Soja</b>	<b>Cha.Alg</b>	
0,00418						<b>Tuc.Soja</b>
0,06763*	0,04157					<b>Tuc.Garb</b>
0,00832	0,00682	0,04305				<b>Tuc.Alf</b>
0,08864*	0,08387*	0,05753*	0,09481*			<b>Cba.Garb</b>
0,00531	-0,00147	0,08312*	0,02435	0,11572*		<b>Cha.Soja</b>
						<b>Cha.Alg</b>

\*Test de significancia usando 1000 permutaciones (P<0,01)

El análisis de correlación entre las distancias geográficas y genéticas reveló una falta de asociación significativa entre ellas (Test de Mantel,  $r^2 = 0,0198$ , P=0,146).

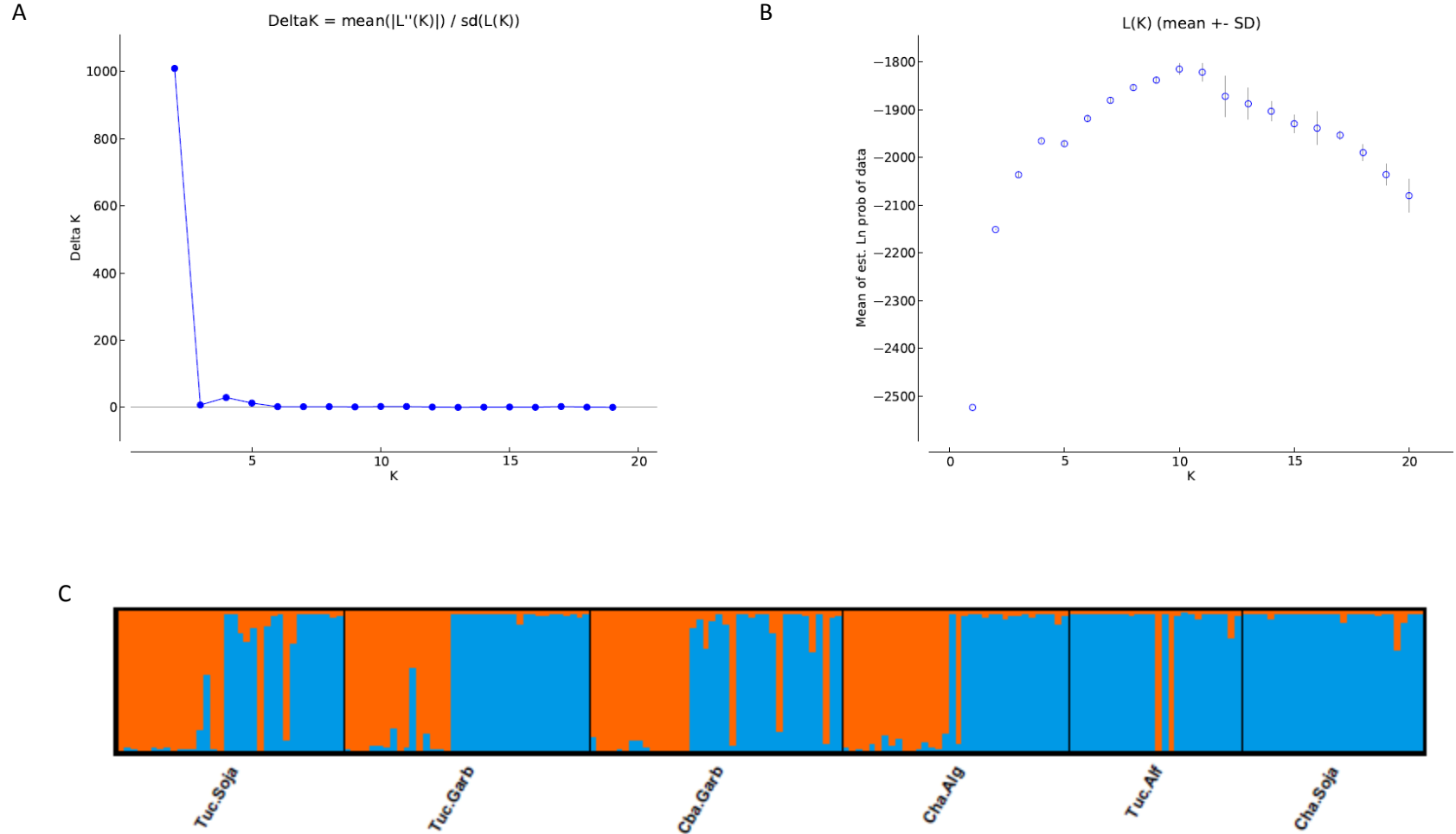
El análisis de coordenadas principales de todos los individuos de las seis poblaciones de *H. gelotopoeon* no reveló ningún patrón de agrupación por planta hospedera, región geográfica o por población entre los individuos (Figura 5.2).



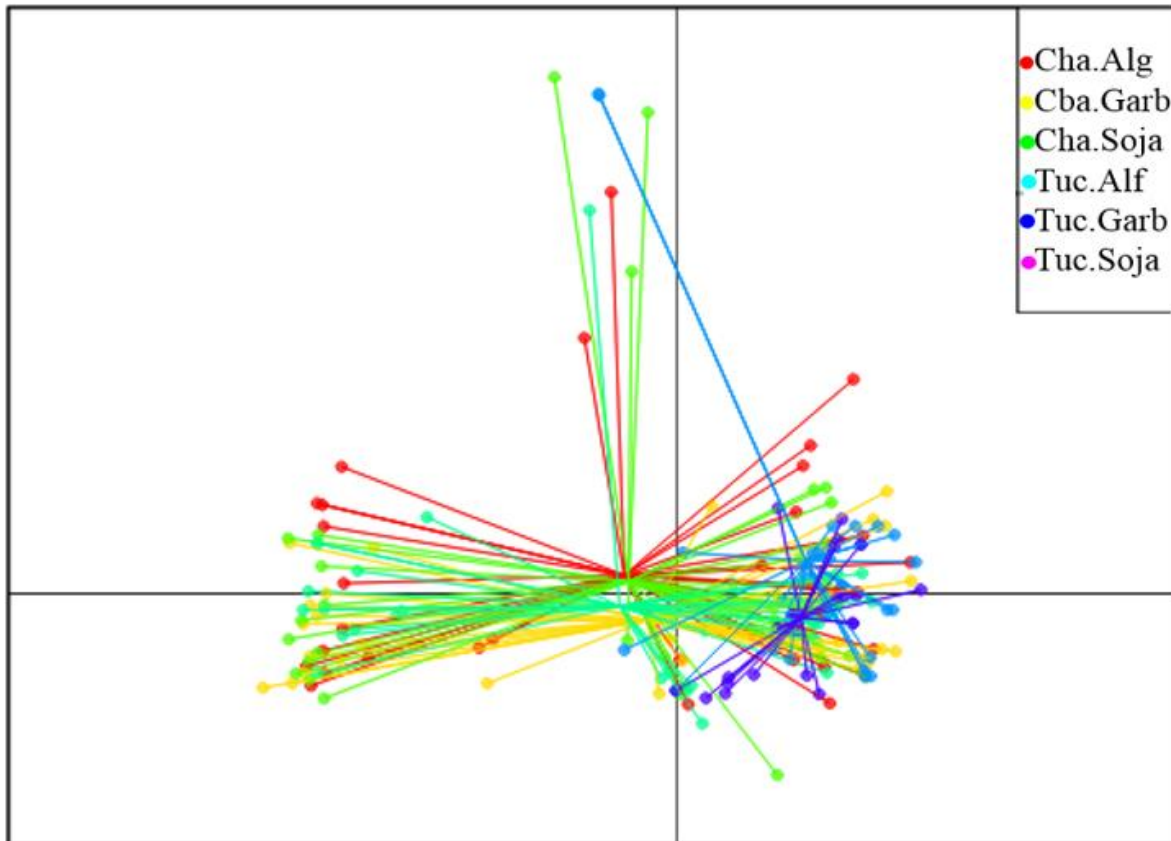
**Figura 5.2.** Gráfico del análisis de coordenadas principales de los individuos de *Helicoverpa gelotopoeon*.

El análisis de agrupamientos Bayesianos realizado por el programa Structure, indicó que el valor más probable de K (número de agrupaciones), a partir de L (K) y delta K ( $\Delta K$ ) fue K = 2 (Figuras 5.3A y 5.3B). Sin embargo, la representación gráfica de este análisis mostró que estos grupos no están correlacionados con la distancia geográfica, planta hospedera o año de recolección (Figura 5.3C).

Sin embargo, en el gráfico de DAPC (Figura 5.4) no se observaron grupos delimitados por planta hospedera, distancia geográfica o año de recolección, coincidiendo de esta manera con el análisis de coordenadas principales.



**Figura 5.3.** Estimaciones de K (número de clusters) (A) basado en el valor de  $\Delta K$  (Evanno et al. 2005) y (B) basado en la verosimilitud promedio Ln (K). (C) Structure bar representando el análisis bayesiano para seis poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon*; cada columna representa un individuo y los colores (azul y naranja) indican las proporciones relativas del genoma de cada individuo que pertenece a cada uno de los clusters.



**Figura 5.4.** Gráfico de dispersión del análisis discriminante de componentes principales (DAPC). Cada punto representa un genotipo individual, cada color una población y cada elipse un grupo.

#### 5.4. Discusión

En este capítulo se utilizaron marcadores microsatélites para comprobar si los componentes geografía y planta hospedera constituían factores significativos que explicaran la variación genética en poblaciones argentinas de *H. gelotopoeon*. De modo general, los resultados mostraron una alta variabilidad genética y una baja estructuración entre las poblaciones de *H. gelotopoeon* estudiadas. Tampoco se observó una diferenciación genética que pueda ser atribuida a los factores planta hospedera o región.

Ningún estudio previo ha examinado la diversidad y estructuración genética en poblaciones de *H. gelotopoeon* haciendo uso de marcadores microsatélites. Sin embargo, dichos estudios sí fueron realizados para otras especies del género *Helicoverpa* (Scott et al. 2003, Scott et al. 2005, Endersby et al. 2006, Scott et al. 2006, Subramanian y Mohankumar 2006, Vassal et al. 2008, Khiaban et al. 2010, Perera y Blanco 2011, Domingues et al. 2012, Seymour 2016, Leite et al. 2017, Silva et al. 2018). En este estudio se obtuvieron en promedio 8,7 alelos por locus considerando los seis loci estudiados, siendo este valor mayor que aquellos observados para loci microsatélites de *H. armigera* por Subramanian y Mohankumar (2006), Khiaban et al. (2010) y Leite et al. (2017) (NA = 6,10; NA = 5,80 y NA = 3,91 alelos por locus respectivamente) y para *H. zea* por Perera y Blanco (2011) y Leite et al. (2017) (NA = 2,57 y NA = 2,97 alelos por locus respectivamente). Sin embargo, Domingues et al. (2012) encontraron un promedio de alelos por locus mayor en *C. virescens* (NA = 14,14).

Para los loci utilizados en este estudio, se obtuvo un valor promedio de PIC de 0,520. Este valor fue mayor que el obtenido para *C. virescens* (PIC = 0,39) (Domingues et al. 2012) pero menor que el documentado para *H. armigera* (PIC = 0,665) por Subramanian y Mohankumar (2006).

La diversidad genética de las poblaciones de *H. gelotopoeon* (HT = 0,28) fue menor que aquella obtenida para *H. zea* (HT = 0,42) (Perera y Blanco 2011) y poblaciones brasileras de *H. armigera* (HT = 0,35) (Leite et al. 2017), *C. virescens* (HT = 0,303) (Domingues et al. 2012) y *H. zea* (HT = 0,29) (Leite et al. 2017), usándose en todos estos estudios marcadores microsatélites.

En este trabajo todos los valores de heterocigosidad observada fueron menores a la heterocigosidad esperada. Se puede hablar, por lo tanto, de un déficit de heterocigotas, lo cual se ve reflejado también por los valores significativos de Fis en la mayoría de las

poblaciones. Como consecuencia, se observaron desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg en todas las poblaciones, lo cual también se explica por la alta capacidad migratoria de las especies del género *Helicoverpa*. Además, la presencia de alelos nulos en casi todas las poblaciones puede haber contribuido a dicho desvío. Observaciones similares fueron realizadas por Endersby et al. (2006) para *H. armigera*, detectando también estos autores desviaciones significativas del EHW y altos valores de  $F_{IS}$ . Ellos sugerían que estos desvíos se podían deber a una alta frecuencia de alelos nulos, que son típicamente encontrados en microsatélites de lepidópteros. Scott et al. (2005) también obtuvieron estos resultados para las poblaciones de *H. armigera*, atribuyendo las desviaciones del EHW a la migración propia de esta especie y a la selección sustancial y continua a la cual está sujeta.

A pesar de las agrupaciones obtenidas por el análisis bayesiano, el análisis de la varianza molecular (AMOVA) reveló que la mayor parte de la variación ocurre dentro de las poblaciones y no entre ellas, y la diferenciación genética entre las poblaciones fue de baja a moderada. Esto es consistente con lo observado por Endersby et al. (2006), quienes no encontraron diferenciación genética entre poblaciones de *H. armigera* recolectadas a lo largo de distintos años y regiones de Australia, sugiriendo de esta manera que el flujo génico que ocurría en esta especie era suficiente para homogenizar las frecuencias alélicas de los microsatélites entre regiones. De acuerdo a los autores, esto se debía al comportamiento que tiene *H. armigera* en el Sudeste de Australia de volar grandes distancias durante la primavera. Estudios realizados por Seymour et al. (2016) evaluaron poblaciones de *H. zea* provenientes de zonas periféricas de Estados Unidos, considerando que estos lugares podían ser posibles fuente de poblaciones migratorias. Como resultado, estas poblaciones mostraron alta diversidad genética dentro de las poblaciones y baja diferenciación genética entre las poblaciones migratorias de *H. zea*.



En el presente estudio se observó también que no hubo efectos significativos atribuibles a la región o planta hospedera. En este sentido, Perera y Blanco (2011) calcularon la diferenciación genética agrupando poblaciones de *H. zea* por región y planta hospedera, pero observaron una baja diferenciación genética entre las poblaciones y ninguna influencia de la región o la planta hospedera. Por otro lado, Vassal et al. (2008) trabajaron con poblaciones de *H. armigera* provenientes de distintas plantas hospederas y regiones, y observaron bajos niveles de diferenciación poblacional de *H. armigera* entre regiones, países y plantas hospederas.

Sin embargo, también existen algunos estudios que evidencian la estructuración poblacional en especies del género *Helicoverpa* recolectadas en diferentes plantas hospederas y regiones utilizando microsatélites (Subramanian y Mohankumar 2006, Domingues et al. 2012). Scott et al. (2005), a su vez, observaron que el flujo genético de poblaciones de *H. armigera* provenientes de mismas regiones era altamente variable entre los años en que las poblaciones eran recolectadas.

En el presente estudio, el Test de Mantel reveló una ausencia de correlación entre la distancia geográfica y genética, lo cual se corresponde con lo observado por Khiaban et al. (2010) y Endersby et al. (2006) en poblaciones de *H. armigera* recolectadas en distintas regiones de Irán y Australia, respectivamente.

La ausencia de patrones de agrupamiento en el ACoP también fue encontrada previamente por Domingues et al. (2012) para poblaciones de *C. virescens*. Por otro lado, estos autores encontraron el mismo número probable de agrupaciones ( $K=2$ ), donde tampoco observaron un patrón de agrupamiento que pudiera deberse a la planta hospedera o distancia geográfica. No obstante, hay que destacar que el método de Evanno et al. (2005), de acuerdo

a sus propios autores, no puede encontrar el mejor  $K$  si  $K=1$ , como ocurre con las poblaciones no estructuradas, lo cual es el caso del presente estudio.

En resumen, estos resultados mostraron que las poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de distintas plantas hospederas y regiones de la Argentina no presentan una diferenciación genética que sea estadísticamente significativa.

# Capítulo 6

---

**Diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* sobre la base de marcadores mitocondriales**



## 6.1. Introducción

El ADN mitocondrial ha sido usado extensivamente en estudios poblacionales de muchas especies de insectos porque evoluciona rápidamente y, a diferencia del ADN nuclear, no tiene recombinación (Avice 1994, Simon et al. 1994). Muchos aspectos de su estructura y evolución lo han convertido en una valiosa herramienta para el estudio taxonómico, poblacional y evolutivo de los insectos. Esto incluye la facilidad de su aislamiento, el alto número de copias, la falta de recombinación, la conservación de sus secuencias y estructura y su alta tasa de mutación en diferentes regiones de la molécula (Freeland 2005).

El gen mitocondrial que codifica la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) posee algunas características adicionales que lo hacen particularmente adecuado como marcador molecular para estudios evolutivos. El gen COI, que codifica para el catalizador terminal de la cadena respiratoria mitocondrial ha sido relativamente bien estudiado a nivel bioquímico y su tamaño y estructura parece estar conservado a través de todos los organismos aeróbicos (Saraste 1990). Dentro del gen, los residuos de aminoácidos que están involucrados en los centros de reacción son altamente conservados, sin embargo, también existen algunas regiones de mayor variabilidad. Esta mezcla de regiones altamente conservadas y variables tan próximamente asociadas en un gen mitocondrial hacen que el gen COI sea particularmente útil para estudios de índole evolutiva y poblacional.

Por otro lado, el citocromo b (Cytb) es una proteína de membrana y es el único citocromo codificado por el ADN mitocondrial. Es uno de los citocromos involucrados en el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial (Degli Esposti et al. 1993) siendo, por lo tanto, un componente central de la maquinaria de conservación de energía

celular en diferentes organismos (Seddigh y Darabi 2017). Este gen también presenta regiones conservadas y otras de evolución rápida (Kumazawa y Nishida 2000).

El conocimiento de las diferencias genéticas de una plaga polífaga como *H. gelotopoeon*, a partir de la caracterización de genes mitocondriales, puede ser muy útil para entender la estructura y las dinámicas poblacionales, su comportamiento y la respuesta a varias presiones de selección. Además, la estructuración poblacional es un aspecto de la organización genética de una especie que juega un rol clave en el proceso de especiación (Wright 1955, Carson 1975, Templeton 1980, Fleischer 1983, Mort y Wolf 1986).

La magnitud de la variación genética entre poblaciones de diferentes regiones geográficas depende de varios factores, incluyendo el flujo génico entre poblaciones, el rango de plantas hospederas y el tiempo transcurrido desde la separación (Templeton et al. 1990, Hartl y Clark 1997).

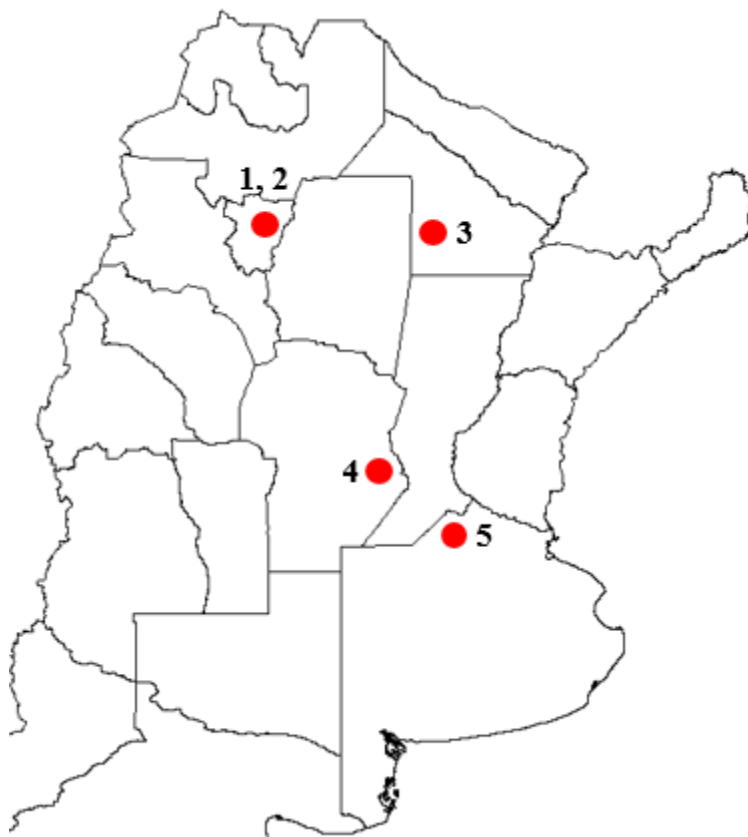
Cabe mencionarse que a pesar de la importancia económica de *H. gelotopoeon*, el análisis de variabilidad y estructuración genética de esta especie utilizando marcadores mitocondriales no ha sido realizado aún. Es por ello que se planteó como objetivo en este capítulo evaluar la diversidad y estructura genética dentro y entre poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de distintas regiones y plantas hospederas de la Argentina mediante el uso de los marcadores de ADN mitocondrial: COI y CytB.

## **6.2. Materiales y métodos**

### **6.2.1. Recolección y cría de las poblaciones**

El análisis de la diversidad y estructura genética utilizando marcadores mitocondriales incluyó las poblaciones de diferentes regiones geográficas y plantas

hospederas detalladas en la Figura 6.1 y en la Tabla 6.1. Para ello se utilizaron las mismas técnicas de recolección y de cría previamente descriptas en los capítulos 2 y 3.



**Figura 6.1.** Ubicación geográfica de los lugares en los que se realizó la recolección de las poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon*. **1:** San Agustín, Tucumán (garbanzo), **2:** San Agustín, Tucumán (soja), **3:** Las Breñas, Chaco (trampa luminosa), **4:** Marcos Juárez, Córdoba (garbanzo), **5:** Rojas, Buenos Aires (soja).

**Tabla 6.1.** Descripción de los sitios de muestro de las diferentes poblaciones de *H. gelotopoeon* utilizadas para el análisis de genes mitocondriales.

Región geográfica	Provincia	Localidad	Coordenadas geográficas	Fecha de recolección	Plantas hospederas	Nº de ind.	Código
Noroeste	Tucumán	Cruz Alta	26°50'21''S 64°51'32''W	Enero 2013	Soja	15	Tuc.Soja
			26°50'21''S 64°51'32''W	Septiembre 2014	Garbanzo	16	Tuc.Garb
Noreste	Chaco	Las Breñas	27° 05'20''S 61° 06'20''W	Octubre 2013	Trampa luminosa*	11	Cha.Alg
Pampeana	Córdoba	Marcos Juárez	32°43'14.25''S 62°07'00.30''W	Octubre 2014	Garbanzo	16	Cba.Garb
	Buenos Aires	Rojas	34° 11'02''S 60°44'14''W	Febrero 2014	Soja	15	BsAs.Soja

\*Los individuos fueron recolectados de una trampa luminosa que se encontraba en un campo de algodón.

### 6.2.2. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total a partir de 73 adultos de *H. gelotopoeon* usando el protocolo de Rogers y Bendich (1988) previamente descrito en el capítulo 4. También se extrajo el ADN de un individuo de *H. zea* recolectado en la provincia de Tucumán, cultivo de maíz, para ser usado posteriormente como grupo externo (*outgroup*).

### 6.2.3. Amplificación y secuenciación del ADN mitocondrial

Los análisis poblacionales de los individuos fueron realizados con dos genes de la región COI (Cox1fin y Cox1in) y un gen de la región Cytocromo b (CytB). Se amplificó por

PCR cada una de estas regiones utilizando los siguientes cebadores: COI-F02 (5'-CTCAAA TTAATTACTCCCCATC-3') y COI-R02 (5'-GGAGGTAAGTTTTGGTATCATT-3') para Cox1fin; COI LCO1490-J-1514 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y COI HCO2198-N-2175 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') para Cox1in; CytBF02 (5'-GAATCCTTTAATTTAAAATATAC-3') y CytBR02 (5'-AAATATGGG TTAGTTAAAGTTAA-3') para CytB (Behere et al. 2008, Specht et al. 2013).

Para la reacción de PCR se utilizó un volumen total de 25 µL, conteniendo 6 µL de ADN (5 ng/µL); 2,5 µL de Tampón de extracción 10x; 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 2 µL de DNTP's 2,5 mM; 2 µL de DMSO 5%; 1 µL de cada cebador (5 µM); 0,2 µl de Taq polimerasa y 9,1 µL de agua milli Q para llevar a volumen final.

En la reacción de amplificación las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente a 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos a 91°C por 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. El protocolo de PCR consta de una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,3 % y luego sometidos a electroforesis en un secuenciador automático.

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Sequencher® version 5.4.6 y alineadas con la herramienta ClustalW disponible en el programa BioEdit v.7.0.5.3 (Hall 1999).

#### **6.2.4. Medidas de variabilidad genética de las poblaciones de *H. gelotopoeon***

Todos los análisis se realizaron para cada marcador por separado. Las características generales de las secuencias de los genes mitocondriales fueron obtenidas por medio del programa DnaSP v.5 (Librado y Rozas 2009). También se realizó una prueba de neutralidad



selectiva  $D$  de Tajima (1989) y  $F_s$  de Fu (1997) con el programa Arlequin v.3.5 (Excoffier y Lischer 2010). Para ambas pruebas, se esperan valores próximos a cero si los tamaños de las poblaciones se mantienen estables, valores negativos significativos si las poblaciones atravesaron una expansión poblacional reciente y valores positivos significativos si las poblaciones experimentaron un cuello de botella (Tajima 1989, Fu 1997).

#### **6.2.5. Redes haplotípicas de las poblaciones de *H. gelotopoeon***

Las relaciones y las distribuciones de los haplotipos para las secuencias de las poblaciones de *H. gelotopoeon* fueron establecidas usando el programa TCS v. 1.21 (Clement et al. 2000). Este programa utiliza datos estadísticos de probabilidad basados en el criterio de parsimonia para estimar genealogías por medio de secuencias de ADN (Templeton et al. 1992). El tamaño de cada haplotipo está en relación directa con su frecuencia en cada población y las conexiones con otros haplotipos permiten visualizar la variación genética intrapoblacional. A su vez, cada círculo significa que ese haplotipo sufrió una mutación. La conexión entre haplotipos fue limitada por una probabilidad de parsimonia para diferencias par a par de ADN menor al 95%.

#### **6.2.6. Estructura genética de poblaciones de *H. gelotopoeon***

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) fue realizado para la evaluación de la estructura genética entre las poblaciones de *H. gelotopoeon* usando el programa Arlequin v.3.5 (Excoffier y Lischer 2010). Se realizó un AMOVA entre poblaciones y también un

AMOVA jerárquico agrupando las poblaciones por plantas hospederas, regiones y año de recolección.

### **6.2.7. Análisis filogenético de poblaciones de *H. gelotopoeon***

Para conocer las relaciones filogenéticas entre los individuos provenientes de distintas poblaciones de *H. gelotopoeon*, se empleó el método de máxima verosimilitud (Maximum likelihood) con 1000 réplicas de bootstrap (Felsenstein 1985) empleando el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros. Para esto se usó el programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013). Como ya fue mencionado previamente, se usó como grupo externo a *H. zea*, por ser considerada una especie cercana a *H. gelotopoeon*.

## **6.3. Resultados**

### **6.3.1. Medidas de variabilidad genética**

De las tres regiones secuenciadas, la que mostró mayor número de haplotipos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica fue Cox1in, presentando 45 haplotipos, una diversidad haplotípica de  $0,928 \pm 0,023$  y nucleotídica de  $0,05100 \pm 0,00642$ . Este marcador también presentó el mayor porcentaje de sitios variables (22,22%) y número medio de diferencias nucleotídicas ( $k = 31,57$ ). El marcador CytB fue el que presentó los menores valores para estos parámetros ( $H = 11$ ;  $HD = 0,430 \pm 0,085$ ;  $\pi = 0,00404 \pm 0,00241$ ; 8,50%;  $k = 1,57$ ) (Tabla 6.2).

Considerando la población total, los estadísticos D de Tajima y Fs de Fu, resultaron negativos y significativos, esto indicaría una expansión poblacional ancestral (Tabla 6.2).

**Tabla 6.2.** Resumen de los parámetros de diversidad genética de las secuencias mitocondriales de las regiones Cox1fin, Cox1in y CytB.

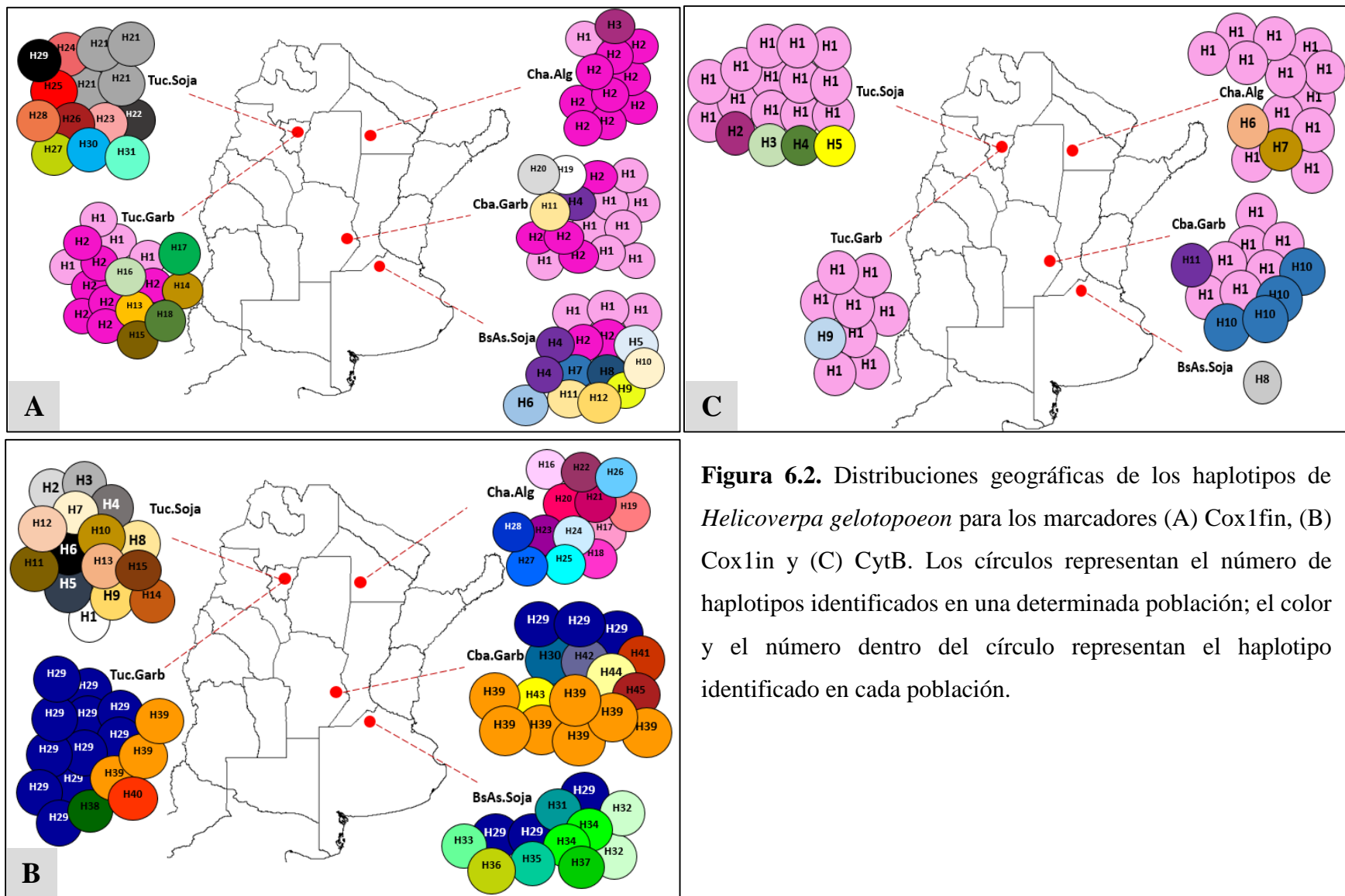
	<b>Cox1fin</b>	<b>Cox1in</b>	<b>CytB</b>
<b>N° de secuencias</b>	73	72	53
<b>Total pares de bases (pb)</b>	468	621	389
<b>Sítios variables (% variación)</b>	87 (18,60%)	138 (22,22%)	33 (8,50%)
<b>N° de haplotipos (H)</b>	31	45	11
<b>Diversidad de haplotipos (HD)</b>	0,863 ±0,030	0,928 ± 0,023	0,430 ±0,085
<b>Diversidad nucleotídica (<math>\pi</math>)</b>	0,02382 ±0,00476	0,05100 ±0,00642	0,00404 ±0,00241
<b>Número medio de diferencias nucleotídicas (k)</b>	11,12	31,57	1,57
<b>Test D de Tajima (valor P)</b>	-1,58 (0,10 > P > 0,05)	-0,66 (P > 0,05)	-2,61 (P < 0,001)
<b>Test Fs de Fu (valor P)</b>	-3,93 (P < 0,05)	-3,05 (P < 0,05)	-3,90 (P < 0,02)

Para la región Cox1fin, las poblaciones que presentaron mayor cantidad de diversidad haplotípica fueron las de Tuc.Soja y BsAs.Soja (HD = 0,943 ± 0,054 y 0,952 ± 0,040 respectivamente). La población de Tuc.Soja presentó 11 haplotipos, consistiendo todos en haplotipos privados que no fueron compartidos con ninguna otra población. La población con menor diversidad haplotípica fue Cha.Alg (HD = 0,345 ± 0,345), sin embargo, dos de los tres haplotipos que presentó esta población fueron compartidos con el resto de las poblaciones, excepto Tuc.Soja (Tabla 6.3 y Figura 6.2A).

**Tabla 6.3.** Distribución de haplotipos e índices de diversidad genética de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* obtenidos a partir de la región Cox1fin.

<b>Población</b>	<b>N<sup>1</sup></b>	<b>NH<sup>2</sup></b>	<b>H (N° I)<sup>3</sup></b>	<b>HD ± DE<sup>4</sup></b>	<b>π ± DE<sup>5</sup></b>
<b>Cha.Alg</b>	11	3	H1(1), H2(9), H3(1)	0,345 ± 0,345	0,00109 ± 0,00109
<b>Tuc.Soja</b>	14	11	H21(4) H22(1) H23(1) H24(1) H25(1) H26(1) H27(1) H28(1) H29(1) H30(1) H31(1)	0,943 ± 0,054	0,0166 ± 0,0047
<b>Tuc.Garb</b>	17	8	H1(4) H2(7) H13(1) H14(1) H15(1) H16(1) H17(1) H18(1)	0,775 ± 0,088	0,00255 ± 0,00055
<b>Cba.Garb</b>	16	6	H1(8) H2(4) H4(1) H11(1) H19(1) H20(1)	0,717 ± 0,099	0,017 ± 0,009
<b>BsAs.Soja</b>	15	11	H1(3) H2(2) H4(2) H5(1) H6(1) H7(1) H8(1) H9(1) H10(1) H11(1) H12(1)	0,952 ± 0,040	0,050 ± 0,005

<sup>1</sup>N= Número de individuos analizados; <sup>2</sup>NH= Número de haplotipos encontrados en cada población; <sup>3</sup>H (N° I)= Haplotipo (Número de individuos que presentaron ese haplotipo); <sup>4</sup>HD= Diversidad haplotípica (± desvío estándar); <sup>5</sup>π= Diversidad nucleotídica (± desvío estándar).



**Figura 6.2.** Distribuciones geográficas de los haplotipos de *Helicoverpa gelatopoeon* para los marcadores (A) Cox1fin, (B) Cox1in y (C) CytB. Los círculos representan el número de haplotipos identificados en una determinada población; el color y el número dentro del círculo representan el haplotipo identificado en cada población.

Para la región Cox1in, la población de Tuc.Soja también presentó la mayor diversidad haplotípica junto con la población de Cha.Alg ( $HD = 1,00 \pm 0,024$  y  $1 \pm 0,030$ ). Estas dos poblaciones presentaron 15 y 13 haplotipos respectivamente, siendo todos de ocurrencia exclusiva dado que no fueron compartidos con ninguna de las otras poblaciones. La población de Tuc.Garb fue, en cambio, la que menor diversidad haplotípica presentó ( $HD = 0,517 \pm 0,132$ ) (Tabla 6.4 y Figura 6.2B).

**Tabla 6.4.** Distribución de haplotipos e índices de diversidad genética de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* obtenidos a partir de la región Cox1in.

Población	N <sup>1</sup>	NH <sup>2</sup>	H(N°I) <sup>3</sup>	HD ± DE <sup>4</sup>	π ± DE <sup>5</sup>
Cha.Alg	13	13	H16(1) H17(1) H18(1) H19(1) H20(1) H21(1) H22(1) H23(1) H24(1) H25(1) H26(1) H27(1) H28(1)	1,00 ± 0,030	0,04415 ± 0,01151
Tuc.Soja	15	15	H1(1) H2(1) H3(1) H4(1) H5(1) H6(1) H7(1) H8(1) H9(1) H10(1) H11(1) H12(1) H13(1) H14(1) H15(1)	1,00 ± 0,024	0,02836 ± 0,00346
Tuc.Garb	16	4	H29(11) H38(1) H39(3) H40(1)	0,517 ± 0,132	0,00093 ± 0,00028
Cba.Garb	16	8	H29(3) H30(1) H39(7) H41(1) H42(1) H43(1) H44(1) H45(1)	0,800 ± 0,092	0,03336 ± 0,01439
BsAs.Soja	12	8	H29(3) H31(1) H32(2) H33(1) H34(2) H35(1) H36(1) H37(1)	0,924 ± 0,057	0,07344 ± 0,01112

<sup>1</sup>N= Número de individuos analizados; <sup>2</sup>NH= Número de haplotipos encontrados en cada población; <sup>3</sup>H (N° I)= Haplotipo (Número de individuos que presentaron ese haplotipo); <sup>4</sup>HD= Diversidad haplotípica (± desvío estándar); <sup>5</sup>π= Diversidad nucleotídica (± desvío estándar).

Para la región CytB, la población que presentó mayor diversidad haplotípica fue la de Cba.Garb (HD = 0,591 ±0,108), con 3 haplotipos de los cuales 2 fueron de ocurrencia exclusiva. La población de menor diversidad fue la población de BsAs.Soja, ya que solo un individuo amplificó para esta región, presentado un haplotipo de ocurrencia exclusiva (Tabla 6.5 y Figura 6.2C).

**Tabla 6.5.** Distribución de haplotipos e índices de diversidad genética de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* obtenidos a partir de la región CytB.

Población	N <sup>1</sup>	NH <sup>2</sup>	H(N°I) <sup>3</sup>	HD ± DE <sup>4</sup>	π ± DE <sup>5</sup>
<b>Cha.Alg</b>	14	3	H(12) H6(1) H7(1)	0,275 ± 0,148	0,00988 ± 0,00790
<b>Tuc.Soja</b>	17	5	H1(13) H2(1) H3(1) H4(1) H5(1)	0,426 ± 0,147	0,00182 ± 0,00085
<b>Tuc.Garb</b>	9	2	H1(8) H9(1)	0,222 ± 0,166	0,00057 ± 0,00043
<b>Cba.Garb</b>	12	3	H1(7) H10(4) H11(1)	0,591 ± 0,108	0,00254 ± 0,00103
<b>BsAs.Soja</b>	-	-	H8(1)	-	-

<sup>1</sup>N= Número de individuos analizados; <sup>2</sup>NH= Número de haplotipos encontrados en cada población; <sup>3</sup>H (N° I)= Haplotipo (Número de individuos que presentaron ese haplotipo); <sup>4</sup>HD= Diversidad haplotípica (± desvío estándar); <sup>5</sup>π= Diversidad nucleotídica (± desvío estándar).

### 6.3.2. Redes haplotípicas

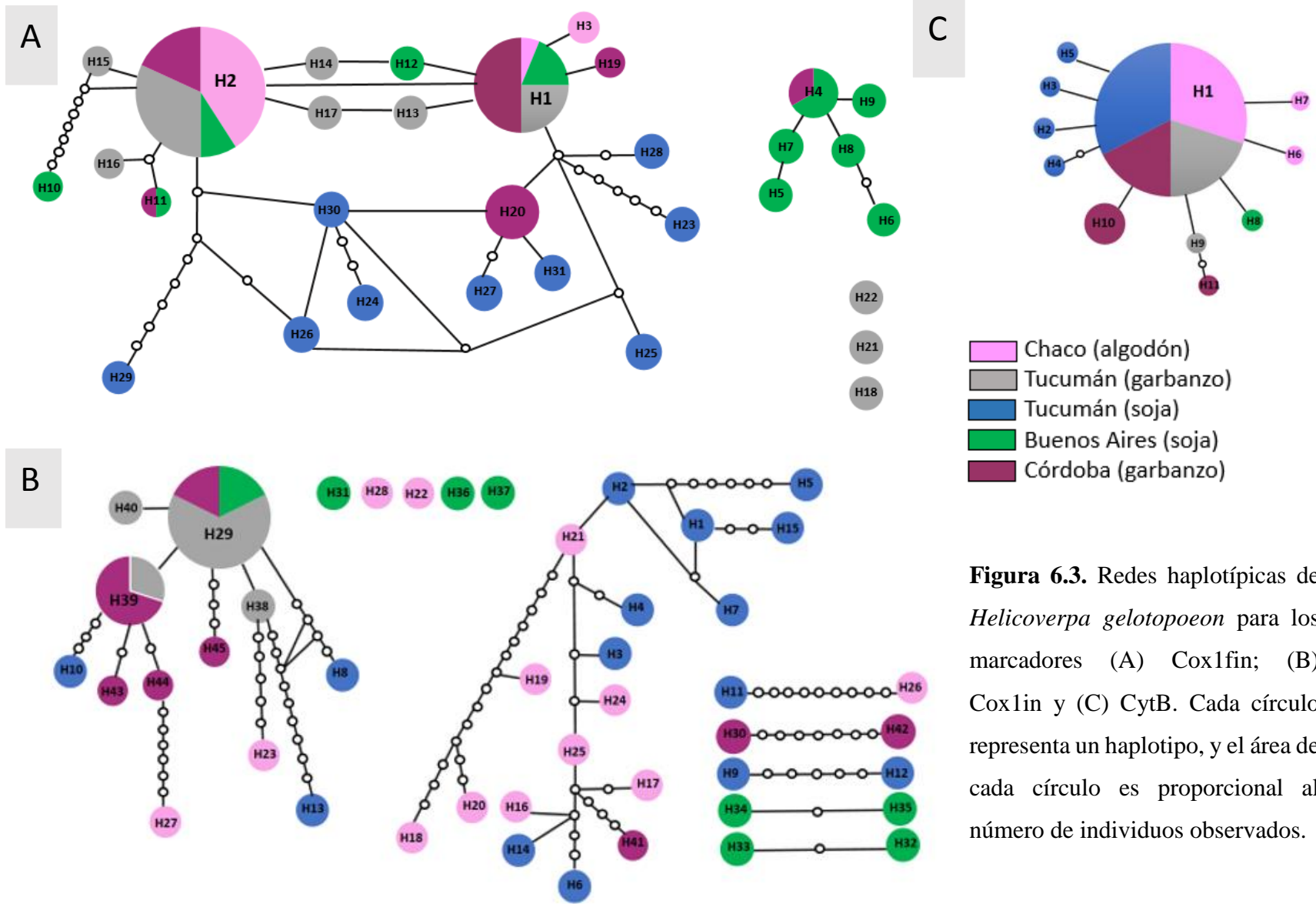
Para el marcador Cox1fin se observaron dos redes diferentes y tres haplotipos independientes que no pudieron ser relacionados con ninguna de estas redes. La red principal estuvo compuesta por los H1 y H2, que se encontraron presentes en todas las poblaciones

menos la de Tuc.Soja. Esta población también presentó haplotipos exclusivos, pero que se mostraron relacionados con el resto de los haplotipos pertenecientes a esta red. La segunda red estuvo compuesta por haplotipos pertenecientes a las poblaciones de BsAs.Soja y Cba.Garb. Los haplotipos independientes correspondieron a individuos de la población de Tuc.Garb (Figura 6.3A).

Para el marcador Cox1in se observaron dos redes principales, cinco redes compuestas por dos haplotipos y cinco haplotipos independientes. Una de las redes estuvo compuesta por los haplotipos exclusivos de las poblaciones de Tuc.Soja y Cha.Alg. La otra red estuvo compuesta por dos haplotipos principales, que incluyeron haplotipos presentes en todas las poblaciones exceptuando las de Tuc.Soja y Cha.Alg. Los haplotipos independientes correspondieron a individuos de las poblaciones de BsAs.Soja y Cha.Alg y las redes más pequeñas compuestas por dos haplotipos correspondieron a haplotipos presentes en todas las poblaciones excepto en la de Tuc.Garb (Figura 6.3B).

Para el marcador CytB se observó una única red, encontrándose de esta manera vinculados todos los haplotipos. Esta red estuvo compuesta por el H1 como el más representativo, encontrándose presente en todas las poblaciones menos en la de BsAs.Soja (Figura 6.3C).





**Figura 6.3.** Redes haplotípicas de *Helicoverpa gelatopoeon* para los marcadores (A) Cox1fin; (B) Cox1in y (C) CytB. Cada círculo representa un haplotipo, y el área de cada círculo es proporcional al número de individuos observados.

### 6.3.3. Estructura genética

Para el marcador Cox1fin, el AMOVA entre poblaciones indicó que la mayor fuente de variación genética se encontraba dentro de las poblaciones. Aun así, el porcentaje de variación entre poblaciones fue de 27,06%, con un  $F_{st}$  significativo de 0,27. Al realizar el análisis entre las agrupaciones por región, planta hospedera y año de recolección, se observó que ninguno de estos factores tuvo una influencia estadísticamente significativa en la diferenciación genética observada entre las poblaciones (Tabla 6.6).

**Tabla 6.6.** Análisis de la varianza molecular (AMOVA) de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* agrupadas por población, planta hospedera, región y año de recolección utilizando el marcador Cox1fin.

Modelo	Fuente de variación	g.l.	Índices de fijación	Porcentaje de variación
<b>A. Poblaciones</b>	Entre poblaciones	3	FST: 0,27062	27,06
	Dentro de las poblaciones	69		72,94
<b>B. Plantas hospederas</b>	Entre plantas hospederas	2	FCT: -0,11905	-11,91
	Entre poblaciones dentro de las plantas hospederas	2	FSC: 0,33063	37
	Dentro de las poblaciones	68	FST: 0,25094	74,91
<b>C. Regiones</b>	Entre regiones	2	FCT: 0,04628	4,63
	Entre poblaciones dentro de las regiones	2	FSC: 0,24322	23,20
	Dentro de las poblaciones	68	FST: 0,27825	72,18
<b>D. Año de recolección</b>	Entre años de recolección	1	FCT: 0,00681	0,68
	Entre poblaciones dentro de año de recolección	3	FSC: 0,26774	26,59
	Dentro de las poblaciones	68	FST: 0,27272	72,73

Considerando el marcador Cox1in, el AMOVA entre poblaciones indicó una diferenciación genética alta entre las poblaciones de *H. gelotopoeon* ( $F_{st} = 0,3905$ ). Sin embargo, la mayor fuente de variación ocurrió dentro de las poblaciones. Al realizar el AMOVA entre las agrupaciones por planta hospedera, se observó una gran influencia de las mismas en la diferenciación genética de las poblaciones ( $F_{CT} = 0,44756$ ), una leve influencia en las agrupaciones por año de recolección ( $F_{CT} = 0,16858$ ), pero ninguna influencia en las agrupaciones realizadas por región ( $F_{CT} = -0,03260$ ) (Tabla 6.7).

**Tabla 6.7.** Análisis de la varianza molecular (AMOVA) de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* agrupadas por población, planta hospedera, región y año de recolección utilizando el marcador Cox1in.

Modelo	Fuente de variación	g.l.	Índices de fijación	Porcentaje de variación
<b>A. Poblaciones</b>	Entre poblaciones	4	FST: 0,39052	39,05
	Dentro de las poblaciones	67		60,95
<b>B. Plantas hospederas</b>	Entre plantas hospederas	2	FCT: 0,44756	44,76
	Entre poblaciones dentro de las plantas hospederas	2	FSC: 0,00449	0,25
	Dentro de las poblaciones	67	FST:0,45004	55
<b>C. Regiones</b>	Entre regiones	2	FCT: -0,03260	-3,26
	Entre poblaciones dentro de las regiones	2	FSC: 0,40574	41,90
	Dentro de las poblaciones	67	FST: 0,38637	61,36
<b>D. Año de recolección</b>	Entre años de recolección	1	FCT: 0,16858	16,86
	Entre poblaciones dentro de años de recolección	3	FSC: 0,31687	26,34
	Dentro de las poblaciones	67	FST: 0,43203	56,80

En cuanto al marcador CytB, el AMOVA mostró una diferenciación genética baja entre las poblaciones ( $F_{ST} = 0,02563$ ), con el 97,44% de la variación ocurriendo dentro de

las poblaciones. El AMOVA de las agrupaciones por planta hospedera, año y región no mostró un aporte significativo de estas variables en la diferenciación genética de las poblaciones (Tabla 6.8).

**Tabla 6.8.** Análisis de la varianza molecular (AMOVA) de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* agrupadas por población, planta hospedera, región y año de recolección utilizando el marcador CytB.

Modelo	Fuente de variación	g.l.	Índices de fijación	Porcentaje de variación
<b>A. Poblaciones</b>	Entre poblaciones	4	FST: 0,02563	2,56
	Dentro de las poblaciones	48		97,44
<b>B. Plantas hospederas</b>	Entre plantas hospederas	2	FCT: 0,02028	2,03
	Entre poblaciones dentro de las plantas hospederas	2	FSC: 0,00787	0,77
	Dentro de las poblaciones	48	FST: 0,02799	97,20
<b>C. Regiones</b>	Entre regiones	2	FCT: 0,06262	6,26
	Entre poblaciones dentro de las regiones	2	FSC: -0,02922	-2,74
	Dentro de las poblaciones	48	FST: 0,03523	96,48
<b>D. Año de recolección</b>	Entre años de recolección	1	FCT: 0,00267	0,27
	Entre poblaciones dentro de los años de recolección	3	FSC: 0,02393	2,39
	Dentro de las poblaciones	48	FST: 0,02654	97,35

Las comparaciones de a pares de FST también fueron utilizadas para evaluar diferenciación genética entre las poblaciones. Valores cercanos a 1 indican una mayor diferenciación entre las poblaciones y valores cercanos a 0 indican poblaciones más homogéneas. La mayor diferenciación genética encontrada fue entre las poblaciones de

BsAs.Soja y Tuc.Garb para todos los marcadores, mostrando una diferencia significativa para los marcadores Cox1in y Cox1fin, pero no así para CytB (Tabla 6.9, 6.10 y 6.11).

**Tabla 6.9.** Valores estimados de diferenciación genética par a par de Fst de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* utilizando el marcador Cox1fin.

	<b>Cha.Alg</b>	<b>BsAs.Soja</b>	<b>Tuc.Garb</b>	<b>Cba.Garb</b>	<b>Tuc.Soja</b>
<b>Cha.Alg</b>	0,0000				
<b>BsAs.Soja</b>	0,35442*	0,0000			
<b>Tuc.Garb</b>	-0,01533	<b>0,39707*</b>	0,0000		
<b>Cba.Garb</b>	0,03957	0,22091*	0,04741	0,0000	
<b>Tuc.Soja</b>	0,14587*	0,34809*	0,17400*	0,11765*	0,0000

**Tabla 6.10.** Valores estimados de diferenciación genética par a par de Fst de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* utilizando el marcador Cox1in.

	<b>Cha.Alg</b>	<b>BsAs.Soja</b>	<b>Tuc.Garb</b>	<b>Cba.Garb</b>	<b>Tuc.Soja</b>
<b>Cha.Alg</b>	0,0000				
<b>BsAs.Soja</b>	0,42849*	0,0000			
<b>Tuc.Garb</b>	0,47391*	<b>0,59812*</b>	0,0000		
<b>Cba.Garb</b>	0,25876*	0,36421*	0,08289*	0,0000	
<b>Tuc.Soja</b>	-0,01207	0,49747*	0,55338*	0,31431*	0,0000

**Tabla 6.11.** Valores estimados de diferenciación genética par a par de Fst de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* utilizando el marcador CytB.

	<b>Cha.Alg</b>	<b>BsAs.Soja</b>	<b>Tuc.Garb</b>	<b>Cba.Garb</b>	<b>Tuc.Soja</b>
<b>Cha.Alg</b>	0,0000				
<b>BsAs.Soja</b>	-0,30957	0,0000			
<b>Tuc.Garb</b>	-0,02677	<b>0,80000</b>	0,0000		
<b>Cba.Garb</b>	0,02333	0,37799	0,08447	0,0000	
<b>Tuc.Soja</b>	0,00687	0,47826	-0,02478	0,10334*	0,0000

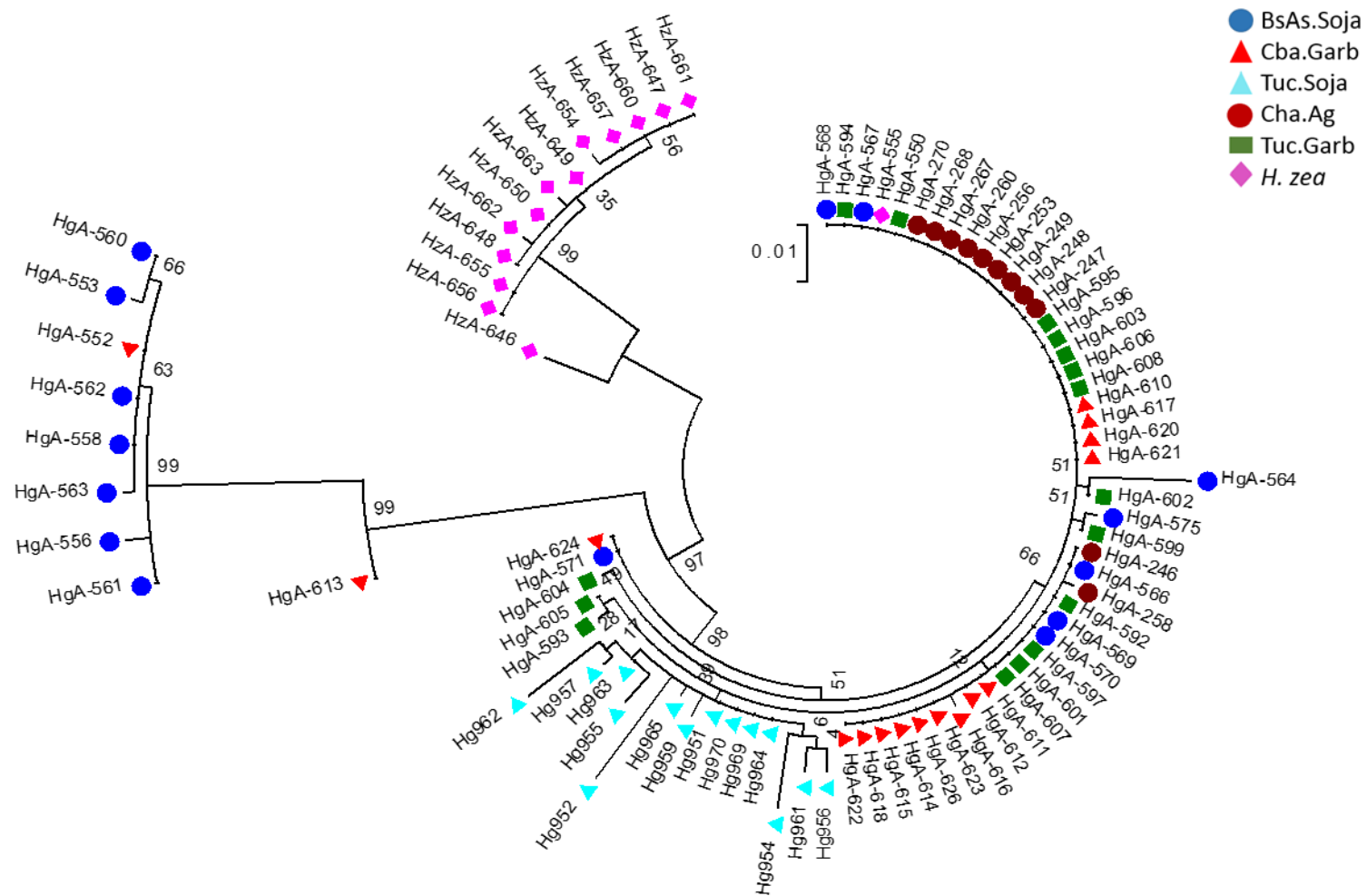
#### 6.3.4. Análisis filogenético

El análisis de máxima verosimilitud no mostró una separación en distintos clusters que pueda deberse al origen geográfico, año de recolección o planta hospedera para ninguno de los tres marcadores. Sin embargo, para cada uno de los marcadores se observó una tendencia similar a las redes haplotípicas obtenidas.

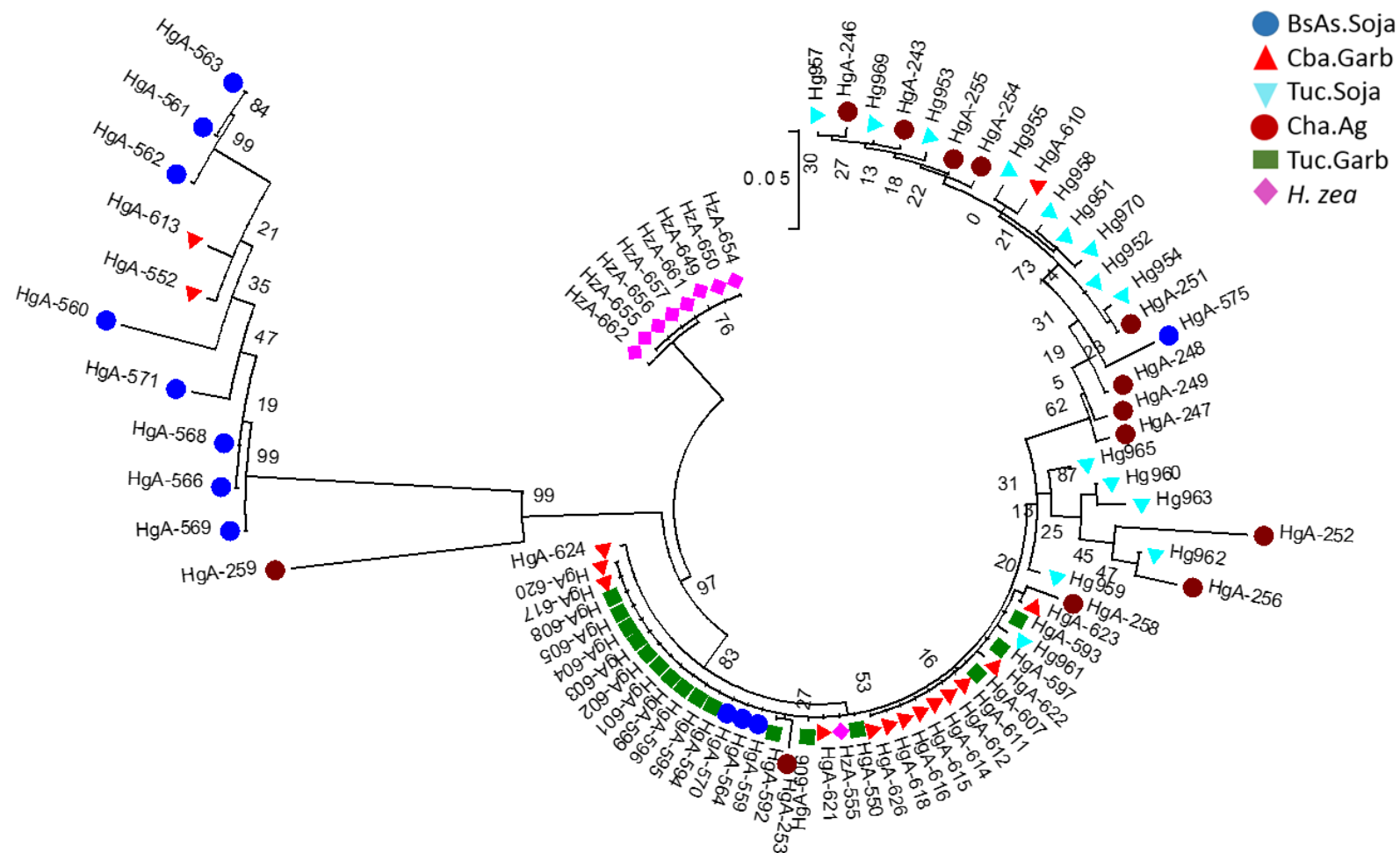
En el árbol obtenido para el marcador Cox1<sub>fin</sub>, se observaron tres clados principales con valores de bootstraps superiores al 95%. Uno estuvo compuesto por los individuos pertenecientes al grupo externo (*H. zea*), y el otro incluyó en su mayoría individuos de la población de BsAs.Soja. El tercer clado se subdividió en tres subclados principales; uno formado por individuos de la población Tuc.Soja y los otros dos por individuos de las poblaciones restantes (Cha.Alg, Cba.Garb y Tuc.Garb) (Figura 6.4).

Para el marcador Cox1<sub>in</sub>, el árbol se dividió también en tres clados principales, uno de los cuales estuvo conformado por el grupo externo. Otro de los clados estuvo compuesto principalmente por individuos de la población de BsAs.Soja. El tercero se subdividió en dos subclados, uno conformado por individuos de las poblaciones de Tuc.Garb y Cba.Garb y el otro por individuos de la población Tuc.Soja (Figura 6.5).

En el árbol del marcador CytB se observaron dos clados, uno compuesto por el grupo externo y el otro por todos los individuos analizados de *H. gelotopoeon*, sin observarse una clara diferenciación de subclados (Figura 6.6).

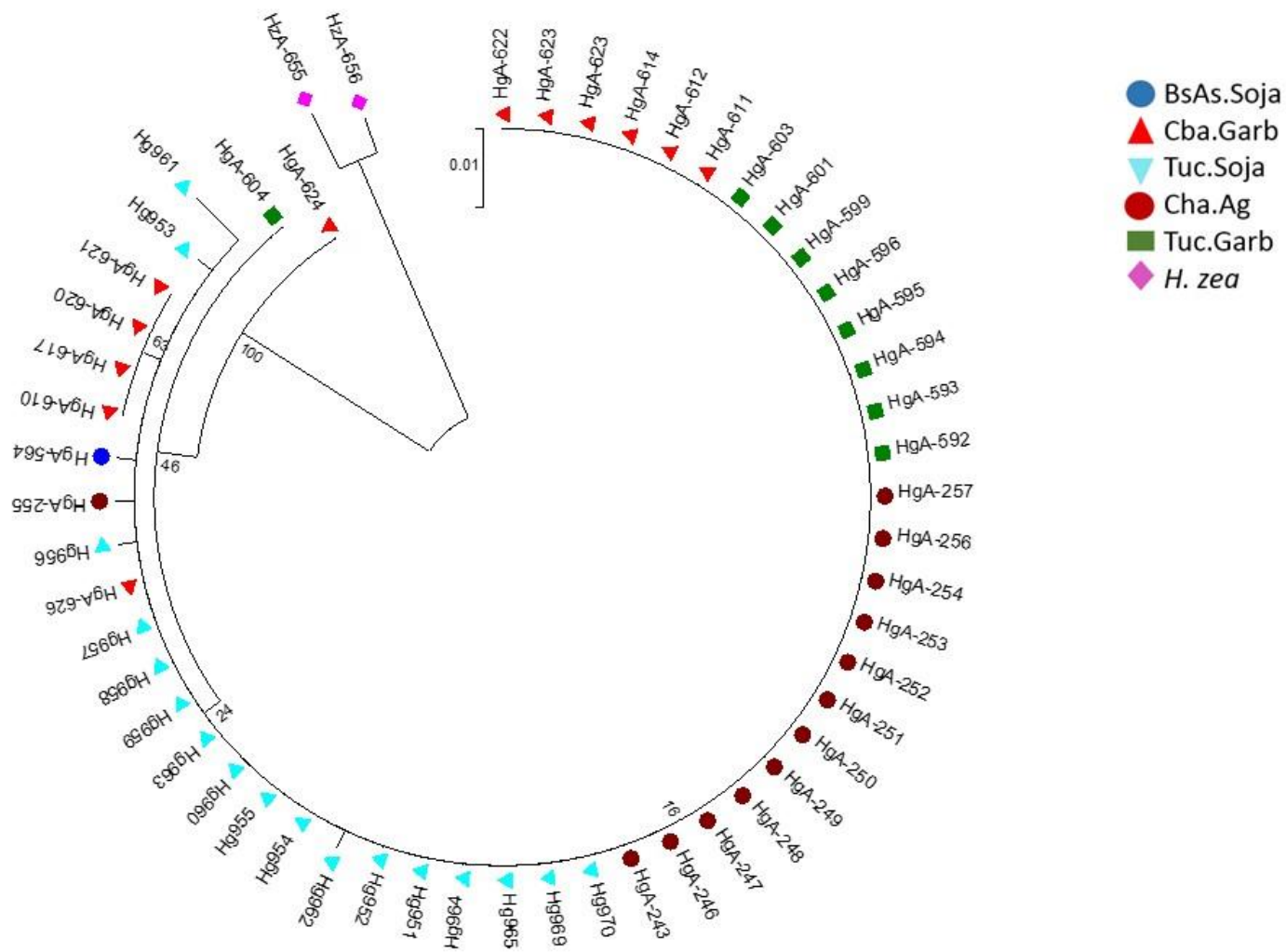


**Figura 6.4.** Árbol de máxima verosimilitud de poblaciones de *Helicoverpa gelatopoeon* usando el modelo Kimura 2-  
parámetros para el marcador Cox1fin.



**Figura 6.5.** Árbol de máxima verosimilitud de poblaciones de *Helicoverpa gelatopoeon* usando el modelo Kimura 2-parámetros para el marcador Cox1in.





**Figura 6.6.** Árbol de máxima verosimilitud de poblaciones de *Helicoverpa gelotopoeon* usando el modelo Kimura 2-parámetros para el marcador CytB.

#### 6.4. Discusión

Los resultados del análisis de variabilidad genética y flujo génico entre poblaciones de *H. gelotopoeon* evaluadas por medio de marcadores mitocondriales indicaron, en general, una cierta estructuración genética de las poblaciones estudiadas. No existen estudios que hayan analizado la estructuración genética de *H. gelotopoeon* utilizando marcadores mitocondriales. Sin embargo, sí se utilizaron estas herramientas moleculares para el análisis de otras especies del género *Helicoverpa*. Para estas poblaciones, no hay antecedentes de una gran diferenciación genética utilizando marcadores mitocondriales; ya que todas las poblaciones mostraron homogeneidad genética (Albernaz et al. 2012, Asokan et al. 2012, Mastrangelo et al. 2014, Silva et al. 2018). Sin embargo, estudios utilizando otros marcadores, como ser RAPD, EPIC-PCR y SSR encontraron una alta diferenciación genética entre poblaciones de especies del género *Helicoverpa* (Scott et al. 2005, Subramanian and Mohankumar 2006, Khiaban et al. 2010, Domingues et al. 2012, Yenagi et al. 2012, Behere et al. 2013).

Los valores de  $F_{st}$  encontrados en este estudio para dos de los marcadores (0,27062 y 0,39052 para Cox1fin y Cox1in respectivamente) fueron mayores que los encontrados para el género *Helicoverpa* utilizando marcadores mitocondriales (0,071;  $7,10^{-5}$ ; -0,0083) (Leite et al. 2014, Mastrangelo et al. 2014, Wang et al. 2018). Sin embargo, el marcador CytB presentó valores similares (0,02563) a los citados por estos autores.

Las estimaciones de  $H_D$  para los marcadores Cox1fin y Cox1in fueron de  $0,863 \pm 0,030$  y  $0,928 \pm 0,023$  respectivamente, las cuales pueden ser consideradas altas y similares a las observadas para las secuencias de poblaciones de *H. armigera* provenientes de Paraguay (Arnemann et al. 2016). Sin embargo, las estimaciones de  $\pi$  para las poblaciones de *H.*

*gelotopoeon* de Argentina mostraron valores mucho mayores con respecto a los observados en Paraguay para *H. armigera*. Asimismo, estos valores fueron mayores a los encontrados para poblaciones de *C. virescens* provenientes de Brasil (Albernaz et al. 2012). El marcador CytB mostró una HD menor ( $0,430 \pm 0,085$ ) para las poblaciones de *H. gelotopoeon*, valor que es similar al obtenido para poblaciones de *H. armigera* en Uruguay y *H. virescens* Brasil (Albernaz et al. 2012, Arnemann et al. 2016).

Las redes de haplotipos y los árboles filogenéticos mostraron tendencias de agrupamiento similares. Sin embargo, no se observa una clara influencia por parte de planta hospedera, región o año de recolección que se mantenga constante en todos los marcadores empleados que pueda haber influido en esta separación de redes y clados.

Entre las posibles causas que podrían explicar la estructura genética observada para *H. gelotopoeon*, hay que considerar la diferencia entre regiones y las distintas influencias climáticas a las que se ven expuestas las poblaciones en cada una de esas regiones. En este sentido, el marcador Cox1fin muestra en sus redes haplotípicas una red compuesta exclusivamente por haplotipos presentes en las poblaciones de BsAs.Soja y Cba.Garb (ambas pertenecientes a la misma región).

Otra posible causa de la estructura genética de las poblaciones de *H. gelotopoeon* es la planta hospedera. Esto se vio reflejado en el valor de FCT (= 0.44756) del marcador Cox1fin al considerar las agrupaciones realizadas por planta hospedera. La distribución haplotípica entre las poblaciones también respalda estos resultados, ya que, para todos los marcadores, las poblaciones de Cba.Garb y Tuc.Garb, a pesar de ser distantes, fueron las poblaciones que más haplotipos compartieron. Sin embargo, esta relación no fue tan clara entre las poblaciones de Tuc.Soja y BsAs.Soja, pero hay que tener en cuenta que estas poblaciones, a pesar de pertenecer a la misma planta hospedera, fueron recolectadas en años

distintos, a diferencia de las poblaciones Tuc.Garb y Cba.Garb, que fueron recolectadas en el mismo año.

También es necesario tener en cuenta que el año de recolección puede haber tenido cierta influencia. Esto se ve reflejado por el valor de FCT (= 0,16858) que mostró el marcador Cox1in, como así también por la estructura de las redes haplotípicas que presentó este marcador, en la cual las poblaciones de Tuc.Soja y Cha.Alg, que fueron recolectadas en el mismo año, formaron una única red separada del resto. Con respecto a esto, Scott et al. (2005) demostraron que existen años con flujo génico alto, moderado y bajo entre distintas poblaciones australianas de *H. armigera*, con algunas estaciones con flujo génico sustancial entre poblaciones de regiones distantes y otras estaciones con diferenciación genética significativa entre estas poblaciones, demostrando así que el flujo génico es altamente variable entre años. Esto se debe principalmente a que el movimiento de esta especie difiere estación a estación, resaltando la importancia de extender este tipo de estudios en años consecutivos, ya que un muestreo a corto plazo puede ser poco representativo teniendo en cuenta que la dinámica poblacional y la migración pueden variar significativamente.

También es de interés considerar que si bien *H. gelotopoeon* está presente en todas las regiones y localidades consideradas, su importancia en cada una no es la misma. Esto adquiere relevancia ya que influirá en el tipo de manejo que se aplicará en cada localidad, resultando en distintos grados de presión de selección sobre las poblaciones de esta plaga. En el caso del partido de Rojas, esta especie no ocasiona grandes problemas en soja y se encuentra en muy baja frecuencia, en comparación con las poblaciones del NOA o NEA. Esto se ve reflejado en las distribuciones haplotípicas de BsAs.Soja: en la red del marcador Cox1in se observan haplotipos de BsAs.Soja de ocurrencia exclusiva e independiente, que no se pudieron relacionar con ninguna red. Sumado a esto, en los árboles filogenéticos de los

marcadores Cox1fin y Cox1in, se observó un clado constituido casi exclusivamente por individuos de la población BsAs.Soja.

Otra población que presentó resultados relevantes fue Tuc.Soja, en la cual se observaron haplotipos exclusivos para dos de los tres marcadores. Una posible explicación es que en la fecha en la cual fue colectada esta población (Enero de 2013), la soja Bt aun no había comenzado a cultivarse en Argentina, y por lo tanto la población de *H. gelotopoeon* todavía no estaba sometida a esta presión de selección, con lo cual la diversidad genética y los haplotipos aquí presentes difirieron del resto.

En este estudio se observó la presencia de muchos alelos exclusivos y en algunos casos independientes, que no podían ser relacionados a ninguna red. Estudios realizados por Albernaz et al. (2012) utilizando ADNmt también revelaron un alto porcentaje de haplotipos de ocurrencia única. Estos autores propusieron la hipótesis de que los haplotipos raros podrían surgir por nuevos eventos mutacionales y que alternativamente, estos haplotipos de baja frecuencia podrían provenir de individuos que se alimentaban de plantas silvestres que se encontraban cerca de campos de cultivos cada campaña. Además, estos haplotipos raros podrían ser diferentes en cada región muestreada, dado que cada área puede presentar distinta vegetación natural asociada a los distintos biomas de Brasil. Esta hipótesis tiene sentido al considerar que *H. gelotopoeon* es una especie polífaga y que las provincias muestreadas pertenecen a diferentes regiones agroecológicas con diferentes vegetaciones naturales asociadas.

Por otro lado, el patrón de variabilidad genética observado en las poblaciones de *H. gelotopoeon*, como valores altos de diversidad haplotípica (h) y alto número de haplotipos en baja frecuencia, son características de una especie que atravesó una expansión

poblacional, lo cual está respaldado por los valores negativos y significativos para las pruebas de neutralidad de los estadísticos  $D$  de Tajima y  $F_s$  de Fu.

Estos distintos escenarios no son excluyentes y todos pueden haber contribuido a la estructuración poblacional de *H. gelotopoeon* detectada en este trabajo. Sin embargo, sería necesario profundizar y realizar más estudios en vistas de esclarecer qué otros factores además de los mencionados podrían estar interviniendo en la estructura genética de esta especie.

Considerando los resultados obtenidos en el capítulo 5 y los obtenidos en este capítulo, sobre la base de marcadores nucleares y mitocondriales respectivamente, los mismos no mostraron una correspondencia muy marcada, ya que hubo algunas diferencias entre ellos. Sin embargo, existen antecedentes de resultados contradictorios entre marcadores nucleares y mitocondriales. Albernaz et al. (2012) evaluaron la variabilidad genética y la historia demográfica en poblaciones brasileras de *C. virescens* usando secuencias de ADNmt. Los resultados obtenidos mostraron una baja estructuración genética. Domingues et al. (2012), por otro lado, realizó los mismos estudios para poblaciones brasileras de *C. virescens* pero usando microsatélites. En este caso los resultados mostraron lo contrario: bajos niveles de flujo génico y una estructura genética de moderada a alta entre las poblaciones.

Las diferencias entre ambos marcadores podrían estar dadas por las formas de herencia de cada uno. El ADNmt, al ser heredado uniparentalmente, es haploide, se comporta como una unidad de herencia simple y por lo tanto son marcadores efectivos de un solo locus. Los datos de un solo locus permiten desandar la historia de únicamente una sola unidad genética, lo cual puede o no ser concordante con la historia de la especie en cuestión (Freeland 2005). Al ser el tamaño poblacional del ADNmt entonces reducido con respecto al ADN nuclear (un 25%), significa que sus haplotipos tienen una mayor probabilidad de ser

extintos. Entonces, si el tamaño de una población se ve reducido (ya sea por una enfermedad o una catástrofe), aun si la población se recuperara rápidamente, tendría relativamente pocos haplotipos mitocondriales sobrevivientes comparados con los genotipos nucleares. Esto puede llevar a que se infiera una historia poblacional sobre simplificada (Freeland 2005).

Esto resalta la importancia de utilizar diferentes marcadores moleculares para estudios de estructuración poblacional, ya que el uso de un solo marcador puede que no ser representativo del genoma como un todo. En este caso, los microsatélites y el ADNmt proveen información complementaria, ya que cada uno destaca distintos aspectos de la variabilidad genética.

# Capítulo 7

---

## Conclusiones y consideraciones finales





## 7. Conclusión general

Los estudios realizados en este trabajo permitieron concluir que:

Se conoció por primera vez el ciclo de vida de *H. gelotopoeon* mediante la cría de esta especie con dieta artificial y en condiciones controladas de laboratorio. De esta manera se pudo determinar que el ciclo de vida de *H. gelotopoeon* dura entre 38-45 días, desde el estado de huevo hasta la muerte del adulto.

Por primera vez se confeccionó una tabla de vida, se estimaron los parámetros poblacionales y el potencial biótico de esta especie bajo condiciones ambientales controladas. De esta manera se determinó que una hembra de *H. gelotopoeon* podría producir, en promedio, otras 95,49 nuevas hembras durante toda su vida, y que esta especie puede crecer a una tasa de aproximadamente 0,12 hembras/hembra/día. También se concluyó que una población de *H. gelotopoeon* necesita 5,70 días para duplicar su tamaño. A su vez, el potencial biótico (PB) obtenido para *H. gelotopoeon* indicó que esta especie es capaz de producir  $2,026 \times 10^{18}$  individuos por hembra por año. La curva de supervivencia mostró una mayor tasa de mortalidad durante el estado de huevo y los primeros estadios larvales, lo cual permitió identificar el estado de desarrollo óptimo de esta plaga para aplicar tácticas de control.

Esta especie presenta el fenómeno conocido como “protoginia”, encontrándose que las hembras emergen dos noches antes que los machos. Si bien se cree que en la naturaleza este fenómeno existe para prevenir la endogamia, hay que tomar especial cuidado en la sincronización entre machos y hembras cuando se pretende criar esta plaga en condiciones de laboratorio.

Las poblaciones de *H. gelotopoeon* provenientes de distintas plantas hospederas y regiones no presentaron signos de incompatibilidad reproductiva, probablemente debido al comportamiento generalista de esta especie y la gran capacidad de vuelo de los Heliothinae.

Los resultados obtenidos a nivel nuclear y mitocondrial no mostraron una correlación muy clara, observándose algunas diferencias entre sus resultados. Los marcadores nucleares microsatélites indicaron claramente que las poblaciones de *H. gelotopoeon* no están estructuradas y hay flujo génico entre ellas, correlacionándose con lo observado a nivel biológico. Por otro lado, si bien los marcadores mitocondriales mostraron que existiría cierta estructuración genética entre las poblaciones de *H. gelotopoeon*, en todos los casos la mayor fuente de variación ocurrió dentro de las poblaciones. Además, no se observó una clara influencia por parte de planta hospedera, región o año de recolección que se mantenga constante en todos los marcadores empleados que permitan explicar las diferencias observadas. Probablemente, habría otros factores que podrían contribuir a la diferenciación, tales como la presencia de plantas silvestres colindantes a los campos en donde se recolectaron las poblaciones, las cuales podrían estar aportando haplotipos raros que contribuyan a esta diferenciación. Otra razón puede ser los diferentes sistemas de manejo (insecticidas o cultivos Bt) aplicados para cada población, lo cual ejerce distintos grados de presión de selección sobre las poblaciones.

Las poblaciones de *H. gelotopoeon* de distintas regiones y plantas hospederas se aparearon exitosamente. Por lo tanto, si llegara a desarrollarse resistencia en una de sus poblaciones, no habría barreras que impidan la dispersión de esos genes de resistencia a otras áreas geográficas, por lo cual sería necesaria una rápida acción (alternar con otras herramientas de control para disminuir la presión de selección) para detener la generación y

dispersión de esos individuos resistentes. Estos resultados también permiten concluir que el uso de refugios (cultivos no Bt o plantas hospederas naturales) como herramienta para el retraso de la resistencia de esta plaga es posible, debido a que la compatibilidad reproductiva observada entre las poblaciones estudiadas permitiría el flujo génico entre los individuos susceptibles y los resistentes.

Sin embargo, es necesario realizar más estudios incluyendo una escala geográfica y temporal mayor, así como otros cultivos y posibles plantas hospederas silvestres a lo largo de varias campañas. También sería interesante profundizar los estudios realizados con la población de Buenos Aires, ya que fue una de las de mayor porcentaje de diferenciación genética. Asimismo, sería de utilidad repetir los estudios realizados en este trabajo con una población actual de Tucumán recolectada en el cultivo de soja, con el fin de evaluar qué está ocurriendo en el presente con esta población luego de haber sido sometida varios años a la presión de selección de soja Bt. Finalmente, la determinación de la dispersión y capacidad de vuelo de *H. gelotopoeon*, será otro factor que permitirá sustentar los resultados y conclusiones aquí abordadas sobre esta especie.

Todo esto ayudará a comprender mejor el grado de flujo génico y la repercusión del comportamiento migratorio en las distintas campañas.

Por lo tanto, los conocimientos aquí generados en referencia a aspectos biológicos, reproductivos y genéticos de *H. gelotopoeon*, permitirán sentar las bases para implementar estrategias de manejo para esta plaga, con especial énfasis en el retraso de desarrollo de resistencia a insecticidas y cultivos Bt.

# Capítulo 8

---

## Bibliografía



**Albernaz, K.C., K.L. Silva-Brandão, P. Fresia, F.L. Cônsoli, C. Omoto. 2012.** Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. Bulletin of Entomological Research. 102: 333-343.

**Alcántara, M.R. 2007.** Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte, L.E., V. Souza, X. Aguirre (Ed.), Ecología molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, 608 pp.

**Ali, A., R.A. Choudhury, Z. Ahmad, F. Rahman, F.R. Khan, S.K. Ahmad. 2009.** Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. Tunisian Journal of Plant Protection. 4: 99-106.

**Alstad, D.N., D.A. Andow. 1995.** Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. Science. 268: 1894-1896.

**Álvarez, D., S. Abbate. 2013.** Nuevos problemas de plagas en soja: *Helicoverpa gelotopoeon*. <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.lares-srl.com/descargas/prensa/IsocaBolillera2013.pdf>. Último acceso: 05/06/2018.

**Álvarez Hernández, U., L. Pérez, M. González, A. Cruz, J. Gómez, J.M. Álvarez. 2010.** Biología de *Heliothis virescens* (Fabricius) en garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Centro Agrícola. 37: 89-92.

**Amer, A.E.A., A.A.A. El-Sayed. 2014.** Effect of different host plants and artificial diet on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) development and growth index. Journal of entomology. 11: 1-7.

- Arghand, A., B. Naseri, J. Razmjou, M. Hassanpour, F. Rahimi Namin. 2014.** Comparative biological parameters of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on various corn hybrids. Journal of Entomological Society of Iran. 34: 33-35.
- Armes, N.J., D.R. Jadhay, K.R. DeSouza. 1996.** A survey of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in the Indian subcontinent. Bulletin of entomological research. 86: 499-514.
- Arnemann, J.A., W.J. James, T.K. Walsh, J.V.C. Guedes, G. Smagghe, E. Castiglioni, W.T. Tay. 2016.** Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. Genetics and molecular research. 15: 1-8.
- Arneodo, J.D., E.I. Balbi, F.M. Flores, A. Sciocco. 2015.** Molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) in Argentina and development of a novel PCR-RFLP method for its rapid differentiation from *H. zea* and *H. gelotopoeon*. Journal of Economic Entomology. 108: 2505-2510.
- Asokan, R., K.B. Rebijith, N.K. Krishna Kumar, M. Manamohan. 2012.** Genetic diversity of tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase-I (mtCO-I). Pest management in Horticultural Systems. 18 (1): 29-34.
- Awise, J.C. 1994.** Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York, 511 pp.

**Bagley, R.K., V.C. Sousa, M.L. Niemiller, C.R. Linnen. 2016.** History, geography, and host use shape genome-wide patterns of genetic variation in the redheaded pine sawfly (*Neodiprion lecontei*). *Molecular Ecology*. 26 (4):1022-44.

**Ballinger-Crabtree, M.E., W.C. Black 4th, B.R. Miller. 1992.** Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 47: 893-901.

**Bashasab, F., S.H. Prakash, K.B. Krishnareddy, F.B. Vijaykumar, P.R. Badariprasad, B.V. Patil, M.S. Kuruvinashetti. 2004.** Genetic variation of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) of south Indian cotton ecosystem using RAPD markers. *Current Science*. 87: 1654-57.

**Behere, G.T., W.T. Tay, D.A. Russell, P. Butterham. 2008.** Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of entomological research*. 98: 599-603.

**Behere, G.T., W. T. Tay, D. A. Russell, K. R. Kranthi, P. Batterham. 2013.** Population Genetic Structure of the Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in India as Inferred from EPIC-PCR DNA Markers. *PLoS one*. 8(1): e53448.

**Behura, S.K. 2006.** Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular ecology*. 15: 3087-3113.

**Berlocher, S.H., J.L. Feder. 2002.** Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual review of entomology*. 47(1): 773-815.

**Bhattacharjee, N.S., S.L. Gupta. 1972.** A new species of *Heliothis* Ochsenheimer (Noctuidae: Lepidoptera) infesting cotton and tur (*Cajanus indicus*) in India with observations on the three other common species of the genus. *Journal of natural History* 6: 147-51.

**Biezanko, C.M., A. De Ruffinelli, D. Link. 1974.** Plantas y otras sustancias alimenticias de las orugas de los lepidopteros uruguayos. *Revista Centro Ciencias Rurais, Santa Maria.* 4: 107-148.

**Bolnick, D., B.M. Fitzpatrick. 2007.** Sympatric speciation: Models and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.* 38: 459-87.

**Bolsa de cereales. 2018.** Panorama Agrícola Semanal. Estimaciones Agrícolas. Relevamiento al 31/08/2017. <http://www.bolsadecereales.com.ar/> Último acceso: 02/10/2018.

**Bosio, C.F., L.C. Harrington, J.W. Jones, R. Sithiprasasna, D.E. Norris, T.W. Scott. 2005.** Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 72: 434-442.

**Brown, W.M., E.M. Prager, A. Wang, A.C. Wilson. 1982.** Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution.* 18: 225-239.

**Bush, G.L. 1975.** Models of animal speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.* 6: 339-364.

**Bush, G.L. 1992.** Host race formation and sympatric speciation in *Rhagoletis* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Psyche.* 99: 335-357.



**Caccia, M.G., E. Del Valle, M.E. Doucet, P. Lax. 2014.** Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) under laboratory conditions. Chilean Journal of Agricultural Research. 74 (1): 123-126.

**Callahan, P.S. 1958.** Behavior of the imago of the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie), with special reference to emergence and reproduction. Annals of the Entomological Society of America. 51: 271-283.

**Campbell, N., J. Reece, L. Mitchell. 1999.** The origin of species. Benjamin/Cummings (Eds.) California. USA, pp. 445-463.

**Candia, S.M. 2013.** Heliiothineos en soja: Aspectos biológicos, manejo y control. Agrotecnología. 28: 8-14.

**Carey, J.R. 1993.** Applied demography for biologists with special emphasis in insects. Oxford University Press, New York, 206 pp.

**Carey, J.R. 1995.** Insect demography. En: Encyclopedia of Environmental Biology, Academic Press, San Diego, pp 289-303.

**Carson, H.L. 1975.** The genetics of speciation at the diploid level. American Nature. 109: 73-92.

**Cato, S.A., T.E. Richardson. 1996.** Inter- and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR loci and the inheritance of plastids in *Pinus radiata* D. Don. Theoretical and applied genetics. 93: 587-592.

- Cervera, M.T., J.A. Cabezas, B. Simon, J.M. Martínez-Zapater, F. Beitia, J.L. Cenis. 2000.** Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bulletin of Entomological Research*. 90: 391-396.
- Chen, C., Q.W. Xia, H.J. Xiao, L. Xiao, F.S. Xue. 2014.** A comparison of the life-history traits between diapause and direct development individuals in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Science*. 14: 1-12.
- Cho, S., A. Mitchell, J.C. Regier, C. Mitter, R.W. Poole, T.P. Friedlander, S. Zhao. 1995.** A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: Elongation factor-1 $\alpha$  recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution*. 12: 650-56.
- Choudhury, R.A., P.Q. Rizvi, N.S. Satpute. 2012.** Stage specific life table of *Helicoverpa armigera* (Hübner) on chickpea. *Indian Journal of Entomology*. 74: 310-314.
- Chung, A.M., J.E. Staub, J.F. Chen. 2006.** Molecular phylogeny of *Cucumis* species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. *Genome*. 49: 219-229.
- Clement, M., D. Posada, K.A. Crandall. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9: 1657-1659.
- Colvin, J., R.J. Cooter, S. Patel. 1994.** Laboratory mating behavior and compatibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) originating from different geographical regions. *Journal of Economic Entomology*. 87: 1502-1506.
- Coombs, M., A.P. Del Socorro, G.P. Fitt, P.C. Gregg. 1993.** The reproductive maturity and mating status of *Helicoverpa armigera*, *H. punctigera* and *Mythimna convecta*

(Lepidoptera: Noctuidae) collected in tower-mounted light traps in Northern New South Wales, Australia. Bulletin of entomological research. 83: 529-534.

**Cork, A., E.A. Lobos. 2003.** Female sex pheromone components of *Helicoverpa gelotopoeon*: first heliothinae pheromone without (Z)-11-hexadecenal. Entomologia Experimentalis et Applicata. 107: 201-206.

**Coyne, J.A., H.A. Orr. 2004.** Speciation. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 480 pp.

**Czepak, C., K.C. Albernaz, L.M. Vivan, H.O. Guimarães, T. Carvalhais. 2013.** First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. Pesquisa Agropecuaria Tropical. 43: 110-113.

**Dabhi, M.V., C.C. Patel. 2007.** Life expectancy of *Helicoverpa armigera* on chickpea. The Journal of Semi-Arid Tropical Agricultural Research. 5: 1-2.

**Dallas, J.F. 1992.** Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. Mammalian Genome. 3: 452-456.

**de Queiroz, K. 2007.** Species concept and species delimitation. Systematic Biology. 56(6): 879-886.

**Degen, T., T. Hovestadt, O. Mitteser, F. Hölker. 2015.** High female survival promotes evolution of protogyny and sexual conflict. PLoS ONE. 10(3): e0118354.

**Degli Esposti, M., S. De Vries, M. Crimi, A. Ghelli, T. Patarnello, A. Meyer. 1993.** Mitochondrial cytochrome b: Evolution and structure of the protein. Biochimica et Biophysica Acta. 1143: 243-271.

**Diehl, S.R., G.L. Bush. 1984.** An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. Annual Review of Entomology. 29: 471-504.

**Dobzhansky, T. 1937.** Genetics and the origin of species. New York, Columbia University.

**Dobzhansky, T., L. Ehrman, P.A. Kastritsis. 1967.** Ethological isolation between sympatric and allopatric species of the *Obscura* group of *Drosophila*. Animal Behaviour. 16(1): 79-87.

**Domingues, F.A., K.L. Silva-Brandão, A.G. Abreu, O.P. Perera, C.A. Blanco, F.L. Cônsoli, C. Omoto. 2012.** Genetic Structure and gene flow among Brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology. 105: 2136-2146.

**Dopman, E.B., G.A. Sword, D.M. Hillis. 2002.** The importance of the ontogenetic niche in resource-associated divergence: evidence from a generalist grasshopper. Evolution. 56 (4): 731-40.

**Drès, M., J. Mallet. 2002.** Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 357: 471-492.

**Earl, D.A., B.M. von Holdt. 2012.** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources. 4: 359-361.

**Eberhard, W.G. 1985.** Sexual selection and animal genitalia. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 244 pp.

**Eberhard, W.G. 2009.** Postcopulatory sexual selection: Darwin's omission and its consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:10025–10032.

**Eberhard, W.G. 2010.** Evolution of genitalia: theories, evidence, and new directions. *Genetica* 138: 5–18.

**Eguiarte, L.E., E. Aguirre-Planter, E. Scheinvar, A.G. González, V. Souza. 2015.** Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. En: Becerra, A., A. Castañeda, D. Piñeiro (Ed.), *Evolución orgánica*, Universidad Nacional autónoma de México, DF, 762 pp.

**Ehrman, L. 1964.** Courtship and mating behavior as a reproductive isolating mechanism in *Drosophila*. *American zoologist*. 4: 147-153.

**Ellegren, H. 2004.** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 5: 435-445.

**Endersby, N.M., A.A. Hoffman, S.W. McKechnie, A.R. Weeks. 2006.** Is there genetic structure in populations of *Helicoverpa armigera* from Australia? *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 122: 253-263.

**Evanno, G., S. Regnaut, J. Goudet. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611-2620.

**Excoffier, L., H.E.L. Lischer. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

**Farrow, R.A., J.C. Daly. 1987.** Long range movements as na adaptive strategy in the genus *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae): a review of its occurrence and detection in four pest species. Australian Journal of Zoology. 35: 1-24.

**Feder, J.L., S.H. Berlocher, J.B. Roethele, H. Dambroski, J.J. Smith, W.L. Perry, V. Gavrilovic, K. Filchak, J. Rull, M. Aluja. 2003.** Allopatric genetic origins for sympatric host-plant shifts and race formation in *Rhagoletis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 100: 10314-10319.

**Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 39: 783-791.

**Ferraris, G., R. Cieza. 2015.** Regiones productivas de la Argentina: NEA (Noreste Argentino). Disponible en línea: [https://www.ing.unlp.edu.ar/catedras/G0433/descargar.php?secc=0&id=G0433&id\\_inc=21751](https://www.ing.unlp.edu.ar/catedras/G0433/descargar.php?secc=0&id=G0433&id_inc=21751).

**Ferrelli, M.L., A. Sciocco-Cap, C. Taibo, J.D. Arneodo. 2016.** Characterization of a new *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus variant causing epizootic on a previously unreported host, *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of invertebrate pathology. 138: 89-93.

**Fleischer, R.C. 1983.** A comparison of theoretical and electrophoretic assessments of genetic structure in populations of the house sparrow (*Passer domesticus*). Evolution. 37: 1001-1009.

**Fogliata, S.V., A. Vera, G. Gastaminza, M.I. Cuenya, M.I. Zucchi, E. Willink, A.P. Castagnaro, M.G. Murúa. 2016.** Hybrid sterility between two populations of *Diatraea*

*saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) (F.) from different host plant species and regions in Argentina. Bulletin of Entomological Research. 26: 1-7.

**Forister, M.L., L.A. Dyer, M.S. Singer, J.O. Stireman, J.T. Lill. 2012.** Revisiting the evolution of ecological specialization, with emphasis on insect-plant interactions. Ecology. 93: 981-991.

**Forrester, N.W., M. Cahill, L.J. Bird, J.K. Layland. 1993.** Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. Bulletin of Entomological Research. 1: 1-132.

**Freeland, J.R. 2005.** Molecular ecology. Wiley, South Sussex, 400 pp.

**Frel, A., H. Gu, C. Cardona, S. Dorn. 2003.** Antixenosis and antibiosis of common beans to *Thrips palmi*. Journal of Economic Entomology. 93: 1577-1584.

**Fu, Y.X. 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. 147: 915-925.

**Funk, D.J., K.E. Filchak, J.L. Feder. 2002.** Herbivorous insects: model systems for the comparative study of speciation ecology. Genetica. 116: 251-267.

**Funk, D.J., P. Nosil, B. Etges. 2006.** Ecological divergence exhibits consistently positive associations with reproductive isolation across disparate taxa. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 103: 3209-3213.

**Futuyma, D.J., G. Moreno. 1988.** The evolution of ecological specialization. Annual Review of Ecology and Systematics. 19: 207-233.

**Fuxa, J.E., J.R. Fuxa, A.R. Ritcher, E.H. Weidner. 2000.** Prevalence of a trypanosomatid in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 47: 388-394.

**García Degano, M.F., M.G. Murúa, S. Prieto, M.L. Juárez, G. Gastaminza, E. Willink. 2009.** Cultivos transgénicos o genéticamente modificados (OGM): Maíces Bt: Claves para un adecuado manejo de la resistencia. En: Gamboa D., D. Medina y M. Devani (Eds.), El maíz en el NOA - Campaña 2008/2009, Publicación Especial EEAOC N° 39, Tucumán, Argentina, pp. 111-115.

**Giolo, F.P., G. Rossato Busato, M. Silveira Garcia, C.G. Manzoni, O. Bernardi, M. Zart. 2006.** Biología de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. Revista Brasileira de Agrociência. 12: 167-171.

**Goldsmith, M.R., F. Marec. 2010.** Molecular biology and genetics of the Lepidoptera. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 362 pp.

**Gomes, E.S., V. Santos, C.J. Ávila. 2017.** Biology and fertility life table of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in different hosts. Entomological Science. 20: 419-426.

**Goodfellow, P.N. 1992.** Variation is now the theme. Nature. 359: 777-778.

**Goudet, J. 2002.** FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3. Disponible en: <https://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>.  
Último acceso: 02/10/2018.

**Gould, F. 1998.** Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. Annual Review of Entomology. 43: 701-726.



**González, R.H. 1989.** Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. Universidad de Chile, Santiago, pp. 137-138.

**Grasela, J.J., A.H. McIntosh. 2005.** Cross-species investigation of *Helicoverpa armigera* microsatellites as potential markers for other related species in the *Helicoverpa - Heliothis* complex. Journal of Insect Science. 5(1): 47.

**Gravilets, S., H. Li, M.D. Vose. 2000.** Patterns of parapatric speciation. Evolution. 54(4): 1126-1134.

**Green, W.M., M.C. De Billot, T. Joffe, L. Van Staden, A. Bennet-Nel, C.L.N. Du Toit, L. Van Der Westhuizen. 2003.** Indigenous plants and weeds on the Makhthini flats as refuge hosts to maintain bollworm population susceptibility to transgenic cotton (Bollgard). African Entomology. 11: 21-29.

**Gregg, P.C., G.P. Fitt, M.P. Zalucki, D.A.H. Murray. 1995.** Insect migration in an arid continent. II. *Helicoverpa* spp. En eastern Australia. pp. 151–172 en Drake, V.A., A.G. Gatehouse (Eds), Insect Migration: Tracking Resources Through Space and Time. Cambridge, Cambridge University Press.

**Griffiths, A., J. Miller, D. Suzuki, D. Lewontin, W. Gelbart. 2002.** Genética, 7a Edición, McGraw-Hill, Interamericana. 849 pp.

**Groot, A.T., M. Marr, D.G. Heckel. 2010.** The roles and interactions of reproductive isolation mechanisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. Ecological entomology. 35(1): 105-118.

- Groot, A.T., A. Classen, O. Inglis, C.A. Blanco, J. López, A.T. Vargas, C. Schal, G. Heckel, G. Schöfl. 2011.** Genetic differentiation across North America in the generalist moth *Helicoverpa virescens* and the specialist *H. subflexa*. *Molecular Ecology*. 20: 2676-2692.
- Hale, L.R., R.S. Singh. 1991.** A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. IV. Mitochondrial DNA variation and the role of history vs. Selection in the genetic structure of geographic populations. *Genetics*. 129: 103-117.
- Hall, T.A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hammond, P.M. 1980.** Speciation in the face of gene flow –sympatric-parapatric speciation. En: *The evolving biosphere*, Forey, P.L. (Ed.), British Museum (Natural History), Cambridge University Press, Cambridge, pp 37-48.
- Hardwick, D.F. 1965.** The corn earworm complex. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 40: 1-247.
- Hartl, D.L., A.G. Clark. 1997.** Principles of populations genetics. Sinauer Associates, Sunderland, 519 pp.
- Hartstack, A.W., J.D. Lopez, R.A. Muller, W.L. Sterling, E.G. King, J.A. Witz, A.C. Eversull. 1982.** Evidence of long range migration of *Heliothis zea* (Boddie) into Texas and Arkansas. *Southwestern Entomologist* 7: 188-201.
- Herrero, M.I., L.E. Cazado, A.S. Casmuz, A.M. Vera, L.A. Fadda, G. Gastaminza, M.G. Murúa. 2015.** Ficha Técnica 2: *Helicoverpa gelotopoeon* Dyar en garbanzo. *Avance Agroindustrial*. 36 (2): 22-23.

**Hoelzel, A.R., J.V. López, G.A. Dover, S.J. O'Brien. 1994.** Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *Journal of Molecular Evolution*. 39: 191-199.

**Hopper, K.R., R.T. Roush, W. Powell. 1993.** Management of genetics of biological control introductions. *Annual Reviews in Entomology*. 38: 27-51.

**Hosken, D. J., P. Stockley. 2004.** Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution*. 19: 87-93.

**Iannone, N., P. Leiva. 1993.** Bioecología, umbrales de acción y control de la isoca bolillera *Heliothis gelotopoeon* Dyar en soja. Carpeta de producción vegetal. Tomo 3, Serie soja, Información 114. EEA Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

**IBM Corp. 2013.** IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.

**Imada, Y., A. Kawakita, M. Kato. 2011.** Allopatric distribution and diversification without niche shift in a bryophyte-feeding basal moth lineage (Lepidoptera: Micropterigidae). *Proceedings of the Royal Society*. 278: 3026-3033.

**Jakobsson, M., N.A. Rosenberg. 2007.** CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 23: 1801-1806.

**Jaenike, J. 1981.** Criteria for ascertaining the existence of host races. *American Naturalist*. 117: 830-834.

**Jaenike, J. 1990.** Host specialization in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 21: 243-247.

**Jakka, S.R.K., V.R. Knight, J.L. Jurat-Fuentes. 2014.** Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae). Journal of economic entomology. 107: 342-351.

**Jallow, M.F.A., M.P. Zalucki. 1996.** Within- and Between-population Variation in Host-plant Preference and Specificity in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Australian Journal of Zoology. 44: 503-19.

**Jarne, P., P.J.L. Lagoda. 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in ecology and Evolution. 11: 424-429.

**Jha, R.K., H. Chi, L.C. Tang. 2012.** Life table of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) with a discussion on Jackknife vs. Bootstrap techniques and variations on the Euler-Lotka equation. Formosan entomologist. 32: 355-375.

**Jha, R.K., S.J. Tuan, H. Chi, L.C. Tang. 2014.** Life table and consumption capacity of corn earworm, *Helicoverpa armigera*, fed Asparagus, *Asparagus officinalis*. Journal of Insect Science. 14: 1-17.

**Ji, Y.J., D.X. Zhang, G.M. Hewitt, L. Kang, D.M. Li. 2003.** Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. Molecular Ecology Notes. 3: 102-104.

**Johnson, N. 2008.** Hybrid incompatibility and speciation. Nature education. 1(1): 20.

**Jombart, T. 2008.** Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics. 24: 1403-5.

**Joyce, A.L., W.H. White, G.S. Nuessly, M.A. Solis, S.J. Scheffer, M.L. Lewis, R.F. Medina. 2014.** Geographic population structure of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*

(F.) (Lepidoptera: Crambidae), in the southern United States. PLoS ONE 9(10): e110036.  
Doi: 10.1371/journal.pone.0110036.

**Kakde, A.M., K.G. Patel, S. Tayade. 2014.** Role of Life Table in Insect Pest Management - A Review. Journal of Agriculture and Veterinary Science. 7: 40-43.

**Karban, R., J.H. Mayers. 1989.** Induced plant responses to herbivory. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 20: 331-348.

**Kesawat, M.S., B.K. Das. 2009.** Molecular Markers: its application in crop improvement. Journal of Crop Science and Biotechnology. 12 (4): 168-178.

**Khiaban, N.G., M.S. Hejazi, K.H. Irani-Nejad, S.A. Mohammadi, S. Khaghaninia, S. 2010.** Genetic variability of geographical populations of the bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), in west and northwest of Iran. Munis Entomology & Zoology. 5: 670-676.

**Klug, W.S., M.R. Cummings, C.A. Spencer. 2006.** Conceptos de genética, 8a edición, Pearson Educación, Madrid, España, 920 pp.

**Kranthi, K.R., N.J. Armes, N.G.V. Rao, S. Raj, V.T. Sundarmurthy. 1997.** Seasonal dynamics of metabolic mechanisms mediating pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* in central India. Pesticide Science. 50: 91-98.

**Kriticos, D.J., N. Ota, W.D. Hutchison, J. Beddow, T. Walsh, W.T. Tay, D.M. Borchert, S.V. Paula-Moreas, C. Czapak, M.P. Zalucki. 2015.** The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? PLoS ONE 10: e0133224.

**Kruskal, W.H., W.A. Wallis. 1952.** Use of ranks on one-criterion variance analysis. Journal of the American Statistical Association. 47: 583-621.

**Kumazawa, Y., M. Nishida. 2000.** Molecular phylogeny of Osteoglossoids: a new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 1869-1878.

**Laster, M.L., C.F. Sheng. 1995.** Search for hybrid sterility for *Helicoverpa zea* in crosses between the North American *H. zea* and *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. *Journal of Economic Entomology*. 88: 1288-1291.

**Lehmann, E.L. 1975.** Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks. San Francisco, USA, Holden-Day, Inc., 464 pp.

**Leite, N.A., A. Alves-Pereira, A.S. Corrêa, M.I. Zucchi, C. Omoto. 2014.** Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. *PLoS ONE*. 9(11): e113286. doi: 10.1371/journal.pone.0113286.

**Leite, N.A., S. Correa, A. P. Michel, A. Alves-Pereira, V.A.C. Pavinato, M.I. Zucchi, C. Omoto. 2017.** Pan-American Similarities in Genetic Structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) With Implications for Hybridization. *Environmental entomology*. 46: 1024-1034.

**Li, Y.Y., J.F. Yu, Q. Lu, J. Xu, H. Ye. 2014.** Development and emergence patterns of the tobacco cutworm *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Biosciences*. 3: 18-20.

**Librado, P., J. Rozas. 2009.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

**Liu, Z., D. Li, P.Y. Gong, K.J. Wu. 2004.** Life table studies of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), on different host plants. *Environmental Entomology*. 33: 1570-1576.

**Llewellyn, K.S., H.D. Loxdale, R. Harrington, C.P. Brookes, S.J. Clark, P. Sunnucks. 2003.** Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites. *Molecular Ecology*. 12: 21-34.

**Lu, Y., M. Adang. 1996.** Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. *Florida Entomologist* 79 (1): 48-55.

**Lukhtanov, V.A. 2012.** The geography of speciation in butterflies (Lepidoptera, Papilionoidea): an empirical test of theoretical models. *Entomological Review*. 92: 46-54.

**Lukhtanov, V.A., A. Dantchenko, M.S. Vishnevskaya, A.F. Saifitdinova. 2015.** Detecting cryptic species in sympatry and allopatry: analysis of hidden diversity in *Polyommatus* (Agrodiaetus) butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 116 (2): 468-485.

**Mallet, J. 2001.** Gene flow. En: Woiwod, I.P., D.R. Reynolds, C.D. Thomas (Eds.), *Movement: Mechanisms and Consequences*. Insect CAB International, Wallingford, UK. pp. 337-360.

**Manjunath, T.M., V.R. Phalak, S. Subramanyam. 1970.** First Record of Egg Parasites of *Heliothis armigera* (Hübner) in India. *Technical bulletin of the Commonwealth Institute of Biological Control*. 13: 111-15.

**Margheritis, A.E., H.F.E. Rizzo. 1965.** Lepidópteros de interés agrícola. Orugas, isocas y otras larvas que dañan a los cultivos. Editorial Sudamericana S.A. Buenos Aires, R. Argentina, 197 pp.

**Margonari, C.S., C.L. Fortes-Dias, E.S. Dias. 2004.** Genetic variability in geographical populations of *Lutzomyia whitmani* elucidated by RAPD-PCR. Journal of Medical Entomology. 41: 187-192.

**Marshall, T.C., J. Slate, L.E. Kruuk, J.M. Pemberton. 1998.** Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology.7: 639-655.

**Martel, C., A. Réjasse, F. Rousset, M.T. Bethenod, D. Bourguet. 2003.** Host-plant-associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. Heredity. 90: 141-149.

**Mastrangelo, T., D.F. Paulo, L.W. Bergamo, E.G.F. Morais, M. Silva, G. Bezerra-Silva, A.M.L. Azeredo-Espin. 2014.** Detection and genetic diversity of a Heliothine Invader (Lepidoptera: Noctuidae) from north and northeast of Brazil. Journal of Economic Entomology. 107: 970-980.

**Matsubayashi, K.W., K. Ohshima, P. Nosil. 2010.** Ecological speciation in phytophagous insects. Entomologia Experimentalis et Applicata. 134: 1-27.

**Matthews, M. 1999.** Heliothine moths of Australia: a guide to pest bollworms and related noctuid groups. Melbourne: CSIRO Publishing. 373 pp.

**Mayr, E. 1942.** Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press. New York, 373 pp.



**Mayr, E. 1963.** Animal species and evolution. Harvard University Press, Cambridge, MA, pp 65-98.

**Mendelson, T.C., K.L. Shaw. 2005.** Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. Methods in Enzymology. 395: 161-177.

**Méndez Barceló, A. 2003.** Aspectos biológicos sobre *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) en la empresa municipal agropecuaria Antonio Guiteras de la zona norte de la provincia de Las Tunas. Fitosanidad. 7: 21-25.

**Merrell, D.J. 1981.** Ecological genetics. University of Minnesota press, Minneapolis. 500 pp.

**Mironidis, G.K. 2014.** Development, survivorship and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) under fluctuating temperatures. Bulletin of Entomological Research. 104: 751-764.

**Mitter, C., B. Farrell, B. Wiegmann. 1988.** The phylogenetic study of adaptive zones: has phytophagy promoted insect diversification? American Naturalist. 132: 107-128.

**Mitter, C., R.W. Poole, M. Matthews. 1993.** Biosystematics of the Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae). Annual Review of Entomology. 38: 207-225.

**Mort, M. A., H.G. Wolf. 1986.** The genetic structure of large-lake Daphnia populations. Evolution. 40: 756-766.

**Moscardó, M.L., R. Balbo, J. Molina, V.E. Mazzuferi. 2013.** Evaluación del daño producido por diferentes densidades de *Helicoverpa gelotopoeon* (Dyar) en el cultivo de garbanzo, en Córdoba, Argentina. Nexo agropecuario. 1(2): 11-12.

**Mopper, S. 1996.** Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. Trends in Ecology & Evolution. 11(6): 235-238.

**Muller, H.J. 1942.** Isolating mechanisms, evolution and temperature. Biology symposium. 6: 71-125.

**Murúa, M.G., E. Virla, V. Defagó. 2003.** Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. 29: 43-51.

**Murúa, M.G., M.T. Vera, S. Abraham, M.L. Juárez, S. Prieto, G.P. Head, E. Willink. 2008.** Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and regions in Argentina. Annals of the Entomological Society of America. 101: 639-649.

**Murúa, M.G., J. Molina-Ochoa, P. Fidalgo. 2009.** Natural distribution of parasitoids of larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Argentina. Journal of Insect Science. 9(20): 1-17.

**Murúa, M.G., F.S. Scalora, F.R. Navarro, L.E. Cazado, A. Casmuz, M.E. Villagrán, E. Lobos, G. Gastaminza. 2014.** First record of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. Florida Entomologist. 97: 854-856.

**Murúa, M.G., L.E. Cazado, A. Casmuz, M.I. Herrero, M.E. Villagrán, A. Vera, D.R. Sosa-Gómez, G. Gastaminza. 2016.** Species from the Heliiothinae complex (Lepidoptera: Noctuidae) in Tucumán, Argentina, an update of geographical distribution of *Helicoverpa armigera*. Journal of insect Science. 16(1): 1-7.

**Naseri, B., Y. Fathipour, S. Moharramipour, V. Hosseininaveh. 2009.** Comparative life history and fecundity of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on different soybean varieties. Entomological Science. 2: 147-154.

**Naseri, B., Z. Golparvar, J. Razmjou, A. Golizadeh. 2014.** Age-stage, Two-sex Life Table of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on Different Bean Cultivars. Journal of Agricultural Science and Technology. 16: 19-32.

**Nasreen, A., G. Mustafa. 2000.** Biology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) reared in laboratory on natural diet. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10: 1668-1669.

**Navarro, F.R., E.D. Saini, P.D. Leiva. 2009.** Clave pictórica de polillas de interés agrícola, agrupadas por relación de semejanza. INTA, EEA PERGAMINO, Pergamino, Buenos Aires, Argentina, 100 pp.

**Navarro, R.V. 1987.** Comportamiento de emergencia y reproducción del gusano del jojoto (*Heliothis zea* Boddie). Agronomía Tropical. 37: 55-61.

**Nosil, P., T.H. Vines, D.J. Funk. 2005.** Perspective: Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. Evolution. 58(4): 705-719.

**Nosil, P. 2012.** Ecological speciation. Oxford: Oxford University Press, 304 pp.

**Parisi, R., N. Iannone. 1978.** Las "isocas del lino": descripción y control. INTA. EEA Pergamino. Carpeta de Producción Vegetal. Tomo I. Serie: Lino. Información. 16. 3 pp.

**Pascua, L.T., M.E. Pascua. 2002.** Life Table of Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in Batac, Ilocos Norte, Philippines. The Philippine journal of Science. 131: 75-89.

**Pashley, D.P. 1986.** Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). A sibling species complex. *Annals of the Entomological Society of America*. 79: 898-904.

**Pashley, D.P., J.A. Martin. 1987.** Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 80: 731-733.

**Pastrana, J.A. 2004.** Los lepidópteros argentinos, sus plantas hospedadoras y otros sustratos alimenticios. Sociedad Entomológica Argentina ediciones, 334 pp.

**Paterson, H.E.H. 1991.** The recognition of cryptic species among economically important insects. En: Zalucki, M.P. (Ed.), *Heliothis: research methods and prospects*, 250 pp.

**Peakall, R., P.E. Smouse. 2006.** GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.

**Perera, O.P., C.A. Blanco. 2011.** Microsatellite variation in *Helicoverpa zea* (Boddie) populations in the Southern United States. *Southwestern Entomologist*. 36: 271-286.

**Pérez Contreras, T. 1999.** La especialización en los insectos fitófagos: una regla más que una excepción. *Boletín SEA*. 26: 759-776.

**Pérez de la Vega, M. 1997.** Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. En: Organización y evolución del genoma eucariota: marcadores moleculares Méndez, J. (Ed.), Universidade da Coruña, pp. 247-266.

**Pérez, J.C., M. Suris. 2012.** Ciclo de vida y reproducción de *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) sobre garbanzo. *Revista de Protección Vegetal*. 27: 85-89.

**Perfectti, F. 2002.** Especiación: modos y mecanismos. En: Soler, M. (Ed.), Evolución. La base de la biología, Proyecto Sur de Ediciones S.L., Granada, pp. 307-321.

**Pietrantonio, P.V., T.A. Junek, R. Parker, D. Mott, K. Siders, N. Troxclair, J. Vargas-Camplis, J.K. Westbrook, V.A. Vassiliou. 2007.** Detection and evolution of resistance to the pyrethroid cypermethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Texas. *Environmental Entomology*. 36: 1174-1188.

**Pogson, G.H., K.A. Mesa, R.G. Boutilier. 1995.** Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics*. 139: 375-385.

**Pogue, M.G. 2004.** A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae). *Annals of the Entomological Society of America*. 97: 1222-1226.

**Pogue, M.G. 2013.** Revised status of *Chloridea* Duncan and (Westwood), 1841, for the *Heliothis virescens* species group (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae) based on morphology and three genes. *Systematic Entomology*. 38: 523–542.

**Pritchard, J.K., M. Stephens, P. Donnelly. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.

**Pritchard, J.K., W. Wen. 2004.** Documentation for STRUCTURE software. Chicago: The University of Chicago Press.

**Rabinovich, J.E. 1978.** Ecología de poblaciones animales. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Departamento de Asuntos Científicos, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, DC, 114 pp.

**Rajen-drakumar, P., A.K. Biswal, S.M. Balachandran, K. Srinivasarao, R.M. Sundaram. 2007.** Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics*. 23: 1-4.

**Ravi, K.C., K.S. Mohan, T.M. Manjunath, G. Head, B.V. Patil, D.P. Angeline Greba, K. Premalatha, J. Peter, N.V.G. Rao. 2005.** Relative abundance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host crops in India and the role of these crops as natural refuge for *Bacillus thuringiensis* Cotton. *Environmental Entomology*. 34 (1): 59-69.

**Razmjou, J., B. Naseri, S.A. Hemati. 2013.** Comparative performance of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. *Journal of Pest Science*. 87: 29-37.

**Reigada, C., K.F. Guimarães, J.R.P. Parra. 2016.** Relative fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on seven host plants: A perspective for IPM in Brazil. *Journal of insect science*. 16: 1-5.

**Rhainds, M. 2010.** Female mating failure in insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 136: 211-226.

**Rice, W.R., E.E. Hostert. 1993.** Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution*. 47: 1637-1653.

**Roca, C. 2002.** Manejo de resistencia de insectos en maíces Bt. En: Guía Dekalb del cultivo de maíz: 136-140.

**Roderick, G.K. 1996.** Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual review of entomology*. 41: 325-352.

**Rogers, S.O., A.J. Bendich.1988.** Extraction of DNA from plant tissues. Pp 1-10. En: S.B. Gelvin & R.A. Schilperoort (eds.), Plant molecular biology manual, v. A6, Dordrecht, Belgium, Kluwer Academic Publisher, 1032 pp.

**Romero, F. 2004.** Manejo integrado de plagas - Las bases, los conceptos, su mercantilización. Universidad Autónoma Chapingo. Colegio de Postgraduados - Instituto de Fitosanidad. Montecillo, pp. 51-56.

**Rosenberg, N.A. 2004.** DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology Resources. 4: 137-138.

**Rundle, H.D., M. Whitlock. 2001.** A genetic interpretation of ecologically dependent isolation. Evolution. 55: 198-201.

**Salvato, P., A. Battisti, S. Concato, L. Masutti, T. Patarnello, L. Zane. 2002.** Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampawilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. Molecular Ecology. 11: 2435-2444.

**Saraste, M. 1990.** Structural features of cytochrome oxidase. Quarterly Reviews of Biophysics. 23: 331-366.

**Scalora, F., A. Casmuz, L. Cazado, G. Socías, G. Tolosa, M. Aralde, M. Aybar Guchea, L. Fadda, M. Gómez, H. Gómez, T. Montaldi, G. Gastaminza, E. Willink, W. Rodríguez. 2012.** Evaluación de diferentes insecticidas para el control de la oruga bolillera, *H. gelotopoeon* Dyar (Lepidoptera: Noctuidae) pp. 147-15 En Devani, M.R., Ledesma, F. and Sánchez, J.R. (Eds.) El cultivo de la soja en el noroeste argentino. Campaña 2011/2012.

Publicación Especial EEAOC n° 45. EEAOC, Las Talitas, Tucumán, Argentina.  
<http://www.eeaoc.org.ar/upload/publicaciones/archivos/286/20121122085717000000.pdf>.

**Scalora, F.S., A.S. Casmuz, L.E. Cazado, M. Aralde, M. Aybar Guchea, L. Fadda, M. Gómez, H. Gómez, G. Tolosa, A. Vera, G. Gastaminza, E. Willink, C.M. Espeche. 2014.**

Dinámica poblacional de la oruga del cascabullo *Helicoverpa gelotopoeon* Dyar (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo de garbanzo pp. 57-60 En: Vizgarra, O. N.; L. D. Ploper, C. M. Espeche y S. Y. Mamaní (Eds.). El cultivo del garbanzo en el Noroeste Argentino. Publicación Especial EEAOC n° 48. EEAOC, Las Talitas, Tucumán, Argentina.  
<http://www.eeaoc.org.ar/publicaciones/categoria/16/422/Garbanzo-en-el-NOA-2013.html>

**Schlotterer, C. 2004.** The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? Nature Reviews Genetics. 5: 63-69.

**Schuelke, M. 2000.** An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature biotechnology. 18: 233-234.

**Scott, K.D., K.S. Wilkinson, M.A. Merrit, L.J. Scott, C.L. Lange, M.K. Schutze, J.K. Kent, D.J. Merrit, P.R. Grundy, G.C. Graham. 2003.** Genetic shifts in *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) over a year in the Dawson/Callide Valleys. Australian Journal of Agricultural Research. 54: 739-744.

**Scott, K.D., C.L. Lange, L.J. Scott, G.C. Graham. 2004.** Isolation and characterization of microsatellite loci from *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Molecular Ecology Notes. 4: 204-205.

**Scott, K.D., K.S. Wilkinson, N. Lawrence, C.L. Lange, L.J. Scott, M.A. Merrit, A.J. Lowe, G.C. Graham. 2005.** Gene-flow between populations of cotton bollworm



*Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is highly variable between years. Bulletin of Entomological Research. 95: 381-392.

**Scott, L.J., N. Lawrence, C.L. Lange, G.C. Graham, S. Hardwick, L. Rossiter, M.L. Dillon, K.D. Scott. 2006.** Population dynamics and gene flow of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton and grain crops in the Murrumbidgee Valley, Australia. Journal of Economic Entomology. 99: 155-163.

**Seddigh, S., M. Darabi. 2017.** Functional, structural, and phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b (cytb) in insects. Mitochondrial DNA Part A. 29 (2): 236-249.

**SENAVE. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas. 2013.** Alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola. Color ABC, 17 Oct. 2013. <http://www.abc.com.py/edicion-impres/economia/senave-en-alerta-tras-ingreso-de-peligrosa-plaga-agricola-629240.html>

**Seymour, M., O. P. Perera, H.W. Fescemyer, R.E. Jackson, S.J. Fleischer, C.A. Abel. 2016.** Peripheral genetic structure of *Helicoverpa zea* indicates asymmetrical panmixia. Ecology and Evolution. 6: 3198-3207.

**Sharma, K.C., S.C. Bhardwaj, G. Sharma. 2011.** Systematic studies, life history and infestation by *Helicoverpa armigera* on tomato in semi-arid region of Rajasthan. Biological Forum - An International Journal. 3: 52-56.

**Silva, I.F., E.L. Lopes Baldin, A. Specht, D.R. Sosa-Gómez, R.V.F. Specht, R. Morando, S.V. Paula-Moraes. 2017.** Biotic potential and life table of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from three Brazilian regions. Neotropical Entomology. 47: 344-351.

**Silva, I.F., E.L. Lopes Baldin, A. Specht, D.R. Sosa-Gómez, R.V.F. Specht, R. Morando, S.V. Paula-Moraes. 2018.** Biological and molecular characterization of the post-invasion immature stages of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Florida entomologist. 101: 25-32.

**Silveira Neto, S., O. Nakano, D. Barbin, N.A. Villa Nova. 1976.** Manual de Ecologia dos Insetos. Agronômica Ceres, São Paulo, 419 pp.

**Simmons, A.M., R.E. Lynch. 1990.** Egg production and adult longevity of *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), and *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) on selected adult diets. Florida Entomologist. 73: 665-671.

**Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, P. Flook. 1994.** Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. Annals of the Entomological Society of America. 87: 651-701.

**Simon, J.C., S. Carre, M. Boutin, N. Prunier-Leterme, B. Sabater-Munoz, A. Latorre, R. Bournoville. 2003.** Host-based divergence in populations of the pea aphid: insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts. Proceedings of the Royal Society of London. 270: 1703-12.

**Simpson, J. 1997.** Amplified fragment length polymorphisms. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 60:73-76.

**Singh, S.K., D.K. Yadav. 2009.** Life table and biotic potential of *Helicoverpa armigera* (Hübner) on chickpea pods. Annals of Plant protection Sciences. 17: 90-93.

**Sirot, L. K. 2003.** The evolution of insect mating structures through sexual selection. Florida Entomologist. 86: 124-133.

**Slansky, F. 1980.** Quantitative food utilization and reproductive allocation by adult milkweed bugs, *Oncopeltus fasciatus*. Physiological Entomology. 5: 73-86.

**SMN. Servicio Meteorológico Nacional. 2018.** Caracterización: estadísticas de largo plazo. Disponible en línea: <https://www.smn.gov.ar/caracterizacion-estadisticas-de-largo-plazo>.

**Soranzo, N., J. Provan, W. Powell. 1999.** An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. Genome. 42: 158-161.

**Sosa-Gómez, D.R., R.A. Humber. 2002.** Entomopathogens associated with soybean/wheat production systems in Brazil and Argentina. En: SIP 35th Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology, Foz do Iguazu, 75 pp.

**Specht, A., J.A. Teston, R.A. Di Mare, E. Corseuil. 2005.** Noctuídeos (Lepidoptera, Noctuidae) coletados em quatro Áreas Estaduais de Conservação do Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia. 49: 130-140.

**Specht, A., D.R. Sosa-Gómez, S.V. Paula-Moraes, S.A.C. Yano. 2013.** Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. Pesquisa agropecuária brasileira. 48 (6): 689-692.

**Stansfield, W.D. 1992.** Genética. McGraw- Hill, México, 560 pp.

**Strand, M. 1993.** Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature. 365 (6443): 274-6.

**Stratta, R, G. Ferrero, P. Asenjo. 2015.** Regiones productivas de la Argentina: región pampeana. Facultad de Ingeniería, UNLP. Disponible en línea:

[https://www.ing.unlp.edu.ar/catedras/G0433/descargar.php?secc=0&id=G0433&id\\_inc=21](https://www.ing.unlp.edu.ar/catedras/G0433/descargar.php?secc=0&id=G0433&id_inc=21)

751

**Strong, D.R., J.H. Lawton, R. Southwood. 1984.** Insects on plants: community patterns and mechanisms. Cambridge: Harvard University Press, 313 pp.

**Subramanian, S., S. Mohankumar S. 2006.** Genetic variability of the bollworm, *Helicoverpa armigera*, occurring on different host plants. Journal of insect science. 26: 1-8.

**Sun, W., H. Dong, Y.B. Gao, Q.F. Su, H.T. Qian, H.Y. Bai, Z.T. Zhang, B. Cong. 2015.** Genetic variation and Geographic Differentiation among Populations of the Nonmigratory Agricultural Pest *Oedaleus infernalis* (Orthoptera: Acridoidea) in China. Journal of Insect Science. 15 (1): 150-158.

**Tabashnik, BE. 1994.** Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Entomology. 39: 47-79.

**Tabashnik B.E., Y. Carrière. 2008.** Evolution of insect resistance to transgenic plants. Pp 267-279 in Tilmon, K.J. (Ed), Specialization, Speciation, and radiation: The evolutionary biology of herbivorous insects. Berkeley, CA, USA, University of California Press.

**Tajima, F. 1989.** The effect of change in population size on DNA polymorphism. Genetics. 123: 585-595.

**Takami, Y., C. Koshio, M. Ishii, H. Fujii, T. Hidaka, I. Shimizu. 2004.** Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. Molecular Ecology. 13: 245-258.

**Tamhankar, A.J., T.P. Rajendran, N.H. Rao, R.C. Lavekar, P. Jeyakumar, D. Monga, O.M. Bombawale. 2003.** Variability in response to *Helicoverpa armigera* males from

different locations in India to varying blends of female sex pheromones suggests male sex pheromones response polymorphism. *Current Science*. 84: 448-50.

**Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.

**Tay, W.T., R.J. Mahon, D.G. Heckel, T.K. Walsh, S. Downes, W.J. James, S.F. Lee, A. Reineke, A.K Williams, K.H.J. Gordon. 2015.** Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab is conferred by mutations in an ABC transporter subfamily A protein. *PLoS Genetics* 11: e1005534.

**Taylor, P.S., E.J. Shields. 1990.** Development of the armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) under fluctuating daily temperature regimes. *Environmental Entomology*. 19: 1422-1431.

**Templeton, A.R. 1980.** The theory of speciation via the founder principle. *Genetics*. 94: 1011-1038.

**Templeton, A.R. 1989.** The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En: Otte, D., J.A. Endler (Eds.), *Speciation and its Consequences*, Sinauer, Sunderland, MA, pp 3-27.

**Templeton, A. R., K. Shaw, E. Routman, S.K. Davis. 1990.** The Genetic Consequences of Habitat Fragmentation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 77: 13-27.

**Templeton, A.R., K.A. Crandall, C.F. Sing. 1992.** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 132: 619-633.

**Turelli, M., N.H. Barton, J.A. Coyne. 2001.** Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*. 16: 330-343.

**Urretabizkaya, N., A. Vasicek, E. Saini. 2010.** Insectos perjudiciales de importancia agronómica. I. Lepidópteros. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires, Argentina, Universidad Nacional de Lomas de Zamora y Universidad Nacional de La Plata, 77 pp.

**van Oosterhout, C.V., W.F. Hutchinson, D.P.M. Willis, P. Shipley. 2004.** MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*.4: 535-53.

**van Oppen, M.J., C. Rico, G.F. Turner, G.M. Hewitt. 2000.** Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi cichlids. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 489-498.

**Vargas, R., T. Nishida. 1980.** Life table of the Corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie), in sweet corn in Hawaii. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*. 32: 301-307.

**Vaughan, V., A.M. Lloyd. 2003.** An analysis of microsatellite loci in *Arabidopsis thaliana*: mutational dynamics and application. *Genetics*. 165: 1475-1488.

**Vassal, J.M., T. Brevault, J. Achaleke, P. Menozzi. 2008.** Genetic structure of the polyphagous pest *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) across the sub-saharan cotton belt. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 73: 433-437.

**Velasco de Stacul, M., J.M. Barral, R.N. Orfila. 1969.** Taxonomía, especificidad y caracteres biológicos diferenciados del complejo de especies denominadas ‘oruga del capullo’ del algodón, ‘oruga de la espiga’ del maíz, ‘oruga del brote’ del tabaco y ‘bolillera’

del lino. Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA, Bs. As., Rep. Argentina. Serie 5. Patología Vegetal. 6: 19-68.

**Velásquez-Vélez, M.J., C.I. Saldamando-Benjumea, J.D. Ríos-Diez. 2011.** Reproductive isolation between two populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in corn and rice fields from central Colombia. Annals of the Entomological Society of America. 104(4): 826-833.

**Vijaykumar, F.B., K.B. Krishnareddy, M.S. Kuruvinashetti, B.V. Patil. 2007.** Mating compatibility among *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) occurring on selected host plants and Bt cotton survivors. Journal of economic entomology. 100: 903-908.

**Walsh, B.D. 1867.** The apple-worm and the apple maggot. Journal of Horticulture. 2: 338-43.

**Wang, D., X. Yang, H. Li, A. Wuwaishi, R. Ding, H. Li, H. Pan, J. Liu, Y. Xu, Y. Lu. 2018.** Genetic homogeneity between populations of cotton bollworm from Xinjiang, China. Journal of Asia-Pacific Entomology. 21: 309-315.

**Wang, K.Y., Y. Zhang, H.Y. Wang, X.M. XIA, T.X. Liu. 2008.** Biology and life table studies of the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae), influenced by different larval diets. Insect Science. 15: 569-576.

**Wang, M.L., N.A. Barkley, T.M. Jenkins. 2009.** Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of biotechnology. Genes. Genomes and Genomics. 3(1): 54-67.

**Wang, Y.Z., B.Y. Li, A. A. Hoffmann, L. J. Cao, Y. J. Gong, W. Song, J. Y. Zhu, S. J. Wei. 2017.** Patterns of genetic variation among geographic and host-plant associated

populations of the peach fruit moth *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae). BMC Evolutionary biology. 17: 1-12.

**Waples, R. S. 1987.** A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. Evolution. 41: 385-400.

**Weber, J.L., P.E. May. 1989.** Abundant class of DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetics. 44: 388-396.

**Wei, S.J., L.J. Cao, Y.J. Gong, B.C. Shi, S. Wang, F. Zhang, X.J. Guo, Y.M. Wang, X.X. Chen. 2015.** Population genetic structure and approximate Bayesian computation analyses reveal the southern origin and northward dispersal of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in its native range. Molecular Ecology. 24 (16): 4094-111.

**Weir, B.S., C.C. Cockerham. 1984.** Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. Evolution. 38: 1358-1370.

**Westbrook, J.K. 2008.** Noctuid migration in Texas within the nocturnal agro-ecological boundary layer. Integrative and Comparative Biology. 48: 99-106.

**Westbrook, J.K., J.D. Lopez Jr. 2010.** Long distance migration in *Helicoverpa zea*: what we know and need to know. Southwestern Entomologist. 35: 355-360.

**Wilkerson, R.C., T.J. Parsons, D.G. Albright, T.A. Klein, M.J. Braun. 1993.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: Anopheles). Insect Molecular Biology. 1: 205-211.



**Wong, A., M.R. Forbes, M.L. Smith. 2000.** Characterization of AFLP markers in damselflies: prevalence of codominant markers and implications for population genetic applications. *Genome*. 44: 677-684.

**Wu, S.B., M.Q. Wang. 2012.** Sexual differences in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) as influenced by photoperiod and temperature. *Oriental insects*. 46: 191-198.

**Wright, S. 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics Society*. 15: 323-54.

**Wright, S. 1955.** Classification of the factors of evolution. *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology* 20: 16-24.

**Xie, X., J. Rull, A. Michel, S. Velez, A.A. Forbes, NF. Lobo, M. Aluja, J.L. Feder. 2007.** Hawthorn- infesting populations of *Rhagoletis pomonella* in Mexico and speciation mode plurality. *Evolution*. 61: 1091-1105.

**Yenagi, B.S., V.C. Patil, D.P. Biradar, B.M. Khadi. 2012.** Molecular diversity of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hübner) using Rapd markers. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 11: 61-65.

**Yoon, C.K., C.F. Aquadro. 1994.** Mitochondrial DNA variation among the *Drosophila atabasca* semispecies and *Drosophila affinis*. *Journal of Heredity*. 85: 421-426.

**Zárate, Y., L. Mendicino. 2015.** Regiones productivas de la Argentina: NOA (Noroeste Argentino). Disponible en línea: [https://www.ing.unlp.edu.ar/catedras/G0433/descargar.php?secc=0&id=G0433&id\\_inc=21751](https://www.ing.unlp.edu.ar/catedras/G0433/descargar.php?secc=0&id=G0433&id_inc=21751).

**Zlatkov, B., P. Huemer. 2017.** Allopatric cryptic diversity in the alpine species complex *Phtheochroa frigidana* s. lat. (Lepidoptera: Tortricidae). European Journal of Taxonomy. 368: 1-25.