

**Caracterización de la composición en especies del género *Helicoverpa*
en cultivos de maíz, soja y alfalfa de la región central de Argentina**

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal, orientación en Protección Vegetal*

Emilia Inés Balbi
Ingeniera Agrónoma - Universidad Nacional del Litoral -2012

Lugar de trabajo: INTA – Estación Experimental Marcos Juárez



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de Tesis

Joel Demián Arneodo

Licenciado en Cs. Biológicas (Universidad Nacional de Córdoba, 1997)

Doctor en Cs. Biológicas (Universidad Nacional de Córdoba, 2004)

Co-director de Tesis

Daniela Sandra Tosto

Licenciada en Cs. Biológicas (Universidad de Buenos Aires, 1989)

Doctora en Cs. Biológicas (Universidad de Buenos Aires, 2002)

JURADO DE TESIS

JURADO

Patricia del Carmen Fichetti

Licenciada en Cs. Biológicas (Universidad Nacional de Córdoba, 1990)

Doctora en Cs. Biológicas (Universidad Nacional de Córdoba, 2003)

JURADO

Miriam Mercedes Izaguirre

Licenciada en Cs. Biológicas (Universidad de Buenos Aires, 1997)

Doctora en Cs. Biológicas (Universidad de Buenos Aires, 2005)

JURADO

María Gabriela Luna

Licenciada en Cs. Biológicas (Universidad Nacional de La Plata, 1989)

Doctora en Cs. Naturales (Universidad Nacional de La Plata, 1997)

Fecha de defensa de la tesis: 6 de mayo de 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por brindarme los recursos para poder crecer profesionalmente y perfeccionar mi formación académica.

A mi director de tesis, Joel D. Arneodo, por recibirme cálidamente en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola de INTA, por su enseñanza, tiempo y dedicación para que este trabajo de investigación pueda ser llevado a cabo.

A mi co-directora, Daniela S. Tosto, por abrirme las puertas del Instituto de Biotecnología de INTA, brindarme su acompañamiento, recursos y su tiempo para hacer posible la realización de esta tesis.

A mi director de beca, Fernando M. Flores, por su apoyo durante esta carrera y por brindarme todos los recursos a su disposición para que la maestría y este trabajo de investigación puedan ser realizados.

A mis compañeros del área de suelos y producción vegetal de INTA EEA. Marcos Juárez por su compañía y ánimo brindados desde mi llegada a esa institución. En especial a Mónica Boccolini y Valeria Faggioli por compartir conmigo su instrumental de laboratorio y enseñarme a utilizarlo, y a Bethania Aimetta por su aporte relacionado al formato de tesis.

A Javier Gilli y Clarisa Bernardi del área biotecnología de soja de INTA EEA. Marcos Juárez por compartir conmigo su instrumental de laboratorio e instruirme en su utilización.

A Fernando Fava y Eduardo Trumper por recibirme en INTA EEA. Manfredi y ayudarme con la recolección de muestras en trampas de luz.

A Federico Massoni, Marcia Trossero y Jorge Frana para abrirme las puertas de la EEA. Rafaela y ayudarme en la colecta de muestras.

A Analía Salafia y Paola Blanco de la agencia de extensión Laboulaye de INTA por ponerme en contacto con productores para realizar el muestreo en esa localidad y por la ayuda de la colecta en trampas de luz.

A Mariano Luna de INTA EEA. Pergamino por recibirme y brindarme su ayuda en la recolección de muestras.

A Ma. Virginia López, docente de la cátedra de estadística de FAUBA, por brindarme su ayuda en el análisis de datos de este trabajo de investigación.

A mi familia, amigos, y en especial a Matías, mi amor y compañero de todos mis proyectos.

DECLARACIÓN

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”

Emilia Inés Balbi

PUBLICACIONES DERVIDAS DE LA TESIS

Arneodo, J. D.; Taibo, C.; Balbi, E. I.; Jakubowicz, V.; Salvador, R.; Quintana, G.; Farinon, M.; Ferrelli, M. L.; Sciocco-Cap, A. 2019. Libro: "Desarrollo de herramientas para el manejo integrado de artrópodos perjudiciales." Capítulo: Caracterización de patógenos asociados a lepidópteros plaga. Ediciones INTA, Buenos Aires; p. 32 - 35. ISBN 978-987-521-989-2.

Balbi E. I., Flores F. M., Tosto D. S., Arneodo J. D. 2017. Further description of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) male genitalia and new genetic evidence of synonymy with respect to the anomalous form, "*Heliothis stombleri*". Journal of Insect Science 17(3),74; 1–6.

Balbi, E. I., Tosto, D. S., Flores, F. M., & Arneodo, J. D. 2020. Evidence for multiple maternal lineages of the invasive pest *Helicoverpa armigera* in Argentina. Phytoparasitica, 1-7.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Los Heliothinae en el mundo.....	1
1.2 El complejo <i>Heliothis - Helicoverpa</i> como plaga de la agricultura	2
1.3 Características fisiológicas de los géneros reunidos en la subfamilia Heliothinae que determinan ciclos poblacionales en regiones templadas	3
1.4 Conocimientos preliminares sobre las especies del complejo <i>Heliothis - Helicoverpa</i> presentes en Argentina, su distribución y proyección	4
1.5 Objetivos generales	7
CAPITULO 2	9
2.1 Introducción.....	9
2.2 Objetivos del capítulo.....	10
2.2.1 Objetivo general.....	10
2.2.2. Objetivos específicos	10
2.3 Materiales y métodos.....	11
2.3.1 Zona agrícola bajo estudio	11
2.3.2 Recolección del material biológico y conservación	12
2.3.3 Identificación de especies pertenecientes a la subfamilia Heliothinae halladas en el ambiente de la región centro	13
2.3.4 Extracción de ADN y aplicación de la técnica de identificación molecular en las muestras pertenecientes al género <i>Helicoverpa</i>	15
2.3.5 Similitudes genéticas	16
2.3.6 Análisis estadístico	17
2.4 Resultados	18
2.4.1 Frecuencia de especies del género <i>Helicoverpa</i> en los distintos ambientes evaluados	18
2.4.2 Otras especies pertenecientes a la subfamilia Heliothinae encontradas en trampas de luz de la región centro: Caracteres que permiten su identificación.....	22
2.4.3 Posicionamiento de <i>H. stombleri</i> y <i>H. subflexa</i> dentro del complejo <i>Heliothis - Helicoverpa</i>	25
2.5 Discusión	29

2.6 Conclusiones	31
CAPITULO 3	32
3.1 Introducción.....	32
3.1.1 Variaciones encontradas entre especies del género <i>Helicoverpa</i> en el grado de susceptibilidad a cultivos transgénicos Bt	32
3.1.2 Situación de la problemática de resistencia a cultivos Bt en Argentina	35
3.2 Objetivos del capítulo.....	37
3.2.1 Objetivo general.....	37
3.2.2 Objetivos específicos	37
3.3 Materiales y métodos.....	38
3.3.1 Área bajo estudio	38
3.3.2 Recolección del material biológico y conservación	38
3.3.3 Extracción de ADN y aplicación de la técnica de rápida identificación de las muestras	41
3.3.4 Detección de la toxina Bt en los materiales transgénicos con propiedades insecticidas.....	41
3.4 Resultados	41
3.4.1 Frecuencia de aparición de estados inmaduros de las especies pertenecientes al género <i>Helicoverpa</i> en cultivos de maíz, soja y alfalfa de la región centro de Argentina	41
3.4.2 Detección del evento transgénico en plantas extraídas del campo con daño de orugas bolilleras del género <i>Helicoverpa</i>	47
3.5 Discusión	48
3.6 Conclusiones	51
CAPITULO 4	52
4.1 Introducción.....	52
4.1.1 Utilización del ADN mitocondrial para estudios filogeográficos	52
4.1.2 Análisis filogeográfico y su aplicación en el estudio de <i>H. armigera</i> en la región	52
4.2 Objetivos del capítulo.....	54
4.2.1 Objetivo general.....	54
4.2.2 Objetivos específicos	54
4.3 Materiales y métodos.....	55
4.3.1 Análisis filogeográfico de las muestras colectadas.....	55
4.3.2 Análisis estadísticos de variabilidad genética.....	56
4.4 Resultados	56
4.4.1 Similitudes genéticas a partir del análisis de las secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica para la COI	56

4.4.2 Haplotipos encontrados a partir del análisis de secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica para el citocromo b.....	57
4.4.3 Haplotipos encontrados a partir del análisis de secuencias nucleotídicas parciales de los genes que codifican para la COI y el gen Cit b concatenadas	61
4.4.4 Caracterización de la diversidad genética hallada en las regiones parciales del genoma mitocondrial secuenciado.....	62
4.5 Discusión	64
4.6 Conclusiones	67
CAPITULO 5	68
5.1 Cumplimiento de los objetivos propuestos	68
5.2 Conclusiones generales	69
5.3 Futuras líneas de investigación.....	70
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXO	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Características geográficas y climáticas de las localidades relevadas.....	12
Tabla 2.2: Análisis estadístico de varianza de verosimilitud máxima para las muestras de adultos obtenidas	22
Tabla 3.1: Espectro de control de los tipos de toxinas Bt mayormente utilizados.....	32
Tabla 3.2: Cultivos genéticamente modificados para el control de insectos con aprobación en Argentina	35
Tabla 3.3: Materiales transgénicos para el control de lepidópteros muestreados	38
Tabla 3.4: Cantidad de muestras obtenidas en cada localidad según cultivo. Amplicones obtenidos a partir de cada set de muestras luego de aplicada la técnica de PCR.....	39
Tabla 3.5: Análisis de la varianza de verosimilitud máxima con modelo saturado para las muestras de orugas colectadas en la región centro	45
Tabla 3.6: Análisis de la varianza de verosimilitud máxima con modelo de efectos principales para las muestras de orugas colectadas en la región centro.....	46
Tabla 3.7: Estimaciones de parámetros y pruebas de verosomilitud máxima para cada uno de ellos	46
Tabla 4.1: Resultado obtenido del análisis de diversidad haplotípica para las regiones del ADN mitocondrial evaluadas	62
Tabla 4.2: Resultado obtenido del análisis de diversidad nucleotídica para las regiones del ADN mitocondrial evaluadas	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Ambiente apto para <i>H. armigera</i> en América del Sur, modelado utilizando CLIMEX según Kriticos et al. 2015	7
Figura 2.1: Localidades en las cuales se realizó la toma de muestras.....	11
Figura 2.2: Trampa de luz para la colecta de adultos.....	13
Figura 2.3: Polillas del género <i>Helicoverpa</i> . Manchas reniformes distintivas.. ..	14
Figura 2.4: Programación del termociclador para la técnica PCR RFLP utilizada.....	15
Figura 2.5: Gel de agarosa 1% resultante de la técnica de rápida identificación PCR-RFLP. Los productos de PCR digeridos con la enzima de restricción HinfI muestran los diferentes patrones de RFLP obtenidos para cada especie del género <i>Helicoverpa</i>	16
Figura 2.6: Programación del termociclador para la amplificación del gen nuclear factor de elongación 1 alfa.	17
Figura 2.7: Proporción de especies del género <i>Helicoverpa</i> en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampa de luz en la localidad de Rafaela.	18
Figura 2.8: Proporción de cada especie del género <i>Helicoverpa</i> en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampas de luz en la localidad de Marcos Juárez.....	19
Figura 2.9: Gel de agarosa al 1% resultante de la técnica de PCR-RFLP aplicada en el cual se observan las tres especies colectadas en trampas de luz en la localidad de Marcos Juárez.....	19
Figura 2.10: Proporción de cada especie del género <i>Helicoverpa</i> en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampa de luz en la localidad de Manfredi.....	20
Figura 2.11: Proporción de cada especie del género <i>Helicoverpa</i> en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampa de luz en la localidad de Laboulaye.....	20
Figura 2.12: Proporción de cada especie del género <i>Helicoverpa</i> en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampa de luz en la localidad de Pergamino.	21
Figura 2.13: Aspecto morfológico externo de un adulto de <i>H. subflexa</i>	22
Figura 2.14: Genitalia masculina de <i>H. zea</i>	23
Figura 2.15: Genitalia masculina de <i>H. stombleri</i>	24
Figura 2.16: Genitalia masculina de <i>H. subflexa</i>	24
Figura 2.17: Resultado de la insuflación de la vesícula seminal de <i>H. subflexa</i> con alcohol 70%.....	25

Figura 2.18: Análisis filogenético Neighbor joining para una región parcial de COI de las especies del género <i>Helicoverpa</i> reportadas en Arneodo et al. (2015) con incorporación de <i>H. stombleri</i>	26
Figura 2.19: Análisis similitudes genéticas mediante el método Neighbor joining para una región parcial del gen Elongation factor 1-alfa para las especies del género <i>Helicoverpa</i> reportadas en Arneodo et al. (2015) con incorporación de <i>H. stombleri</i> ..	27
Figura 2.20: Análisis de similitudes genéticas mediante el método Neighbor joining para una región parcial del gen COI para las especies del género <i>Helicoverpa</i> reportadas en Arneodo et al. (2015) con incorporación de las muestras de <i>H. subflexa</i>	28
Figura 3.1: Áreas de producción nacional de soja y maíz.....	38
Figura 3.2: Proporción de especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Rafaela.	42
Figura 3.3: Proporción de especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Marcos Juárez	42
Figura 3.4: Visualización de la aplicación de la técnica de PCR-RFLP en orugas colectadas sobre soja en Marcos Juárez	43
Figura 3.5: Especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Manfredi.	43
Figura 3.6: Visualización de la aplicación de la técnica de PCR-RFLP en orugas colectadas sobre soja en Marcos Juárez..	44
Figura 3.7: Especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Laboulaye.	44
Figura 3.8: Proporción de especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Pergamino	45
Figura 3.9: Detección del gen Bt mediante la amplificación por PCR en tiempo final del promotor 35 S del virus del mosaico de coliflor en trozos de láminas de maíz transgénico.	47
Figura 3.10: Daño de <i>H.zea</i> en maíz viptera de la localidad Manfredi.....	48
Figura 4.1: Sitios en los cuales se colectaron muestras para análisis de ADN mitocondrial	55
Figura 4.2: Árbol de similitudes genéticas mediante Neighbor joining de secuencias correspondientes a la región COI encontradas en el presente estudio y las reportadas previamente en Argentina por Arneodo et al 2015.	57

Figura 4.3: Mapa esquemático de los países del mundo en los cuales se encontró el Hap 1 de la región parcial del citocromo b analizada.....	58
Figura 4.4: Mapa esquemático de los países del mundo en los cuales se encontró el Hap 2 de la región parcial del citocromo b analizada.....	59
Figura 4.5: Mapa esquemático de los países del mundo en los cuales se encontró el Hap 3 de la región parcial del citocromo b analizada.....	59
Figura 4.6: Árbol de similitudes genéticas mediante el método Neighbor joining de secuencias correspondientes a la región Cit b encontradas en el presente estudio y las reportadas previamente en el mundo.....	60
Figura 4.7: Red de haplotipos utilizando el método TCS a partir de regiones parciales de COI y Cit b concatenadas.....	61

ABREVIATURAS

ADNmt: ADN mitocondrial.

Bt: *Bacillus thuringiensis*.

COI: Enzima citocromo oxidasa subunidad I.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

INASE: Instituto Nacional de Semillas.

Cultivos Bt: Cultivos que expresan toxinas propias de *Bacillus thuringiensis* con propiedades insecticidas a causa de un gen introducido por medio de ingeniería genética.

LC₅₀: Concentración letal media.

pb: Pares de bases nitrogenadas que conforman el ADN.

pH: Potencial de hidrógeno.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

RR: Individuo resistente a cultivos Bt.

RS: Individuos heterocigotas para el carácter resistencia a cultivos Bt.

SS: Individuo susceptible a cultivos Bt.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

RESUMEN

Caracterización de la composición en especies del género *Helicoverpa* en cultivos de maíz, soja y alfalfa de la región central de Argentina

Heliothinae es una subfamilia cosmopolita de noctuidos que incluye especies relevantes en el mundo. Su notabilidad se debe a que en su estadio larval se alimentan predominantemente de estructuras reproductivas de plantas herbáceas dañando numerosos cultivos agrícolas y disminuyendo su productividad. En Argentina las especies más perjudiciales se agrupan dentro del género *Helicoverpa*, habiéndose reportado en 2014 la presencia de una plaga cuarentenaria denominada *H. armigera*. El objetivo del presente estudio fue caracterizar el complejo de especies que se encuentra dañando los principales cultivos agrícolas de la región central de nuestro país. Se procedió a evaluar la presencia de las especies del género *Helicoverpa* en cultivos de maíz, soja y alfalfa, así como también la frecuencia encontrada en estos agroecosistemas mediante colectas con trampas de luz de las localidades Rafaela, Manfredi, Marcos Juárez, Laboulaye y Pergamino. La identificación de las especies se realizó mediante una técnica de PCR-RFLP desarrollada previamente ya que la similitud morfológica del género impide la discriminación entre algunas de ellas en forma visual. Se realizó un análisis filogeográfico de las especies encontradas y un análisis de variabilidad genética de *H. armigera* para identificar vías de dispersión. Se encontraron adultos de las especies *H. armigera*, *H. gelotopoeon* y *H. zea* en trampas de luz en proporciones variables según la localidad. Se identificó, además, una especie de la subfamilia Heliothinae no reportada en la región denominada *Heliothis subflexa* y una especie sinónima a *H. zea* conocida como *H. stombleri*. En el cultivo de soja y alfalfa se encontró a *H. gelotopoeon* y *H. zea*, esta última en una baja proporción. En el cultivo de maíz la única especie hallada fue *H. zea*. El análisis filogeográfico de *H. armigera* sugiere que podría existir más de un linaje maternal de esta plaga cuarentenaria en Argentina. Los conocimientos taxonómicos, ecológicos y filogeográficos de las especies del complejo *Heliothis-Helicoverpa* que habitan la región central de Argentina obtenidos en este trabajo de tesis y su interacción con los principales cultivos agrícolas resultan beneficiosos a la hora de planificar un manejo integrado de plagas.

Palabras claves: *Heliothis*, *Helicoverpa*, *H. gelotopoeon*, *H. zea*, *H. armigera*, *H. subflexa*, *H. stombleri*, maíz, soja, alfalfa.

ABSTRACT

Characterization of species composition of the genus *Helicoverpa* in corn, soybean and alfalfa crops in the central region of Argentina

Heliothinae is a cosmopolitan subfamily of noctuids that includes relevant species in the world. Its notability is due to larval feeding on reproductive structures of plants, which damages agricultural crops and decreases their productivity. In Argentina, the most harmful species are grouped within the genus *Helicoverpa* and in 2014, the presence of the quarantine pest *H. armigera* was reported. The aim of the present study was to characterize the species complex that damages the main agricultural crops of the central region of Argentina. The presence of *Helicoverpa* species in corn, soybean and lucerne crops, as well as their frequency in these agroecosystems by light traps, was recorded in different sampling sites: Rafaela, Manfredi, Marcos Juárez, Laboulaye and Pergamino. Species were identified through a PCR-RFLP technique previously developed because morphological similarity among some species of the genus impedes visual discrimination. A phylogeographic and a genetic variability analysis of *H. armigera* were carried out to identify dispersal routes. Adults of *H. armigera*, *H. gelotopoeon* and *H. zea* were found in light traps in variable proportions according to location. One species of Heliothinae subfamily not reported in the region before named *Heliothis subflexa* and other species synonymous with *H. zea* known as *H. stombleri* were identified. *H. gelotopoeon* was recorded in soybean and lucerne crops, and at a lesser extent, *H. zea* was registered in those crops. Interestingly, *H. zea* was the only species found in corn. The phylogeographic analysis of *H. armigera* showed that there could be more than one maternal lineage of this quarantine pest in Argentina. The taxonomic, ecological and phylogeographical knowledge of *Heliothis-Helicoverpa* species that inhabit the central region of Argentina gathered during this study and its interaction with the main agricultural crops are important to design integrated pest management strategies.

Key words: *Heliothis*, *Helicoverpa*, *H. gelotopoeon*, *H. zea*, *H. armigera*, *H. subflexa*, *H. stombleri*, corn, soybean, lucerne.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Los Heliothinae en el mundo

Heliothinae es una subfamilia cosmopolita de noctuidos (comúnmente llamados polillas) que incluye especies relevantes en regiones cálidas y secas del mundo (Mitter et al. 1993). En su estado larval se alimentan predominantemente de estructuras reproductivas de plantas herbáceas, dando a estos insectos una variedad de nombres comunes como orugas bolilleras, capulleras y barrenadoras de vainas (Zalucki et al. 1986). En el mundo existen unas 365 especies (Cho et al. 2008) y aunque sólo unos pocos géneros se consideran polífagos, algunas especies son ampliamente conocidas y estudiadas por formar parte del grupo de plagas de cultivos agrícolas más importante del mundo (Cunningham y Zalucki 2014).

Durante la primera mitad del siglo XX se consideró que el género *Heliothis* estaba conformado por una única especie cosmopolita referida como *Heliothis obsoleta* o *Heliothis armigera* (Common 1953). Durante la segunda mitad del siglo estudios taxonómicos llevados a cabo por investigadores de diversas partes del mundo revelaron que en realidad se trata de un complejo de especies. Hardwick (1965) distinguió cinco subgrupos taxonómicos basándose en la estructura genital masculina. El subgrupo “punctigera” representado por una sola especie australiana, el subgrupo “gelotopoeon” representado por cuatro especies presentes en Sudamérica, el subgrupo “hawaiiensis” representado por dos especies presentes en las islas hawaianas, el subgrupo “armigera” representado por dos especies en Asia y Europa, y el subgrupo “zea” representado por ocho especies distribuidas en todo el mundo.

La mayor parte de las especies polífagas de importancia agronómica que se conocen actualmente pertenecen a un mismo grupo taxonómico, denominado *Heliothis*. Dentro de este grupo las más notorias pertenecen a los subgrupos que atacan maíz (género *Helicoverpa*) y tabaco (*Heliothis virescens*), los cuales se encuentran estrechamente relacionados. Estudios llevados a cabo a través de los años han dado cuenta de cambios dramáticos en el número de hospederos de los cuales se alimentan. Entre especies muy emparentadas se encuentran algunas con un rango amplio de hospederos y otras que son específicas en su alimentación con un rango muy estrecho. De allí la importancia de profundizar los estudios de estos lepidópteros en áreas agrícolas ya que la frecuencia de aparición de las distintas especies de la subfamilia Heliothinae sobre plantas cultivadas aún no está esclarecida (Cho et al. 2008).

El género polífago *Helicoverpa* se encuentra ampliamente distribuido en zonas tropicales y templadas de todo el mundo. Hasta el año 2013 en el cual investigadores brasileros alarmados por fallas en el control de orugas en cultivos de maíz y soja detectaron la presencia de *H. armigera* en el continente americano, la distribución de especies seguía la descripción realizada por Hardwick en 1965 en la cual el género *Helicoverpa* estaba representado por *H. zea* a lo largo del continente americano y el grupo endémico “gelotopoeon” (que engloba a las especies *H. gelotopoeon*, *H. atacamae*, *H. bracteae* y *H. titicacae*) en América del Sur. En Europa está representado por *H. armigera*. En África el género abarca las especies *H. armigera*, *H. assulta*, *H. fletcheri* y *H. toddi*, y en las islas Santa Helena existe una especie denominada *H. helenae* cuyo

origen ha sido propuesto como resultado de un proceso de especiación alopátrida considerando los 1800 km de distancia que separan las islas de la costa occidental de Angola (Nibouche et al. 1998). En Asia representan al género las especies *H. armigera*, *H. assulta* y *H. tibetensis*, y en Australia *H. armigera*, *H. assulta* y la endémica *H. punctigera*. En las islas del Océano Pacífico se encuentran las especies *H. armigera*, *H. assulta*, *H. pacifica*, *H. minuta*, *H. confusa*, *H. hawaiiensis* y *H. pallida*.

1.2 El complejo *Heliothis - Helicoverpa* como plaga de la agricultura

El status de plaga de los géneros reunidos dentro de la subfamilia Heliothinae se debe fundamentalmente a cuatro de sus principales características: polifagia, alta movilidad, alta fecundidad y diapausa facultativa. Estos rasgos permiten la supervivencia en hábitats inestables y la adaptación a cambios estacionales (Fitt 1989).

La importancia de la polifagia en la dinámica de la población es clave en varios aspectos. El primero es que las poblaciones pueden desarrollarse simultáneamente en distintos hospederos dentro de una región. A su vez, las poblaciones se mantienen durante considerables períodos de tiempo explotando una sucesión de recursos hospederos tanto cultivados como no cultivados. Además, pueden persistir en bajas densidades en áreas no aptas, ya que las hembras tienen alta probabilidad de localizar un hospedero para mantener el desarrollo de su descendencia. Por lo tanto, la polifagia permite una variación del uso de plantas hospederas, en beneficio de la supervivencia y desarrollo de los estados inmaduros y en consecuencia en la fecundidad de la hembra adulta, otorgándole a las especies un gran potencial de persistencia y crecimiento (Fitt 1989; Liu et al. 2004; Liu et al. 2010).

La importancia del complejo de *Heliothis – Helicoverpa* en el mundo radica, entre otros aspectos, en que estas plagas se alimentan de las partes reproductivas de los cultivos (espigas, vainas, capullos) causando un daño directo a la producción. Sobreviven alimentándose de numerosos hospederos, pero han encontrado su nicho en los estados reproductivos de diferentes cultivos a los que prefieren debido al aumento en su supervivencia, fecundidad y “fitness” cuando se alimentan de sus flores y frutos (Liu et al. 2010). En términos generales se cree que las hembras depositan sus huevos en aquellos hospederos que resultarán nutricionalmente favorables para el desarrollo de la descendencia (Jaenike 1978). Abundando esta teoría, Firempong y Zalucki (1990) estudiaron un rango de hospederos cultivados para evaluar la preferencia de oviposición de diferentes poblaciones de *H. armigera* provenientes del este de Australia. Encontraron que el tabaco, maíz y girasol son los cultivos más preferidos seguidos por soja, algodón y alfalfa. Liu et al. (2007) hallaron que el desarrollo larval y el peso de pupas criadas en diferentes cultivos hospederos muestran diferencias en reservas para la dormancia invernal, grado de resistencia a bajas temperaturas y supervivencia. Las larvas destinadas a entrar en diapausa acumulan energía antes de la inducción a este proceso. La habilidad de los insectos de acumular reservas varía acorde al hospedero del cual se alimenta en su fase inmadura lo cual impacta en el peso de la pupa y sus reservas lipídicas. Cuantos más beneficios obtenga del alimento, más lípidos serán contenidos en la pupa invernante y mayor potencial de sobrevivir al invierno va a alcanzar dicho individuo (Liu et al. 2007). En estudios realizados por Maelzer y Zalucki, en 1999, los cultivos de alfalfa y maíz tuvieron un efecto positivo para poblaciones de *H. armigera* mientras que el sorgo resultó desfavorable. El maíz incide en el incremento de las poblaciones de *Helicoverpa* spp. ya que al alimentarse de las espigas y ubicarse las larvas por debajo de las envolturas vegetales su control químico no constituye una herramienta de uso eficaz (Fitt 1991). En

el hemisferio oeste, *H. virescens*, denominada la oruga del tabaco, es una de las principales plagas de los cultivos de tabaco, algodón, soja y tomate (Albernaz et al. 2012).

Conforme al paisaje de cada región, y de las especies silvestres e implantadas, será la probabilidad de éxito que alcance cada especie perteneciente al complejo *Heliothis - Helicoverpa*, su abundancia poblacional y su capacidad de generar pérdidas de rendimiento a los cultivos agrícolas.

1.3 Características fisiológicas de los géneros reunidos en la subfamilia Heliothinae que determinan ciclos poblacionales en regiones templadas

La duración de los diferentes estados de desarrollo de las especies del complejo *Heliothis - Helicoverpa* decrece en la medida que la temperatura se incrementa. Umbrales de desarrollo de 10.5°C, 11.3°C y 13.8°C fueron estimados para los estados de huevo, larva y pupa de la especie *H. armigera* bajo condiciones de laboratorio (Jallow y Matsumura 2001).

Las bajas temperaturas afectan a los insectos en forma diferencial. Factores importantes en la respuesta a las bajas temperaturas son la severidad del enfriamiento y la duración de la exposición. El estado de desarrollo y la aclimatación también tienen alto impacto en la respuesta de los insectos a las bajas temperaturas. Diversos géneros de la familia Noctuidae, y entre ellos, los pertenecientes a la subfamilia Heliothinae, son capaces de reducir su metabolismo al mínimo y tolerar temperaturas cercanas a 0°C. La diapausa facultativa define la ocurrencia estacional de especies de los géneros *Heliothis* y *Helicoverpa* en las distintas regiones manteniendo ciertas densidades poblacionales aún durante los periodos en los cuales no existen hospederos de valor nutricional adecuado para la reproducción y supervivencia. A su vez, un individuo en diapausa es más tolerante a las condiciones climáticas adversas de baja humedad y temperatura que ocurren durante el invierno (Fitt 1989).

La respuesta genética primaria de las poblaciones de insectos a variables ambientales corresponde al fotoperiodo en primer lugar y a la temperatura en segundo. Las adaptaciones térmicas tienen lugar luego de que las poblaciones se establecen en respuesta a los ciclos estacionales (Bradshaw y Holzapfel 2010). El fotoperiodo es importante para el cambio entre el activo desarrollo del verano y la entrada en diapausa en el otoño. Generalmente este es un cambio más gradual que la salida de la diapausa llegada la primavera (Frazier et al. 2006).

La diapausa pupal es inducida en los estados larvales tardíos (fines del 4to estadio larval y principios del 5to) con temperaturas de 20°C y fotoperiodos menores a 12 hs de luz en *H. armigera* (Kurban et al. 2005) y en *H. zea* (Zhang et al. 2015), aunque las diferencias de umbrales de temperaturas de entrada/salida de diapausa se encuentran probablemente influenciadas por las adaptaciones a diferentes regiones geográficas y el origen de las poblaciones. Ensayos de laboratorio permitieron estimar que en Estados Unidos la distribución de *H. zea* es continua hasta el paralelo 40° N, una latitud considerada límite para la supervivencia de pupas invernantes en el suelo, no sólo por el efecto de bajas temperaturas, sino por la cantidad de horas en que la temperatura se encuentra cercana a 0°C (Morey et al. 2012). Las temperaturas extremas demandan adaptaciones fisiológicas, requiriendo energía y llegando incluso a ser fatales. Estas temperaturas extremas tienen efectos profundos en la “performance” y el “fitness” del insecto en el campo (Huey 2010).

En latitudes mayores a 30° (tanto Norte como Sur), el “fitness” depende de la habilidad para crecer y reproducirse en la estación cálida y adaptarse mediante dormancia o migración a la estación fría y a la habilidad de hacer una transición entre estaciones. En este sentido el “fitness” es definido a partir del comportamiento del insecto integrando las cuatro estaciones del año y no sólo por la medición de su “performance” en una condición ambiental determinada. En términos generales, y en todos los ambientes, el “fitness” se incrementa exponencialmente con la temperatura llegando a un máximo correspondiente a la temperatura óptima y declina rápidamente a temperaturas excesivamente altas (Bradshaw y Holzapfel 2010).

Se ha determinado que el estadio fenológico de los cultivos, el número de días lluviosos, la humedad ambiente relativa y las temperaturas diarias mínimas son factores que influyen fuertemente el desarrollo poblacional de especies del género *Helicoverpa* en el campo (Pratheepa et al. 2016). Análisis de regresión de largas series de capturas de polillas en trampas de luz en Australia fueron usadas para describir las dinámicas estacionales de *H. armigera*. Se observó que el tamaño de la segunda generación anual fue significativamente dependiente del tamaño de la primera generación, de las lluvias de invierno, las lluvias primaverales y los cultivos presentes en el paisaje. Las lluvias invernales se correlacionan positivamente con la densidad poblacional, ya que tienen un impacto positivo en el crecimiento de malezas y de hospederos que sirven de recursos para los individuos invernantes cuando abandonan el suelo. Cuando las lluvias son primaverales los efectos del incremento de humedad en huevos y larvas del primer estadio pueden ser nocivos por hacerlos más propensos al ataque por hongos. A nivel regional, los efectos negativos de las condiciones ambientales extremas deben persistir por cierto tiempo para que produzcan una reducción substancial de la abundancia poblacional (Maelzer y Zalucki 1999). En síntesis, los conocimientos sobre los aspectos referentes a la biología y genética de los insectos que impactan en la sucesión de sus ciclos poblacionales son cruciales para el diseño de alternativas de manejo en cultivos agrícolas.

1.4 Conocimientos preliminares sobre las especies del complejo *Heliothis* -

***Helicoverpa* presentes en Argentina, su distribución y proyección**

En Argentina históricamente se conocen dos especies del género *Helicoverpa* de importancia agronómica: *H. zea* y *H. gelotopoeon*. En el año 1978, en un estudio de ecología y comportamiento del complejo *Heliothis* - *Helicoverpa* en la región norte Velasco de Stacul reportó la presencia tres especies: *H. zea* en maíz y algodón, *H. gelotopoeon* en algodón, alfalfa, lino, cártamo, girasol y sorgo, y *Heliothis virescens* en tabaco, algodón y lino. Esta última es una plaga típica del norte argentino, pero de poca relevancia en la región centro. Otra especie del complejo presente en el norte de Argentina pero que no se encuentra asociada a cultivos agrícolas sino a plantas de presencia esporádica es *H. bractea*. Tanto *H. zea*, *H. gelotopoeon* como *H. virescens*, a pesar de sus preferencias alimenticias, pueden completar su ciclo en algodón o en maíz y ejemplares aislados de cualquiera de ellas fueron encontrados en cultivos que no les son típicos. En algodón, cártamo, girasol y alfalfa la especie predominante del complejo *Heliothis* - *Helicoverpa* fue *H. gelotopoeon* en una proporción variable del 94 al 98%. Otra especie del género *Heliothis* reportada en el centro del país es *H. molochitina*, la polilla más pequeña de este complejo que se encuentra también presente en latitudes bajas de Sudamérica. Esta polilla ha sido reportada en las provincias de Chaco, Catamarca, Corrientes, La Rioja, Buenos Aires, Salta y Entre Ríos, y aún no posee registros de daños severos en cultivos agrícolas extensivos, aunque se la puede hallar esporádicamente

consumiendo algodón y cultivos hortícolas de zapallo, tomate y melón (Navarro et al. 2009). De similar tamaño, pero sin datos concretos de su abundancia y distribución en nuestro país, se reporta a *H. subflexa*. Esta especie es nativa de Norteamérica (Baker et al. 2004; Pogue 2013) y ocurre en regiones tropicales y templadas del continente americano. Se encuentra citada en Argentina (Bado et al. 2005), pero no existen datos de su distribución actual. A diferencia de las anteriores es una especie monófaga que se alimenta de plantas del género *Physalis* (Campos de Melo et al. 2017).

Hasta el año 2013, *H. zea* y *H. gelotopoeon* conformaban las únicas especies de importancia agronómica del complejo *Helitohis - Helicoverpa* en la región central de Argentina, las cuales son incluidas en los planes de manejo integrado de plagas por causar daños principalmente en los cultivos de maíz y soja. En la campaña de verano 2013/14, advertidos por los reportes de daño en diversos estados de Brasil, investigadores de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (Tucumán) comenzaron el monitoreo con trampas de feromonas y encontraron a *H. armigera* formando parte del complejo de orugas bolilleras en Argentina (Murúa et al. 2014).

Helicoverpa armigera fue reportada por primera vez en el continente americano por investigadores de EMBRAPA Brasil en 2013 (Czepak et al. 2013) y luego en Paraguay al siguiente año (SENAVE 2014). En Argentina, los primeros individuos fueron detectados en cultivos de garbanzo de la localidad La Cocha en la provincia de Tucumán (Murúa et al. 2014). A continuación, su presencia se extendió por el norte en las provincias de Salta y Chaco y hacia el sur abarcando distintas localidades de las provincias de Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, y Buenos Aires, siendo el reporte más austral en la localidad de Pergamino (33° S, 60° O) (SINAVIMO 2015).

Helicoverpa armigera denominada comúnmente como “la oruga del viejo mundo” es la plaga más importante e impactante de la agricultura en Asia, Europa, África y Australasia, causando daños en los cultivos que se estiman mayores a US\$ 2 mil millones al año, excluyendo los perjuicios socioeconómicos y ambientales asociados a su control (Tay et al. 2013; Tay et al. 2017). Los daños provocados por la plaga en Brasil hacen sospechar que ha estado presente en Sudamérica algún tiempo antes de su identificación, ya que en estados como Mato Grosso y Bahía se han registrado en la campaña 2012/13 niveles de infestación inusualmente altos en cultivos de verano como algodón, maíz, sorgo, soja, poroto y tomate (Ávila et al. 2013). Esta presencia inadvertida puede deberse a la similitud morfológica de *H. armigera* con las restantes especies del complejo, principalmente con *H. zea*, especie muy relevante en el cultivo de maíz que se encuentra desde hace cientos de años en los lugares afectados. Una curiosidad particular que deriva de este aspecto es que uno de los nombres comunes que se utilizan para denominar a *H. armigera* en el viejo mundo es “oruga americana”, partiendo esta denominación de la confusión con *H. zea* (Kriticos et al. 2015). Las potenciales pérdidas asociadas a la presencia de *H. armigera* en Argentina han activado la alarma de productores e investigadores ya que, de las más de 100 millones de toneladas producidas en este país en cultivos de cereales y oleaginosas, el 92% de la producción es susceptible de ser atacada por esta plaga (SIIA 2015).

Los adultos de *H. armigera* tienen hábitos migratorios, pueden moverse cientos de kilómetros entre regiones y dentro de ellas. Estudios genéticos revelaron la existencia de alto flujo de genes entre las poblaciones de África septentrional y occidental, sugiriendo que el desierto del Sahara no es una barrera insuperable para la migración de esta plaga. La migración en tales escalas implica vuelos a través de distancias mínimas de 2.000 kilómetros de la frontera norte del Sahara a la zona subsahariana (Nibouche et al. 1998).

Estudios sobre genética de poblaciones de *H. armigera* provenientes de Australia, Burkina Faso, Uganda, China, India y Pakistán han demostrado que existen haplotipos compartidos entre continentes y una baja variabilidad en la secuencia nucleotídica, en una región parcial de ADN mitocondrial (subunidad I de la enzima citocromo oxidasa, fragmento de 511 pb), lo cual confirma una alta movilidad de esta plaga. Los especímenes obtenidos en muestras de América sugieren que *H. zea* conforma también una única especie en toda su área de distribución. El mismo estudio reveló distancias genéticas cortas entre *H. armigera* y *H. zea*, contribuyendo a la hipótesis de que *H. zea* se estableció en América a través de un evento fundador de *H. armigera* aproximadamente 1,5 millones de años atrás (Behere et al. 2007).

La capacidad migratoria en complementación con la posibilidad de alcanzar un estado de diapausa en condiciones desfavorables permite a *H. armigera* colonizar hábitats efímeros y sobrevivir bajo condiciones climáticas desfavorables. Tal como se indicó previamente, la resistencia de los lepidópteros al frío afecta su potencial para sobrevivir durante el invierno y el crecimiento poblacional durante las estaciones favorables en diferentes regiones geográficas (Morey et al. 2012). En áreas templadas y subtropicales, *H. armigera* entra en diapausa facultativa en estado de pupa durante los meses invernales (Fitt et al. 1989). En áreas tropicales, la proporción de la población que entra en diapausa es muy pequeña y las generaciones se suceden durante todo el año. La amplia distribución geográfica de *H. armigera* muestra que esta especie se puede adaptar a cambios estacionales desde regiones tropicales hasta regiones templadas.

Como fue mencionado anteriormente, en Argentina una especie que se destaca como plaga clave del cultivo de maíz es *H. zea*. En Estados Unidos un estudio de laboratorio fundamentó las observaciones realizadas a campo de los límites de hibernación en estado de pupa de *H. zea*, dando como límite superior de supervivencia en estado de pupa el paralelo 40°N. La mortalidad invernal de *H. zea* en ese país alcanza valores entre 92,5 y 99,1%. La proporción de individuos sobrevivientes varía entre años, así como también entre localidades de una misma región (Slosser et al. 1975). Muy asociada a *H. zea* en la bibliografía internacional se encuentra a *H. stombleri*, un noctuido que fue descrito inicialmente por Okumura y Bauer en 1969, y luego caracterizado por Hardwick en 1970 tras una colecta de muestras que incluyó a la Argentina y otros países de América. Los primeros investigadores la nombraron como una nueva especie tras analizar los caracteres morfológicos de su genitalia, pero remarcando su similitud morfológica externa con individuos de *H. zea*. Un año después Hardwick manifestó que, según su criterio taxonómico, no consistiría una nueva especie, sino una aberración genitálica de *H. zea*. En Argentina desde ese entonces no se reportaron nuevos datos de presencia y/o distribución. *H. gelotopoeon* es una plaga reconocida en Argentina por atacar al cultivo de soja tanto en estado vegetativo, afectando brotes, como en el estado reproductivo, consumiendo vainas. En la región central del país, presenta dos a tres generaciones anuales, la primera generalmente ocurre en arveja, vicia, alfalfa, garbanzo, soja de siembra temprana o malezas y las generaciones siguientes se desarrollan generalmente en soja, la actividad agrícola preponderante de esa zona del país. Al igual que las restantes especies del complejo presenta una diapausa invernal en estado de pupa (Navarro et al. 2009). En la región central de Argentina la emergencia de los primeros adultos a partir de pupas invernantes pertenecientes a este complejo ocurre en la primavera durante los meses de setiembre y octubre. A partir de noviembre y durante el verano comienza la llegada de adultos migratorios desde el norte del país (INTA Marcos Juárez, datos no publicados).

En un trabajo desarrollado por Kriticos et al. (2015) se utilizó un modelo de predicción (CLIMEX) para estimar la distribución que podría tener esta especie en todo el continente americano. Los parámetros más influyentes del modelo fueron la temperatura de terminación de la diapausa invernal y la humedad mínima del suelo para el desarrollo. Las condiciones climáticas y la disponibilidad de hospederos permiten suponer la siguiente distribución eventual (Figura 1.1):

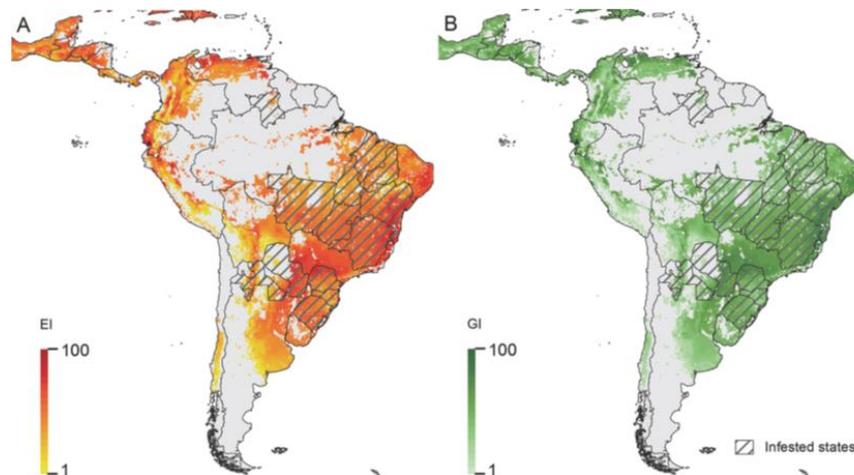


Figura 1.1: Ambiente apto para *H. armigera* en América del Sur, modelado utilizando CLIMEX, teniendo en cuenta los patrones de riego y cultivos hospederos adecuados. A) Índice ecológico (EI), indica posibilidad de persistencia, B) Índice de Crecimiento Anual (GIA), indica el potencial de crecimiento de la población (Kriticos et al. 2015).

Al aplicar el modelo en Argentina, se observa que la zona en donde se espera mayor distribución y potencial daño de *H. armigera* es en la región noreste y centro – este. Esta predicción actualmente encuentra sustento en el hallazgo de la plaga reportada por investigadores nacionales que presentan como límite los paralelos 65° O (Cerrillos, Salta), 59°O (General Obligado, Santa Fe), 24°S (Las Lajitas, Salta) y 33°S (Pergamino, Buenos Aires) (SINAVIMO 2015). La región centro es particularmente relevante en términos de producción ya que representa aproximadamente el 80% de la superficie sembrada anualmente de maíz y el 88% de soja, coincidiendo también esta área con aproximadamente el 85% de la producción nacional de cereales y oleaginosas susceptibles de ser atacada por esta plaga (maíz, soja, algodón, sorgo, girasol, trigo) (SIIA 2015). Gran parte de esta superficie es sembrada cada año con cultivos transgénicos resistentes a lepidópteros. Este aspecto es particularmente relevante ya que *H. armigera* ha manifestado pérdidas de susceptibilidad a través del tiempo a la proteína insecticida Cry 1 Ac (Wu y Guo 2004; Li et al. 2004; Liu et al. 2010) y *H. zea* a la proteína Cry 1Ab (Horner et al. 2003; Dowd 2001). En el continente americano investigadores sugieren que la pérdida económica potencial atribuida a *H. armigera* será mayor a aquella producida actualmente por *H. zea* si esta nueva especie logra establecerse en la región (Pogue 2004).

1.5 Objetivos generales

- 1) Caracterizar la composición en especies del complejo “*Heliothis -Helicoverpa*” en la zona núcleo maicera y sojera de Argentina a partir de individuos adultos colectados mediante trampas de luz.

- 2) Caracterizar la composición en especies del género *Helicoverpa* en la zona núcleo maicera y sojera de Argentina a partir de larvas colectadas directamente de materiales Bt (distintos eventos) y no Bt.
- 3) Comprender el avance de la población de *H. armigera* en el país mediante una aproximación filogeográfica.

La caracterización de la composición en especies del complejo “*Heliothis - Helicoverpa*” a partir de adultos colectados en trampas de luz será abordada en el capítulo 2. La composición de especies del género *Helicoverpa* a partir de larvas colectadas en el campo en cultivos Bt y no Bt se abordará en el capítulo 3 y la aproximación filogeográfica para comprender el avance de *H. armigera* en Argentina será abordada en el capítulo 4.

CAPITULO 2

2.1 Introducción

La correcta identificación de especies y la determinación de su distribución son aspectos esenciales para el estudio de la demografía de plagas, para la búsqueda de enemigos naturales y para el diseño de tácticas de control (Mitter et al. 1993).

En la propuesta filogenética de Hardwick (1965), basada en estudios de taxonomía clásica, la mayoría de las especies y todas las principales plagas de la subfamilia Heliothinae pertenecen a lo que se denomina el clado Heliothis. El desarrollo evolutivo de las especies del género fue mayormente determinado a partir de cambios en la estructura de la genitalia masculina. En términos generales, la tendencia desde las especies primitivas a las evolucionadas fue el alargamiento de la vesícula seminal, la adición de apéndices a la misma, el tamaño, arreglo y ubicación de las espinas vesiculares, y la disminución o desaparición de la espina vesicular apical. En la genitalia femenina, los cambios han sido menos notorios y la clasificación taxonómica se basó fundamentalmente en las características y disposición del apéndice *bursae*.

Según la clasificación de Hardwick (1965) mencionada anteriormente, la especie del género que se considera más ancestral es la endémica australiana *H. punctigera*. Sigue a ésta en grado de evolución el subgrupo “gelotopoeon”. El subgrupo “armigera”, que consiste en sólo dos especies (*H. armigera* y *H. helenae*), se encuentra en una posición intermedia y el subgrupo “zea” es el que presenta el mayor grado de evolución dentro del género.

El método tradicional de identificación de especies dentro del género *Helicoverpa* se basa en la disección del macho adulto, el conteo de la forma y cantidad de espinas en las tibias y la separación y observación bajo lupa estereoscópica de la genitalia. Las especies pueden ser diferenciadas en base fundamentalmente a características morfológicas de las valvas y el falo (Pogue 2004). Las valvas de las distintas especies de *Helicoverpa* presentan una forma característica, aunque son similares entre ellas. El falo posee en su interior la vesícula seminal que por fuera presenta un patrón determinado de pelos esclerotizados que se agrupan formando lo que se denomina “cornuti”. La especie *H. gelotopoeon* no posee el agrupamiento de los pelos en cornuti sino una disposición de los mismos de forma continua e irregular. Las especies *H. armigera* y *H. zea* poseen cornuti, esta última en mayor cantidad. Una característica muy importante para la determinación se observa mediante la insuflación de la vesícula seminal, en la base de la cual se divisan lóbulos que son de utilidad taxonómica para discriminar estas especies (Hardwick 1965).

Debido a que la caracterización taxonómica y separación de especies por genitalia es una técnica que insume mucho tiempo y que solo puede realizarse en individuos adultos, investigadores de distintas partes del mundo han desarrollado técnicas moleculares para distinguir especies con apoyo de estos estudios taxonómicos. Así es como Behere et al. (2008), sometiendo dos regiones parciales del DNA mitocondrial (genes de la subunidad citocromo oxidasa I (COI) y citocromo b) a amplificación por PCR y digestión con endonucleasas de restricción, lograron generar marcadores moleculares para distinguir cuatro especies del género: *H. armigera*, *H. assulta*, *H. punctigera* y *H. zea*. La secuenciación directa del gen de la COI es otra técnica que ha demostrado su fiabilidad para la correcta identificación de las especies de Heliothinae (Cho et al. 2008; Li et al. 2011). Tras la detección de *H. armigera* en Brasil, Specht et al. (2013) describieron los métodos de caracterización morfológica y molecular para

diferenciarla de *H. zea* y ampliaron el registro en ese país. La utilización de las técnicas anteriormente citadas en Argentina presenta limitaciones ya que el complejo *Heliothis - Helicoverpa* incluye otra especie de marcada relevancia, *H. gelotopoeon*, la cual no se encontraba incluida en ninguna de las técnicas moleculares desarrolladas hasta ese momento. Además de ser muy similar a *H. armigera* morfológicamente, comparte con ésta especie un cierto rango de hospederos por lo que su identificación en estados inmaduros a campo se torna incierta. Este aspecto complejiza la situación de alarma fitosanitaria en Argentina debido a la imposibilidad de reconocer de forma rápida y correcta las distintas especies presentes en los cultivos.

Atendiendo a la problemática de identificación de especies y a la detección de *H. armigera*, se desarrolló una técnica molecular PCR-RFLP de rápida identificación de las tres especies del género *Helicoverpa* actualmente presentes en la región centro de Argentina que permite conocer la identidad específica tanto en estadios inmaduros como adultos, sin la necesidad de recurrir a la disección de los adultos. La misma se basa en el análisis de una región genómica parcial de ADN mitocondrial que codifica para la COI (812 pb) y utiliza una sola enzima de restricción (HinfI) tornándola rápida y accesible (Arneodo et al. 2015). En el caso de *H. gelotopoeon* el producto de PCR de 812 pb es cortado por la enzima HinfI en dos fragmentos de 638 y 174 pb. En el caso de *H. armigera* los fragmentos resultan de 462 y 350 pb y en *H. zea* la enzima no encuentra sitios de restricción (en unas pocas muestras encontró un sitio muy próximo al extremo) por lo que el fragmento queda de (o cercano a) 812 pb. Esta técnica amplía la posibilidad de muestreo a campo de individuos y además permite la identificación específica de la plaga en estadio larval en distintos lotes productivos, ya que la determinación de adultos capturados en trampas de luz nos permite detectar la presencia en el ambiente de una zona geográfica pero no acotarlo a un lote o cultivo en particular. Esta técnica desarrollada que es utilizada para determinar la frecuencia de cada especie en el presente trabajo permitió constatar la presencia de *H. armigera* en la región centro del país y reportarla al [Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas](#) (SINAVIMO) ya que se trata de una plaga considerada cuarentenaria. Asimismo, los cebadores diseñados permiten la amplificación y eventual secuenciación de parte del gen de la COI de las demás especies del complejo *Heliothis - Helicoverpa*. Esto permitió la ampliación de estudios moleculares considerando otra especie hallada en trampas de luz en la región centro denominada *H. subflexa* y la detección de una especie sinónima a *H. zea* denominada *H. stombleri*.

2.2 Objetivos del capítulo

2.2.1 Objetivo general

Caracterizar la composición en especies del complejo “*Heliothis - Helicoverpa*” en la zona núcleo maicera y sojera de Argentina a partir de individuos adultos colectados mediante trampas de luz.

2.2.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la frecuencia de cada una de las especies del género *Helicoverpa* presentes en los distintos agroecosistemas.
- 2) Diferenciar especies del género *Helicoverpa* mediante la aplicación de una técnica molecular PCR-RFLP desarrollada para tal fin.

- 3) Destacar los caracteres morfológicos diferenciales de la genitalia masculina de otras especies de la subfamilia Heliothinae halladas en este estudio denominadas *H. stombleri* y *H. subflexa*.
- 4) Posicionar filogenéticamente a *H. stombleri* y *H. subflexa* dentro del complejo estudiado.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Zona agrícola bajo estudio

El estudio se llevó a cabo en la región productiva núcleo maicera y sojera de Argentina incluyendo sitios de muestreo en las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires, las cuales registran las mayores producciones nacionales de cereales y oleaginosas. El muestreo incluyó zonas exclusivamente agrícolas y de producción mixta (agrícola-ganadera/ agrícola-tambera). Se tomaron muestras en 5 localidades representativas de distintos agroecosistemas: Rafaela, Pergamino, Laboulaye, Marcos Juárez y Manfredi (Figura 2.1).

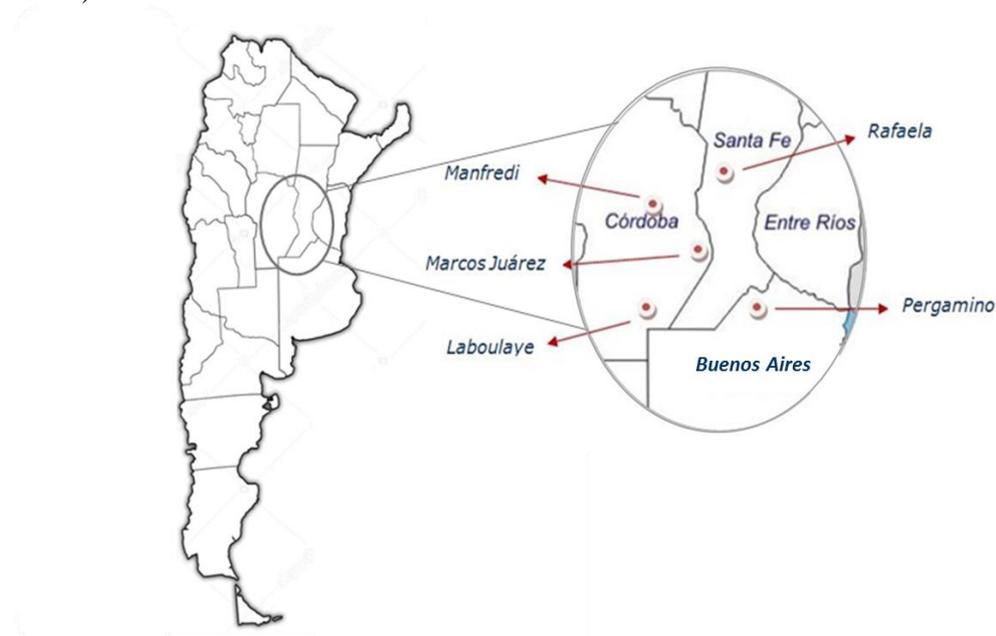


Figura 2.1: Localidades en las cuales se realizó la toma de muestras

Rafaela se ubica en el centro oeste de la provincia de Santa Fe. Es una localidad de referencia de la cuenca lechera Argentina que se caracteriza por poseer una gran cantidad de tambos y empresas lácteas. La actividad agropecuaria predominante es la agricultura para granos y forraje y el ganado vacuno para producción de leche (Castellano et al. 2009).

El partido de Pergamino presenta una geografía de llanura con suaves ondulaciones y algunas depresiones motivadas por la existencia de lagunas y cañadas. Se encuentra ubicado al norte de la Provincia de Buenos Aires. La actividad económica más importante es la agricultura (80% de la superficie) seguida por la ganadería (20%). En lo que respecta a agricultura se cultivan principalmente cereales y oleaginosas para comercialización de granos y pasturas para la alimentación de ganado vacuno (Martínez 2018).

La localidad de Laboulaye se ubica en el sudeste de la provincia de Córdoba dentro de la denominada Cuenca del Arroyo del Medio. La economía del lugar se basa en la producción agroalimentaria agrícola - ganadera. El cultivo de cereales y oleaginosas (trigo, maíz, girasol y soja) está mayormente destinado a la producción de granos para exportación y alimentación de ganado. La ganadería vacuna y ovina se desarrolla a partir de forrajeras implantadas o pastos naturales, con gran participación de estos últimos en zonas de cañada (Sacchi 2010; Salafia et al. 2017).

Marcos Juárez se encuentra ubicada en el sudeste de la provincia de Córdoba aproximadamente a 200 km en dirección norte respecto a la localidad de Laboulaye. En esta localidad los suelos son argiudoles típicos, fértiles y profundos. La actividad predominante es la agricultura extensiva para cosecha de granos en grandes superficies, con predominancia de los cultivos de soja y maíz en verano y trigo en invierno.

Manfredi se encuentra en la provincia de Córdoba, a 60 km de la capital provincial. La zona presenta un relieve de lomas casi planas, muy extendidas, sobre loess pampeano, material friable, no consolidado, con alto contenido de la fracción limo en su textura y un importante porcentaje de carbonato de calcio. La actividad agropecuaria es mixta, agricultura con predominancia de soja y maíz en verano y producción ganadera de carne y leche (Fuente: INTA EEA. Manfredi: <https://inta.gob.ar/documentos/informacion-meteorologica-mensual-de-la-eea-manfredi>, <http://www.agriculturadeprecision.org/institucional/institucional.asp?tit=Institucional>).

Las condiciones climáticas de los distintos ambientes se listan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Características geográficas y climáticas de las localidades relevadas. Datos proporcionados por el sistema de información y gestión agrometeorológica INTA.

Localidad	Rafaela	Manfredi	Marcos Juárez	Laboulaye	Pergamino
Provincia	Santa Fe	Córdoba	Córdoba	Córdoba	Buenos Aires
Posición geográfica	31° 11' S 61° 30' O	31° 50' S 63° 44' O	32° 42' S 62° 06' O	34° 08' S 63° 22' O	33° 56' S 60° 33' O
Altitud	100 msn	292 msn	112 msn	137 msn	55 - 65 msn
Temperatura media anual	18,5 °C (1967 -2017)	16,7 °C (1969 -2013)	17,7 °C (1968 -2017)	16,0 °C (2006 -2017)	16,7 °C (1967 -2017)
Temperatura media máxima anual	24,8 °C (1967 -2017)	23,7 °C (1969 -2013)	24,0 °C (1968 -2017)	24,0 °C (2006 -2017)	23,0 °C (1967 -2017)
Temperatura media mínima anual	12,2 °C (1967 -2017)	9,8 °C (1969 -2013)	11,4 °C (1968 -2017)	10,0 °C (2006 -2017)	10,4 °C (1967 -2017)
Precipitación media anual	1010 mm (1967 -2017)	766 mm (1931 -2015)	893 mm (1968 -2017)	808 mm (1903 -2016)	1036 mm (1967 -2017)

2.3.2 Recolección del material biológico y conservación

Los ejemplares de *Helicoverpa* spp. fueron colectados en trampas de luz ubicadas en cada localidad durante la primavera de 2015 y el verano de 2016, con excepción de Rafaela en la cual la colecta fue realizada en enero - febrero de 2018. Se utilizaron trampas de luz correspondientes a la red de monitoreo de artrópodos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (Figura 2.2). Una vez extraídas de la trampa, las polillas se conservaron en freezer a -20°C o en alcohol 70% hasta el momento de su análisis. Para la colecta del material las trampas de luz fueron revisadas semanalmente por especialistas de cada estación/agencia experimental.

Las campañas analizadas se caracterizaron por ausencia de picos poblacionales de *Helicoverpa* spp. en trampas de luz debido a una baja densidad a campo, por lo cual la muestra tomada por localidad correspondió a la colecta de adultos de varias semanas hasta lograr reunir el número de polillas deseado. En la localidad de Marcos Juárez la muestra fue obtenida entre el mes de noviembre de 2015 y enero de 2016, en Manfredi y Laboulaye el periodo de colecta fue entre noviembre de 2015 y febrero de 2016, y en Pergamino, durante noviembre de 2015 y marzo de 2016. En la localidad de Rafaela debido a problemas eléctricos la trampa de luz dejó de funcionar durante 2016 y ese año no fue posible la colecta de muestras. Se realizó la colecta durante enero y febrero de 2018 tras el restablecimiento de la trampa de luz. Se analizaron 50 polillas por localidad.

En el caso de especies que no son las reconocidas comúnmente dentro del complejo *Heliothis* - *Helicoverpa*, las muestras fueron obtenidas a partir de un muestreo ampliado. Para la caracterización de *H. stombleri* se analizaron 200 muestras similares a *H. zea* en su apariencia externa conservadas en freezer a -20°C colectadas en trampa de luz en INTA Marcos Juárez durante diciembre de 2014 y febrero de 2015. En base a la disección de su genitalia, se detectaron seis individuos. Para el análisis de *H. subflexa* se obtuvieron muestras de la colección de polillas de la campaña agrícola 2015/16 (periodo noviembre – febrero) conservadas en freezer a -20°C en la estación experimental de INTA Marcos Juárez. A partir de la observación macroscópica, se lograron detectar seis individuos de esta especie.



Figura 2.2: Trampa de luz para la colecta de adultos

2.3.3 Identificación de especies pertenecientes a la subfamilia Heliiothinae halladas en la región central de Argentina

Las polillas colectadas en trampas de luz fueron evaluadas en primer término por inspección de la morfología externa. Todas las especies del género *Helicoverpa* poseen

en sus alas anteriores una mancha reniforme próxima al centro del ala y una banda tenue parda clara que atraviesa el tercio distal de la misma (Figura 2.3) que permite distinguir las a simple vista de otras especies que son capturadas en forma simultánea en primavera y verano (Navarro et al. 2009).



Figura 2.3: Polillas del género *Helicoverpa*. La flecha roja indica la mancha reniforme distintiva en las alas.

Una vez separado el material que a priori se identificó como perteneciente a *Helicoverpa*, se efectuó el análisis de la frecuencia de aparición de las especies en estudio en las colectas de las localidades relevadas por medio de la técnica de identificación a nivel molecular desarrollada previamente por Arneodo et al. (2015).

Para la inspección morfológica de los adultos del género *Heliothis* obtenidos en el muestreo ampliado se realizaron observaciones macroscópicas del patrón alar y de las espinas en las tibias y luego microscópicas bajo lupa estereoscópica. Las polillas de *H. virescens* y *H. subflexa* son muy similares en su morfología externa, ambas presentan un color oliváceo claro en las alas anteriores con bandas oblicuas color café. Sin embargo, en *H. subflexa* la línea anterior del diseño alar finaliza sobre el ángulo del ala y en *H. virescens* esta línea finaliza antes del mismo. Luego de la identificación macroscópica, se procedió a la examinación de la genitalia de los individuos (Pogue, 2013). La polilla de *H. stombleri* es macroscópicamente idéntica a *H. zea* por lo cual su identificación se realizó también mediante la inspección microscópica (Pogue, 2004). *H. virescens* y *H. subflexa* no son distinguidas por la técnica molecular previamente desarrollada, pero es posible su identificación macroscópica por el patrón de bandas en sus alas y por su genitalia.

Se procedieron a realizar estudios de genitalia de las especies *H. stombleri* y *H. subflexa* cortando la última porción del abdomen de machos y colocando las mismas en un tubo de ensayo de 15 ml con 2 ml de KOH 10% a baño maría por 15 minutos para eliminar lípidos y aclarar los tejidos. Una vez transcurrido este tiempo se retiraron los tejidos del abdomen y pelos que recubren la genitalia con ayuda de pinzas y pinceles. Luego de liberada, la genitalia fue examinada bajo lupa estereoscópica Zeiss Stemi DV4 con una magnificación 16x para registrar las características del falo y las valvas. Para la observación de lóbulos en la base de la vesícula de *H. stombleri* se insufló la misma con

alcohol 70% con ayuda de una jeringa de 0.3 mm de diámetro. Las fotografías fueron tomadas con cámara digital (Canon G10, Canon Inc., Tokyo, Japan) adaptada a la lente de la lupa con zoom 5x.

2.3.4 Extracción de ADN y aplicación de la técnica de identificación molecular en las muestras pertenecientes al género *Helicoverpa*

Debido a que la técnica fue desarrollada con objetivo de ser un método de rápida identificación de individuos que pueda realizarse con materiales accesibles y en un tiempo relativamente corto, la extracción del ADN de las polillas se realizó orgánicamente mediante la técnica de CTAB (Doyle y Doyle 1987) que tiene probada aceptación por ser un método rápido, sencillo y económico. Las extracciones y la técnica fueron realizadas en tandas de 25 individuos.

La técnica implementada contempla un nuevo set de cebadores diseñado para amplificar una región de 812 pb basada en las secuencias COI de especies de la subfamilia Heliothinae disponibles en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Estos cebadores están compuestos por las secuencias H3Fw (5'CGAGCAGAATTAGGTAAYCC-3') y H3Rv (5'GCTGATGTRAAATAAGCTCGAG-3') (Arneodo et al. 2015). Las condiciones de reacción de PCR se detallan a continuación (Figura 2.4):

Programación termociclador

95°C	5'	} 40 ciclos
95°C	30"	
50°C	30"	
72°C	1'	
72°C	2'	

Figura 2.4: Programación del termociclador para la técnica PCR RFLP utilizada

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador marca Labnet International presente en el Laboratorio de Biología Molecular de la estación experimental Marcos Juárez y otro de marca Applied Biosystems presente en el Laboratorio de Biotecnología de Soja de la misma estación experimental. Las amplificaciones fueron constatadas en geles de agarosa al 1% antes de pasar a la siguiente etapa de la técnica. La enzima endonucleasa seleccionada para realizar la digestión del segmento de 812 pb amplificado por PCR fue HinfI que reconoce la siguiente secuencia: G^AANTC (Promega, Madison, USA). El producto de PCR obtenido se incubó con la enzima durante dos horas en baño térmico a 37°C. Posteriormente los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (corrida a 65 W) en el cual se pudo visualizar y contabilizar material genético correspondiente a las distintas especies. En *H. zea* no ocurre digestión alguna por lo que se visualiza un segmento de 812 pb. Por el contrario, esta enzima encuentra sitios de restricción en las especies restantes visualizándose dos segmentos de 638 y 174 pb para el caso de *H. gelotopoeon* y dos segmentos de 462 y 350 pb para *H. armigera* (Arneodo et al. 2015) como se observa en la Figura 2.5.

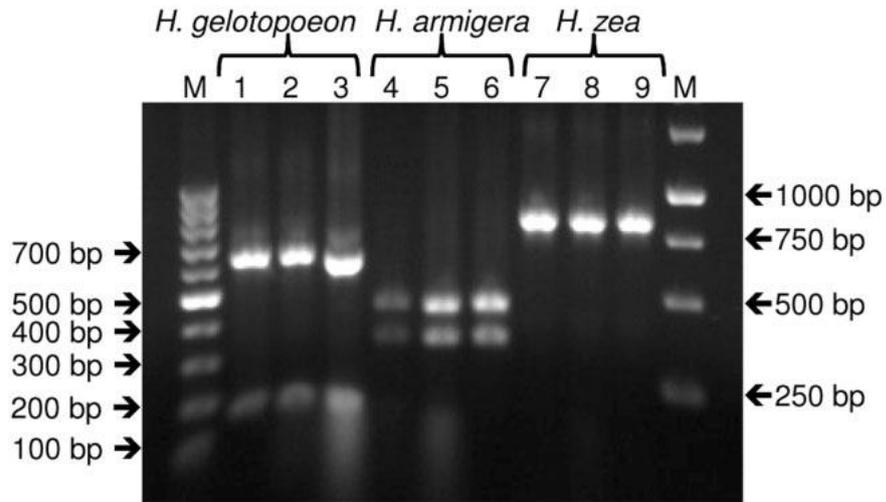


Figura 2.5: Productos obtenidos por la cadena en reacción de la polimerasa (PCR) y posterior digestión con la endonucleasa *HinfI* para las especies del género *Helicoverpa* analizados en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular. Líneas 1-3 *H. gelotopoeon*, líneas 4-6 *H. armigera*, líneas 7-9 *H. zea*.

A partir del análisis de los geles de agarosa obtenidos se registró la presencia de *H. zea*, *H. gelotopoeon* y *H. armigera* para cada muestra de adultos de cada localidad.

2.3.5 Similitudes genéticas:

Una vez identificadas mediante taxonomía clásica la variante “*H. stombleri*” y la especie *H. subflexa*, se analizaron las similitudes genéticas a partir de sus secuencias de ADN respecto de las de otros ejemplares del complejo *Heliothis - Helicoverpa* reportados en Argentina (Arneodo et al. 2015). La extracción de ADN fue realizada de forma orgánica a partir de una porción del abdomen de adultos machos bajo el protocolo CTAB (Doyle & Doyle 1987).

Seis muestras de cada especie fueron utilizadas para el análisis. Se amplificó un gen de la COI con los mismos iniciadores utilizados para la amplificación en la técnica de rápida identificación y de la forma en que fue explicado anteriormente (sección 2.3.4). Para *H. stombleri*, adicionalmente, se analizó la similitud con el resto de los *Heliothinae* a partir de la amplificación del gen nuclear factor de elongación 1 alfa cuyos cebadores diseñados fueron: HelicoEFaFw6 (5'-CGTCAACCAAAATGCC CTGG-3') y HelicoEFaRv6 (5'-GGCGTCACCAGACTTGATGG-3'). Las condiciones de amplificación fueron las listadas en la Figura 2.6. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit comercial ADN Puri-Prep-GP (INBIO, Tandil, Argentina).

Programación termociclador

95°C	5'	} 40 ciclos
95°C	30"	
53°C	30"	
72°C	45'	
72°C	2'	

Figura 2.6: Programación del termociclador para la amplificación del gen nuclear factor de elongación 1 alfa.

Los amplicones fueron secuenciados directamente y en ambos sentidos en un secuenciador ABI PRISM 3500 XL (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) en el CICVyA-INTA (Hurlingham, Argentina). Una vez obtenidas las secuencias, que fueron de alta calidad, las mismas fueron editadas con ayuda del software Chromas, el reverso complementario de la lectura reversa y el alineamiento de las secuencias fueron realizados con el programa MEGA 7.0. Los árboles de similitudes genéticas fueron confeccionados con el mismo programa bajo el método Neighbor joining.

Para la realización de árboles de similitudes genéticas, se utilizaron secuencias de genes de *H. zea* disponibles en Gen Bank de NCBI provenientes de Argentina (Arneodo et al. 2015; código acceso KY623664), Brasil (Mastrangelo et al. 2014; código acceso KF624903) y Estados Unidos (Cho et al. 1995; código de acceso U20136).

2.3.6 Análisis estadístico:

Los datos correspondientes a la frecuencia de cada especie del complejo por localidad fueron sometidos a análisis log-lineal para una distribución muestral de Poisson. La utilización de este modelo es frecuente para modelar el recuento de celdas en tablas de contingencia. Este modelo especifica cómo el recuento que hallamos en cada celda depende de los distintos niveles de las variables categóricas bajo análisis. El modelo log-lineal describe la asociación e interacción de una serie de variables categóricas entre sí que dan como resultado una frecuencia que resulta de la combinación de dichas variables (Agresti 1996). Se utilizó el programa SAS® 2018.

2.4 Resultados

2.4.1 Frecuencia de especies del género *Helicoverpa* en los distintos ambientes evaluados

Los adultos del complejo de orugas bolilleras capturados en trampas de luz se presentaron en proporciones diferenciales en las localidades evaluadas de la región central. En Rafaela el 92% de los adultos capturados correspondieron a la especie *H. zea*. El 8% restante fueron adultos de la especie *H. gelotopoeon*. No se hallaron en esta localidad adultos de la especie *H. armigera* (Figura 2.7). El área circundante a la trampa de luz estaba compuesta de vegetación natural, pasturas implantadas de alfalfa, cultivos de soja y maíz.

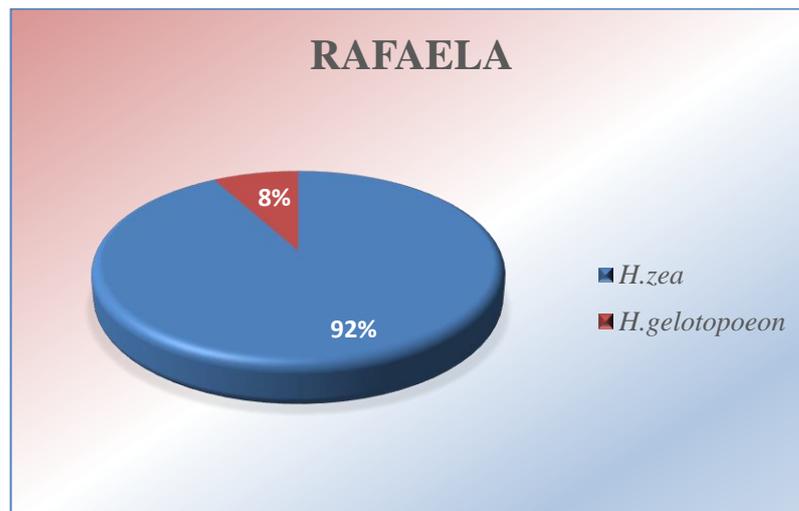


Figura 2.7: Proporción de especies del género *Helicoverpa* en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampa de luz en la localidad de Rafaela.

En la localidad de Marcos Juárez se colectaron en trampa de luz las tres especies del género *Helicoverpa*: *H. zea*, *H. gelotopoeon* y *H. armigera*. La mayor proporción de adultos pertenecieron a la especie *H. zea* (66%). Los individuos de la especie *H. armigera* fueron encontrados en una proporción baja respecto a las restantes especies (4%). Sin embargo, este resultado ratifica que la especie se encuentra presente en la localidad en años subsiguientes a su primera detección. La especie *H. gelotopoeon* representó un 30% de la población muestreada (Figura 2.8). El paisaje de la zona de influencia se encontró dominado por grandes extensiones de cultivos de soja y maíz.

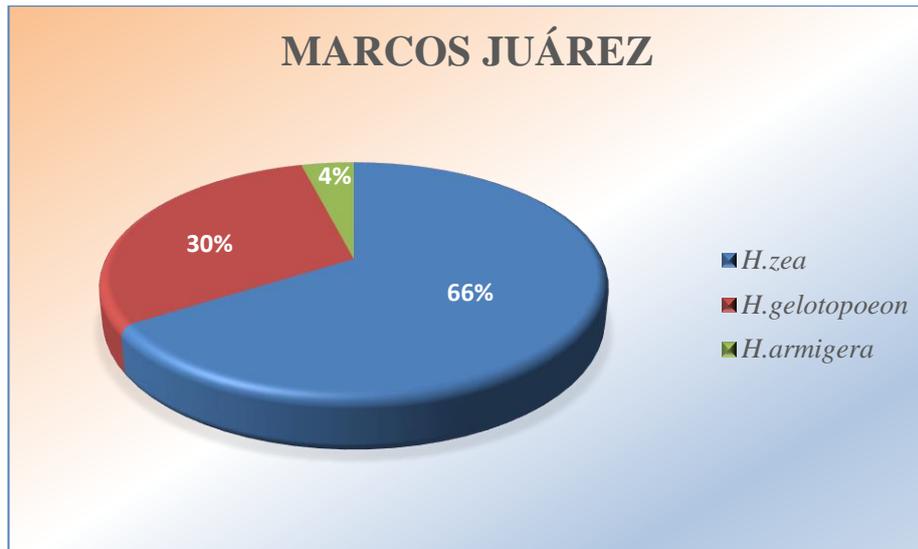


Figura 2.8: Proporción de cada especie del género *Helicoverpa* en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampas de luz en la localidad de Marcos Juárez.

Como resultado de la técnica de PCR-RFLP aplicada se obtuvieron geles de agarosa en los cuales se observaron las tres especies presentes de manera simultánea (Figura 2.9).

En la localidad de Manfredi la mayor proporción de las muestras colectadas correspondió a la especie *H. zea* (76%) al igual que en la localidad de Marcos Juárez, incluso en una proporción mayor en detrimento de las restantes especies. Fue hallada la especie *H. armigera* en una proporción también baja (2%). La especie *H. gelotopoeon* representó el 22% de la muestra colectada (Figura 2.10). El paisaje se encontró dominado por cultivos extensivos, principalmente de soja y maíz.

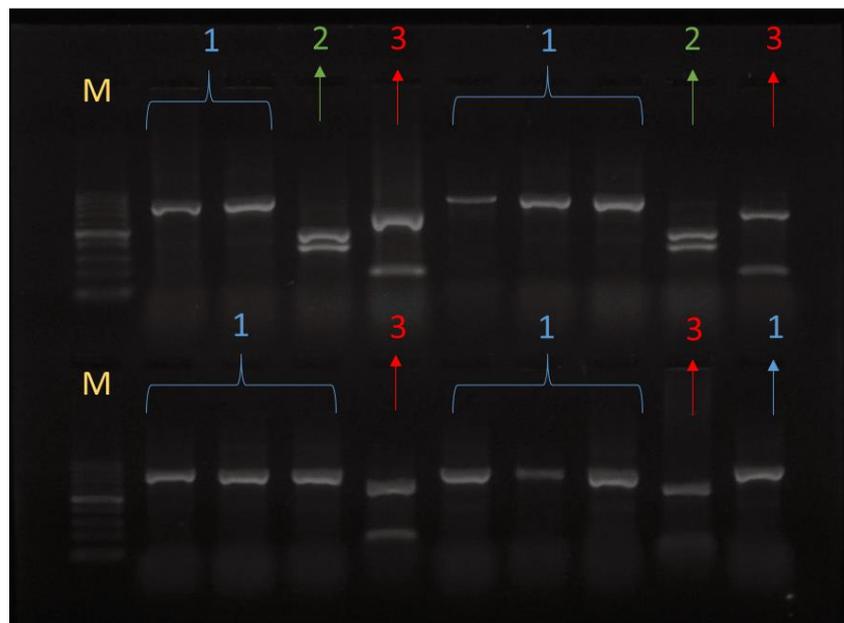


Figura 2.9: Productos de PCR digeridos con la enzima *HinfI* analizados en un gel de agarosa al 1% en el cual se observan las tres especies colectadas en trampas de luz en la localidad de Marcos Juárez. M:

Marcador de peso molecular 100-1000 pb, Muestras 1 (azules): *H. zea*, Muestras 2 (verdes): *H. armigera*, Muestras 3 (rojas): *H. gelotopoeon*.

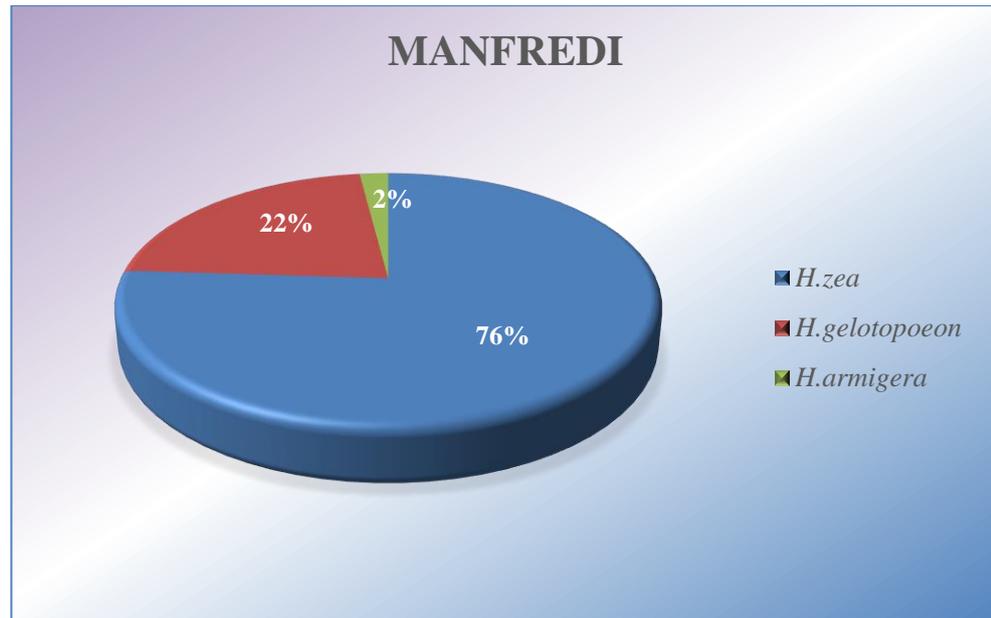


Figura 2.10: Proporción de cada especie del género *Helicoverpa* en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampa de luz en la localidad de Manfredi.

En la localidad de Laboulaye las especies colectadas en trampa de luz fueron *H. zea* y *H. gelotopoeon*, la primera en mayor proporción (86%) siguiendo la tendencia observada en las localidades anteriormente mencionadas. En el muestreo correspondiente a esta localidad no fue hallada la especie *H. armigera* (Figura 2.11). El paisaje en esta localidad se encontró más fragmentado, los cultivos dominantes fueron soja y maíz, con presencia de malezas en los lotes, las extensiones no son de la magnitud de las localidades anteriores. Se hallaron presentes pasturas de alfalfa, gramíneas y pastizales naturales para la alimentación de ganado bovino.

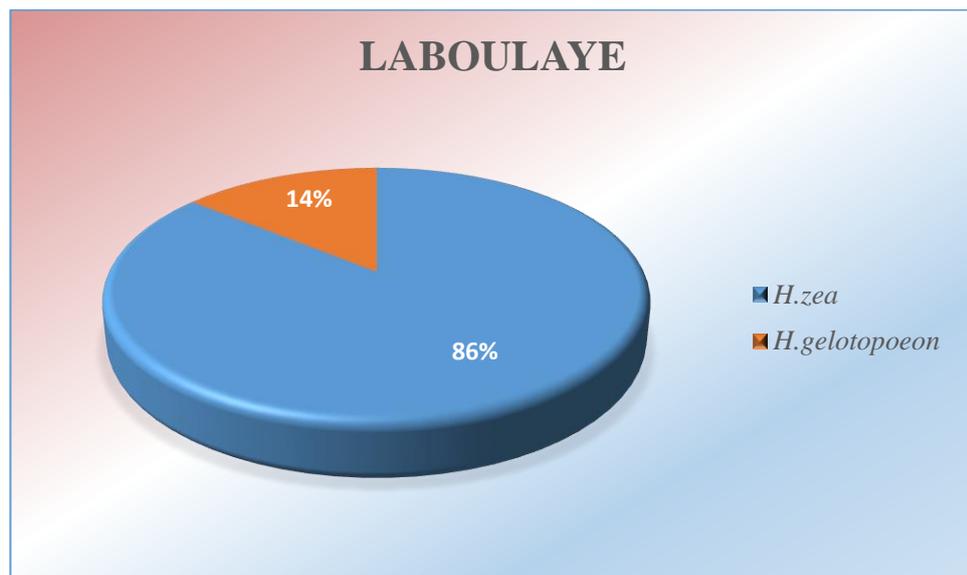


Figura 2.11: Proporción de cada especie del género *Helicoverpa* en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampa de luz en la localidad de Laboulaye.

En Pergamino casi la totalidad de los adultos capturados pertenecieron a la especie *H. zea* (96%). *H. gelotopoeon* y *H. armigera* también se encontraron formando parte del complejo, pero lo hicieron con una baja representación (2% cada una). El resultado se observa en la Figura 2.12.



Figura 2.12: Proporción de cada especie del género *Helicoverpa* en muestras colectadas mediante la captura de adultos en trampa de luz en la localidad de Pergamino.

En las localidades relevadas de la región centro para las épocas en que se realizaron los muestreos la especie *H. zea* fue encontrada en mayor proporción representando en todos los casos más del 65% de los individuos colectados en trampas de luz. La especie *H. gelotopoeon* representó la mayor parte del remanente y alcanzó la mayor proporción en Marcos Juárez representando un 30% de la muestra. La especie *H. armigera* se halló representada en las localidades Marcos Juárez, Manfredi y Pergamino.

Al realizar el estudio de varianza de verosimilitud máxima mediante un análisis loglineal con un modelo saturado para las variables localidad (incluye el efecto del periodo de muestreo) y especie en las cuales ambas son tomadas como variables respuesta, observamos que la localidad no tiene efectos significativos y la especie es el factor determinante. Sin embargo, se observa que la interacción es significativa ($Pr > \text{Chisq} < 0.05$), por lo cual el efecto principal de cada variable debiera tomarse con precaución y ser analizada considerando que existe interacción entre ellas. Considerando el análisis de verosimilitud máxima, la especie es la variable de mayor peso y la frecuencia de cada especie se encuentra condicionada por la localidad (y periodo de muestreo) bajo estudio (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Análisis estadístico de varianza de verosimilitud máxima para las muestras de *Helicoverpa* obtenidas en cinco localidades de la región central de Argentina

Análisis de varianza de verosimilitud máxima			
Origen	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
localidad	4	5.37	0.2514
especie	2	87.76	< 0.0001
localidad*especie	6	15.12	0.0194
Ratio de verosimilitud	0	.	.

2.4.2 Otras especies pertenecientes a la subfamilia Heliothinae encontradas en trampas de luz de la región centro: Caracteres que permiten su identificación

La especie *Heliothis subflexa* y la variante *Heliothis stombleri* se encuentran muy emparentadas con las otras especies del complejo. La primera puede ser distinguida en el estado adulto por su morfología externa debido a que presenta en su patrón alar un diseño característico con líneas oblicuas (Figura 2.13).

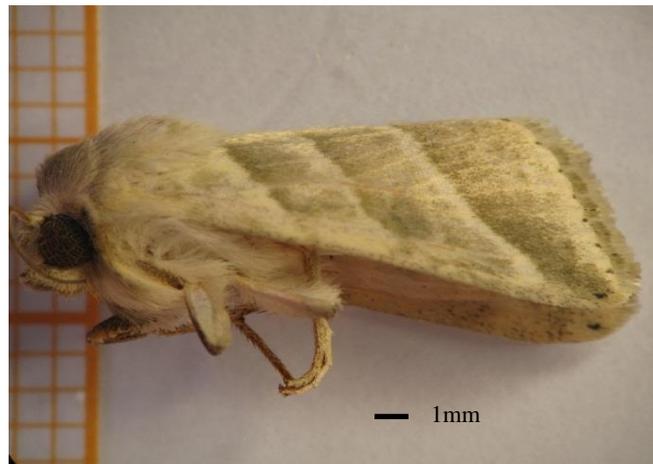


Figura 2.13: Aspecto morfológico externo de un adulto de *H. subflexa*.

H. stombleri es idéntica en su morfología externa a la especie *H. zea* y es considerada por algunos autores una aberración genitálica de la misma. La forma de detectarla es mediante la observación de la genitalia bajo lupa estereoscópica y aplicación de claves taxonómicas, ya que la técnica de PCR-RFLP disponible en la actualidad no permite diferenciarla. Al descubrir la presencia de esta supuesta aberración en las muestras colectadas en la localidad de Marcos Juárez se procedió a realizar un análisis de muestras conservadas en freezer de la campaña anterior a fin de conocer en qué proporciones se presenta esta condición en polillas de la región centro. Se observaron principalmente las valvas y el edeago. Las valvas de *H. zea* presentan un ápice de mayor ancho y de forma redondeada y el edeago contiene una serie de pelos ubicados en grupos en la parte exterior de la vesícula seminal denominados cornuti en número de 15 a 21, con una moda de 18. Cuando la vesícula seminal es insuflada con alcohol mediante una

jeringa aparecen tres lóbulos en la base de la misma que son característicos de esta especie (Figura 2.14)

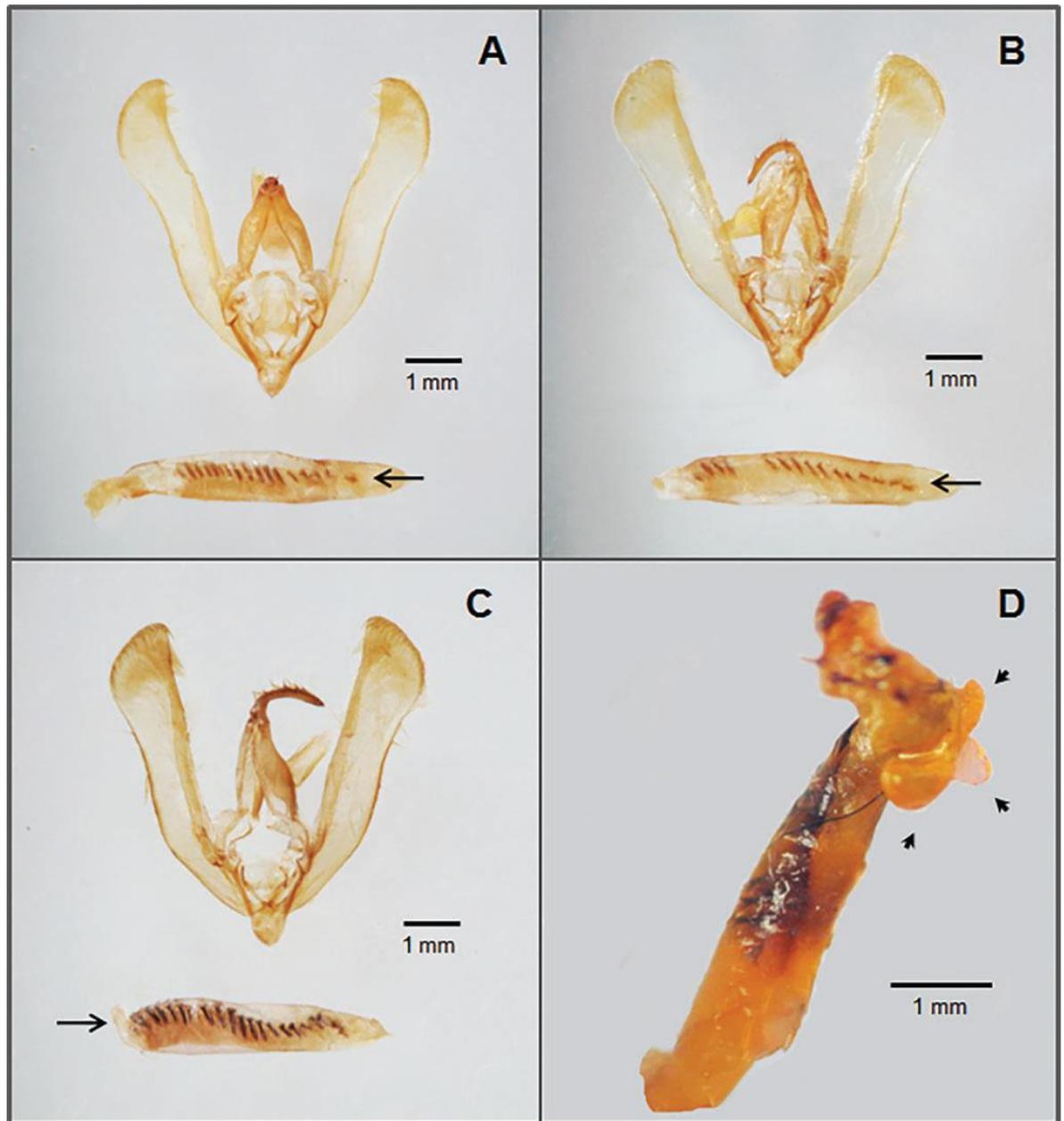


Figura 2.14: Genitalia masculina de *H. zea*. (A) Valva y falo con 17 cornuti. (B) Valva y falo con 15 cornuti. (C) Valvas y falo con 21 cornuti. (D) Vesícula seminal insuflada y lóbulos en su base.

La genitalia aberrante de *H. stombleri* se compone de valvas de un ancho de base similar pero con un ápice más aguzado. El falo tiene menor longitud y no posee cornuti. Presenta a su vez una constricción cercana a uno de sus extremos. Al ser insuflado, la vesícula seminal no puede ser evertida y aparecen en el extremo del mismo tres lóbulos pequeños (Figura 2.15).



Figura 2.15: Genitalia masculina de *H. stombleri*. (A) Valvas. (B) Fallo. (C) Fallo con vesícula insuflada con alcohol y lóbulos en su extremo.

En el presente trabajo se detectó la presencia de *H. subflexa* que también forma parte del complejo *Heliothis - Helicoverpa*. Debido a esto se destacan también los caracteres de la genitalia masculina de *H. subflexa*, ya que, al ser una especie que no se encuentra citada para la región centro, la ilustración de los mismos supone un aporte útil para su identificación. El fallo de *H. subflexa* no posee cornuti ni constricciones en toda su extensión. Las valvas son de un largo similar a las restantes especies del complejo (entre 4 y 5 mm) pero presentan un ápice característico en forma de cuchara y un angostamiento hacia la mitad de las mismas. El vértice inferior es en forma de “V” en lugar de ser en forma de “U” como en el resto de las especies del complejo (Figura 2.16).

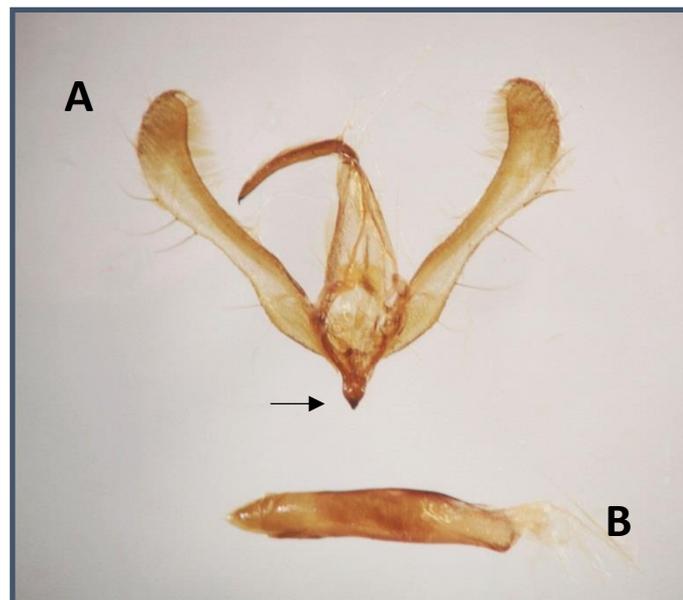


Figura 2.16: Genitalia masculina de *H. subflexa*. (A) Valvas. (B) Fallo. La flecha indica el vértice inferior de las valvas en forma de “V”.

La vaina del falo es lisa sin constricciones. Al insuflar el falo la vesícula seminal se evierte. La misma se observa débilmente espiralada con al menos tres giros (Figura 2.17).



Figura 2.17: Resultado de la insuflación de la vesícula seminal de *H. subflexa* con alcohol 70%.

La frecuencia de *H. subflexa* no fue registrada en el muestreo del presente estudio en otras localidades fuera de Marcos Juárez, ya que las colectas de las trampas de luz de distintas localidades fueron dirigidas a las tres principales especies del género *Helicoverpa*: *H. gelotopoeon*, *H. zea* y *H. armigera*. Los estudios de la caracterización morfo-genital, y los análisis genéticos que se relatan a continuación, se realizaron sobre individuos conservados en freezer proveniente de colectas de Marcos Juárez en la campaña 2015/16, como se detalla en la sección 2.3.2, no correspondiendo al muestreo planificado para el presente estudio. Se realizaron estudios observacionales sobre 193 adultos de Helothinae entre los cuales fueron detectados seis individuos de *H. subflexa*.

En el muestreo ampliado considerando el material proveniente de trampas de luz guardado en la estación INTA Marcos Juárez para los períodos anteriormente mencionados fue identificado un sólo individuo de *H. virescens*.

2.4.3 Posicionamiento de *H. stombleri* y *H. subflexa* dentro del complejo *Heliothis* - *Helicoverpa*.

Para analizar la similitud genética entre *H. stombleri* y el resto de las especies del complejo *Heliothis* - *Helicoverpa* se utilizaron las secuencias correspondientes a la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa del gen mitocondrial y al gen nuclear del factor de elongación 1-alfa. Las secuencias obtenidas fueron idénticas entre los 6 individuos analizados, tanto para el gen mitocondrial COI como para el gen nuclear (EF-1a). Considerando ambos genes, las secuencias analizadas agruparon claramente a *H. stombleri* con *H. zea*, mientras que el resto de las especies formaron agrupamientos separados, en todos los casos con altos valores de bootstrap. En el caso de las secuencias mitocondriales estas presentaron alta identidad nucleotídica con las secuencias de *H. zea* que se incluyeron en el análisis proviniendo las mismas de individuos colectados en localidades de Argentina distantes entre sí como son Rapelli en la provincia de Santiago del Estero (código de acceso KP984519) y

Hudson en la provincia de Buenos Aires (códigos de acceso KP984520 y KP984521) (Figura 2.18).

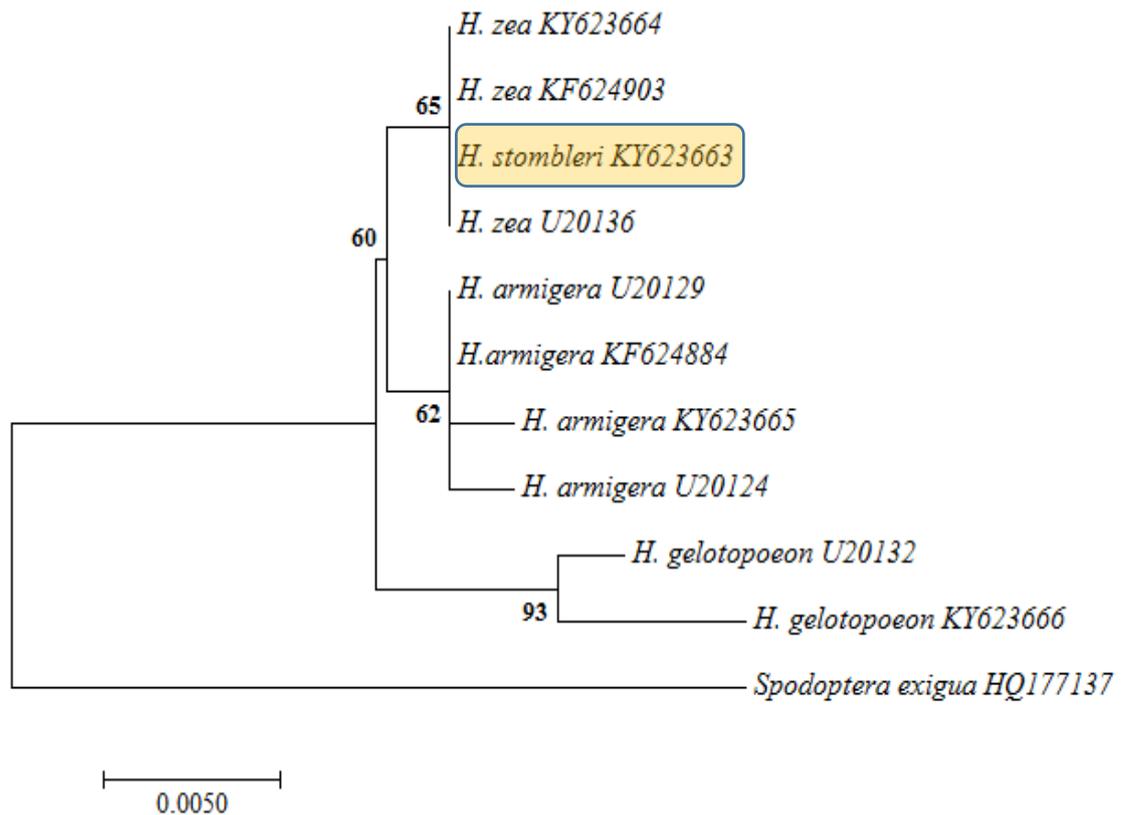


Figura 2.18: Análisis filogenético Neighbor joining para una región parcial de COI de las especies del género *Helicoverpa* reportadas en Arneodo et al. (2015) con incorporación de *H. stombleri*. *S. exigua* fue utilizada como outgroup.

Cuando se realizó la reconstrucción de las similitudes genéticas basada en las secuencias nucleares, *H. stombleri* también se agrupó con *H. zeae*. Las secuencias de *H. zeae* incluidas en el análisis provienen de Marcos Juárez, Córdoba (código de acceso KY623664), de Roraima, Brasil (código de acceso KF624903) y Misisipi, Estados Unidos (código de acceso U20136) (Figura 2.19).

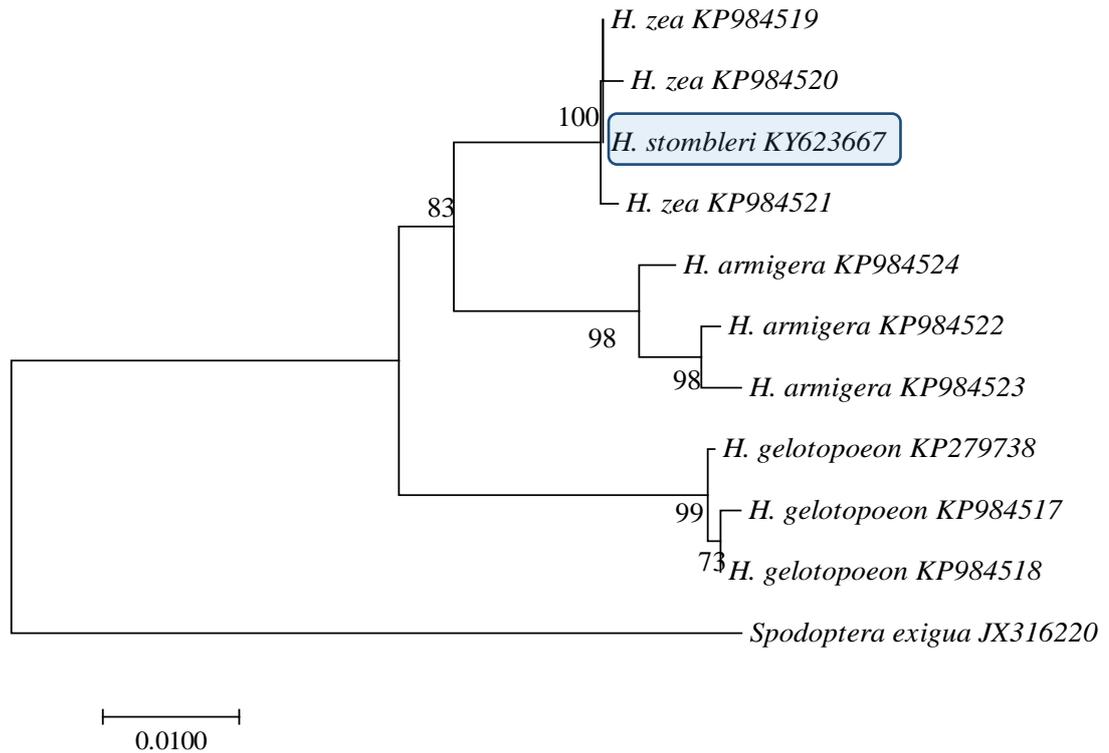


Figura 2.19: Análisis similitudes genéticas mediante el método Neighbor joining para una región parcial del gen *Elongation factor 1-alfa* para las especies del género *Helicoverpa* reportadas en Arneodo et al. (2015) con incorporación de *H. stombleri*. *S. exigua* fue utilizada como outgroup.

Para el análisis de la similitud genética de *H. subflexa* respecto a las especies del complejo *Heliothis - Helicoverpa* se utilizó el gen mitocondrial correspondiente a la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa. De cuatro muestras exitosamente secuenciadas se obtuvieron dos variantes genéticas, que se incorporaron al árbol de similitudes genéticas bajo la denominación *H. subflexa* 1 y *H. subflexa* 2 (Figura 2.20).

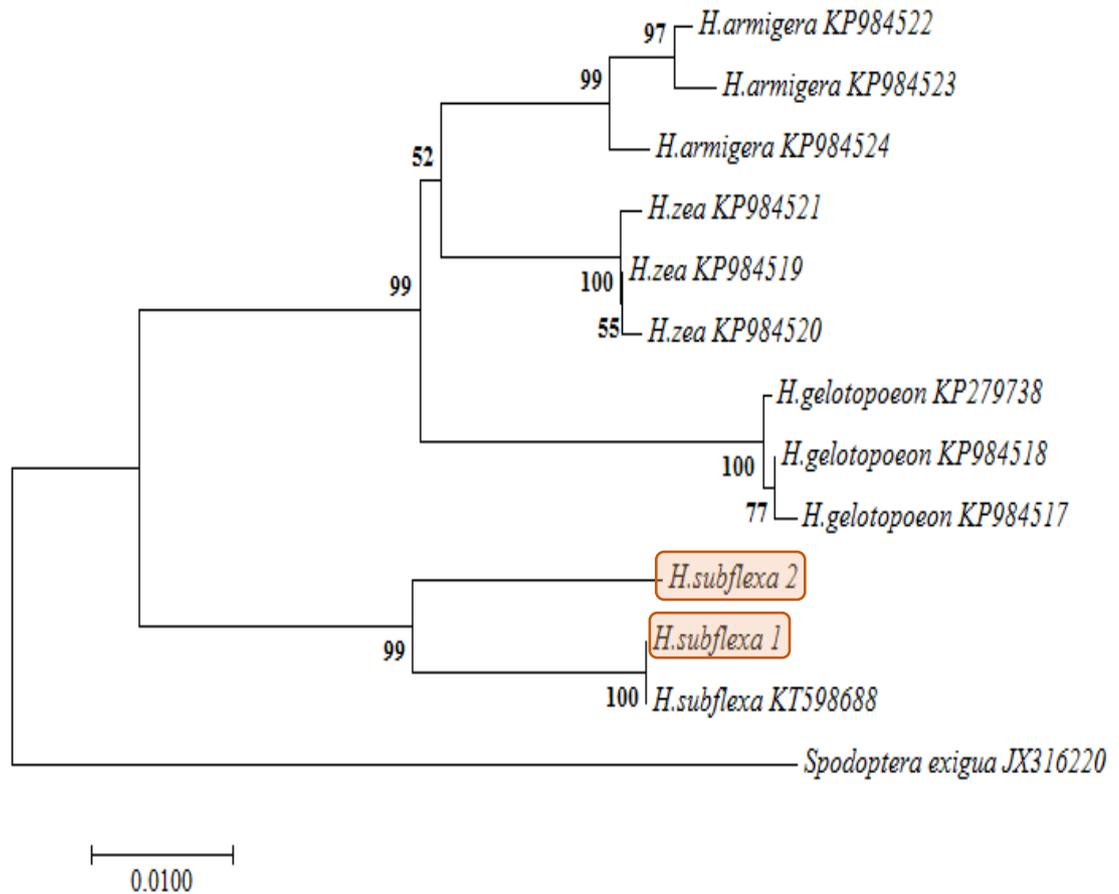


Figura 2.20: Análisis de similitudes genéticas mediante el método Neighbor joining para una región parcial del gen COI para las especies del género *Helicoverpa* reportadas en Arneodo et al. (2015) con incorporación de las muestras de *H. subflexa*, y una secuencia de referencia de esta especie extraída de NCBI. *S. exigua* fue utilizada como outgroup.

2.5 Discusión

Las colectas realizadas evidencian que en la actualidad el complejo *Heliiothis* – *Helicoverpa* en la región central de Argentina se compone fundamentalmente de tres especies del género *Helicoverpa*: *H. zea*, *H. gelotopoeon* y *H. armigera* y dos especies del género *Heliiothis* que fueron identificadas en una búsqueda ampliada aumentando el número de muestras en la localidad de Marcos Juárez: *H. virescens* y *H. subflexa*. También se encuentra formando parte de este complejo una especie sinónima de *H. zea* denominada *H. stombleri*.

En todas las localidades relevadas la especie de mayor frecuencia fue *H. zea*. Ésta es considerada la principal especie dentro del orden Lepidoptera que ataca el cultivo de maíz llegando en ciertos años a alcanzar infestaciones del 100% de espigas (Balbi y Flores 2015). Si bien es una especie polífaga, el hecho de que se encuentre *H. zea* en una gran proporción en el ambiente guardaría relación con la fuerte presencia del cultivo de maíz en la región centro de Argentina. En el mismo, las poblaciones de *H. zea* se incrementan significativamente en las sucesivas generaciones que se superponen a medida que avanza el verano (Navarro et al. 2009). Luego, en orden decreciente y para los años muestreados, se ubica *H. gelotopoeon*. Esta última se encuentra documentada en varios cultivos agrícolas de la zona y en malezas presentes como ser *Cardus* spp y *Amaranthus* spp. que se hallan ampliamente distribuidas en esta región. A partir de la segunda generación los ciclos poblacionales se suceden preferentemente en el cultivo de soja que ocupa una gran extensión en la región bajo estudio (Margheritis y Rizzo 1965; Navarro et al. 2009). En muy baja proporción fue hallada *H. armigera* detectada en las localidades de Marcos Juárez, Manfredi y Pergamino. La presencia de esta última especie en los cultivos implantados en la región será discutida en el capítulo siguiente. Sin embargo, la baja proporción en que se encontró esta especie en el relevamiento por trampas de luz de la región centro permite sospechar que la misma se encuentra alimentándose de plantas de presencia espontánea o esporádica, o en baja proporción sobre especies cultivadas. Arnemann et al. (2016) capturaron polillas de *H. armigera* en cultivos de soja mediante el uso de trampas de feromonas. La captura de *H. armigera* en trampas de luz, sin la presencia de un atrayente determinado, indica la presencia de la misma en el área circundante a aquella trampa sin saberse a ciencia cierta si se encuentra alimentándose de un cultivo en particular, de plantas cuya presencia es esporádica o si fue capturada durante su traslado de un área geográfica a otra. Su captura en trampas de luz confirma la presencia de esta especie en la región centro pero resta conocer la presencia de la misma sobre cultivos agrícolas de Argentina.

H. subflexa se halla presente en baja proporción, y fue detectada en un muestreo ampliado en la localidad de Marcos Juárez con el fin de conocer todas las especies de la subfamilia Heliiothinae que forman parte de este complejo en la región estudiada. Esta especie fue reportada en Argentina previamente por Bado et al. (2005), dañando cultivos experimentales de *Physalis peruviana* (Solanaceae) en ensayos llevados a cabo con fines de conocer la adaptabilidad de esta especie al clima de la ciudad de Buenos Aires y evaluar su potencial productivo. Recientemente fue reportada en Brasil en el mismo cultivo y en Méjico fue hallada también consumiendo frutos de *Physalis ixocarpa* (Campos de Melo et al. 2017; Pogue et al. 2013). La bibliografía internacional sugiere que *H. subflexa* es una especie monófaga ya que no se la ha hallado consumiendo especies fuera del género *Physalis* (Oppenheim y Gould 2002; Benda et al. 2011). Esta especie constituye la única de la subfamilia Heliiothinae con esa característica de las presentes en la región centro. Los análisis moleculares realizados confirman la presencia de *H.*

subflexa en la región central de nuestro país. Resta saber de cuáles especies herbáceas se está alimentando en esta región y qué implicancias tiene la presencia de esta plaga en la región centro de Argentina.

En 1969 Okumura y Bauer describieron lo que para ellos consistía una nueva especie de *Heliothis* hallada en California denominada *Heliothis stombleri*, basándose en una morfología genital que no se correspondía con ninguna de las especies del género descritas hasta el momento. Hardwick (1970) atribuyó esta característica a una aberración de la genitalia de *H. zea*, reconociéndola en muestras de distintas procedencias. En muestras de individuos adultos machos obtenidas de Argentina reportó esta anomalía en una proporción de 1:27. En el presente estudio, de 193 individuos examinados bajo lupa estereoscópica seis presentaron la genitalia aberrante, dando como resultado una frecuencia de 3,6 % que se asemeja a las proporciones obtenidas por Hardwick 47 años atrás. Los resultados obtenidos implican la presencia de esta anomalía, a través de más de cuatro décadas lo que abre un interrogante acerca de cuál es el mecanismo por el cual esta “aberración” genitálica se mantiene en una proporción similar luego de pasado casi medio siglo. En el presente estudio se realizó un análisis de similitud genética basado en el gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la enzima citocromo oxidasa y en el gen nuclear que codifica para el factor de elongación alfa. Se realizó una secuenciación de los fragmentos obtenidos y se los cotejó con las secuencias ya obtenidas utilizando los mismos cebadores para *H. zea*. El análisis de ambas secuencias corrobora que las muestras analizadas correspondían a la especie *H. zea*. Este estudio confirma mediante una corroboración molecular la hipótesis de Hardwick (1970) de que *H. stombleri* representa una “aberración” genitálica de *H. zea* pero no constituye en sí una nueva especie, sino una especie sinónima.

2.6 Conclusiones

- El complejo *Heliothis* – *Helicoverpa* en la región central de Argentina se encuentra compuesto por tres especies de gran importancia agronómica: *H. zea*, *H. gelotopoeon* y *H. armigera*. *H. subflexa* y *H. virescens* son otros miembros de la subfamilia Heliothinae de eventual presencia en la región.
- En cuanto al género *Helicoverpa*, las especies *H. zea* y *H. gelotopoeon* se hallaron en trampas de luz de todas las localidades relevadas. La especie *H. armigera* fue hallada en las localidades Manfredi, Marcos Juárez y Pergamino.
- En todos los casos *H. zea* fue la especie más abundante seguida por *H. gelotopoeon*. La especie *H. armigera* en los lugares en los cuales se halló representó una baja proporción de las muestras colectadas.
- La presencia de *H. subflexa* en la región central de Argentina fue confirmada molecularmente. Los caracteres morfológicos para distinguir a esta especie desde el punto de vista macroscópico y en base a la genitalia masculina sirven de guía para la ampliación de su reporte en otras localidades de nuestro país.
- En el análisis de similitudes genéticas, *H. stombleri* se agrupó con la especie *H. zea* cualquiera fuese el gen analizado, lo cual sugiere que la misma constituye una especie sinónima. Sin embargo, los caracteres morfológicos de la genitalia masculina difieren notablemente como fue ilustrado en el presente estudio.

CAPITULO 3

3.1 Introducción

3.1.1 Variaciones encontradas entre especies del género *Helicoverpa* en el grado de susceptibilidad a cultivos transgénicos Bt

Las bacterias gram positivas formadoras de esporos denominadas *Bacillus thuringiensis* (Bt) se encuentran presentes comúnmente en el suelo, los granos y el polvo. Son caracterizadas por su habilidad de formar cristales de inclusión parasporales durante su fase de esporulación. Esos cristales de inclusión contienen proteínas llamadas δ -endotoxinas que son conocidas mundialmente por sus propiedades insecticidas (Vachon et al. 2012). Las endotoxinas se clasifican en dos grupos, las proteínas cristalinas conocidas como “Cry” y las citotóxicas conocidas como “Cyt”. Más de 60 proteínas Cry diferentes y al menos 4 Cyt han sido aisladas en todo el mundo. El modelo básico de acción de estas proteínas insecticidas se basa en su ingestión junto con los tejidos de las plantas. Cuando un insecto sensible ingiere la toxina y ésta entra en contacto con el pH alcalino del sistema digestivo de los insectos se produce el clivaje de la molécula en otras más pequeñas que conduce a la activación de la toxina. Esta molécula activada se une a los receptores del tubo digestivo de los insectos, conduciendo a un proceso de formación de poros en la membrana de las células que causan la lisis de éstas y consecuente muerte del insecto. Las toxinas utilizadas en agroecosistemas se encuentran restringidas por su especificidad a un rango de especies plaga como lepidópteros, dípteros y coleópteros (Tabla 3.1) (Federici 1998).

Tabla 3.1: Espectro de control de los tipos de toxinas Bt mayormente utilizados

Tipo de toxina	Orden taxonómico de las plagas blanco
Cry1	Lepidoptera
Cry2	Lepidoptera
Vip	Lepidoptera
Cry3	Coleoptera
Cry4	Diptera
Cyt1	Diptera

En el año 1981 se logró clonar el primer gen Bt que derivó rápidamente en el desarrollo de la primera planta transgénica a mediados de los '80. De allí en más las compañías semilleras condujeron el desarrollo de numerosos cultivos que expresan genes derivados de *B. thuringiensis*, varios de los cuales resultaron productos comerciales y otros que no fueron exitosos (Federici 1998).

Los cultivos transgénicos desarrollados fueron acompañados de un plan de manejo de la resistencia de insectos para evitar el aumento de tolerancia de los individuos a la acción insecticida proporcionada por estas proteínas. El manejo de la resistencia se basa en la implementación de un sistema “alta dosis – refugio”. El concepto subyacente de este sistema consiste en que la mayor parte de los individuos resistentes raros que sobreviven

a cultivos Bt se apareen con los abundantes individuos susceptibles (SS) provenientes de plantas sin la toxina situadas en el refugio cercano a las plantas Bt. Asumiendo que la resistencia es recesiva (RR), la progenie resultante del apareamiento anterior, heterocigota para el carácter resistencia (RS), debe morir cuando se alimenta de un cultivo Bt, preservando así la susceptibilidad de la plaga a la toxina y retrasando la aparición de individuos resistentes (Huang et al. 2011; Siegfried et al. 2014).

El sistema alta dosis - refugio requiere de tres factores para tener éxito en el campo: la resistencia debe ser un carácter recesivo, los alelos resistentes deben estar en baja frecuencia en la población originaria y debe contarse con la presencia de áreas con plantas no Bt situadas en un refugio cercano a las plantas Bt (Tabashnik et al. 2013). Los modelos de simulación sugieren que cuando la resistencia no es recesiva, aumentar el área de refugio puede retrasar la aparición de la resistencia substancialmente. Si el carácter fuera determinado por un sólo locus con dos alelos (modelo simplificado) y con una frecuencia alélica de 0.001, la resistencia puede ser retrasada por más de 20 años con un porcentaje de refugio estructurado mayor a 5%, si el carácter resistencia fuera completamente recesivo, y con refugio mayor al 50% si fuera parcialmente dominante (Tabashnik et al. 2008). Los factores que garantizan el éxito de la estrategia basada en refugios son, además de la presencia efectiva de los refugios (áreas con cultivos no Bt) en la cantidad y proporción correspondiente, la herencia recesiva de la resistencia, la baja frecuencia de alelos resistentes en la población natural ($< 10^{-3}$), la reducción del “fitness” y la resistencia incompleta. La reducción en el “fitness” ocurre cuando los individuos resistentes presentan menores aptitudes biológicas para el crecimiento/desarrollo en comparación con los susceptibles, y la resistencia incompleta ocurre cuando aquellos individuos pueden desarrollarse completamente en una planta Bt pero presentan alguna característica que le crea una desventaja respecto a aquellos individuos susceptibles (Tabashnik et al. 2009).

El principal objetivo del monitoreo de la resistencia a toxinas Bt radica en su detección lo suficientemente antes de que esta se manifieste en el campo para establecer programas de manejo proactivos que permitan mitigar el incremento de la frecuencia de alelos resistentes. La relación entre la detección de la resistencia en laboratorio y su manifestación en el campo incluye diversos factores: la frecuencia de alelos resistentes en la población natural, la magnitud de la resistencia, la medida en que la resistencia aumenta la supervivencia de la plaga en el campo, el número y la distribución espacial de las poblaciones resistentes, la densidad poblacional en ese año y la disponibilidad de tácticas alternativas de control (Tabashnik et al. 2012).

Los cultivos Bt con mayor superficie en el mundo son los de algodón y de soja que expresan toxinas Cry1Ac y maíz que expresa Cry1Ab. Las proteínas Cry1A, luego de ser activadas dentro del sistema digestivo de los insectos, se unen a dominios de cadherinas, aminopeptidasas y fosfatasas alcalinas en las membranas de las células de las paredes intestinales del insecto, mediante receptores específicos para cada una de ellas. La disrupción de la unión con receptores de la membrana es el mecanismo de resistencia más frecuente desarrollado por los insectos. Mutaciones en los genes que codifican para las proteínas (principalmente cadherinas) que se unen a la toxina Cry1Ac son vinculadas a resistencia en varias especies de lepidópteros, pero se ha comprobado que en otros casos el desarrollo de la resistencia no se encuentra exclusivamente vinculada a esta característica (Tabashnik et al. 2011).

La medida más comúnmente utilizada para medir susceptibilidad de insectos a toxinas Bt es mediante exposición a la toxina purificada en dieta artificial y posterior recuento de mortalidad. La mayor parte de los estudios toman como parámetro de medida la LC₅₀ siendo la concentración de toxina que causa el 50% de mortalidad en una

población. Antes de la liberación al mercado de los primeros cultivos transgénicos desarrollados, Stone y Sims (1993) evaluaron la susceptibilidad de 14 poblaciones de *H. virescens* y *H. zea* a las toxinas derivadas de *B. thuringiensis* que luego fueron incorporadas a los cultivos de algodón y, muchos años después, a soja (Proteína Cry1Ac). La LC₅₀ de *H. virescens* varió entre 0,04 µg/ml (Carolina del Sur) y 0,32 µg/ml (Islas Vírgenes) representando esta última una dosis ocho veces superior que la población más susceptible. En el caso de *H. zea* esta diferencia fue aún mayor ya que la población de Florida presentó una LC₅₀ de 0,45 µg/ml y la de Arizona 7,4 µg/ml, lo que implica una susceptibilidad 16 veces menor de esta última población. Este estudio fue pionero en demostrar que la producción comercial de cultivos que expresan toxinas derivadas de *B. thuringiensis* debe ser acompañado de un programa de manejo de la resistencia apropiado para asegurar la eficacia de control de los cultivos Bt por un largo periodo de tiempo. Dos años después, Gould et al. (1995) reportaron para *H. virescens* un incremento de LC₅₀ 500 veces respecto del valor inicial tras 19 generaciones de exposición a la toxina en laboratorio. Estos mismos autores detectaron una población que presentaba resistencia también a las proteínas Cry1Ab y Cry1F (resistencia cruzada). En cuanto a *H. zea*, en poblaciones colectadas en cultivos de algodón de ocho estados de Estados Unidos durante 1992 – 1993, Luttrell et al. (1999) reportaron un aumento de resistencia de 100 veces luego de ocho generaciones de selección. Luego de 16 años de comercialización del primer cultivo Bt, 13 insectos plaga habían sido reportados como resistentes en diferentes países, de los cuales tres pertenecen al complejo bajo estudio (*H. zea*, *H. armigera* y *H. virescens*). El cultivo en el cual las poblaciones resistentes fueron detectadas es algodón y los países en los cuales se detectaron las poblaciones resistentes fueron Australia, China, México y Estados Unidos (Tabashnik et al. 2013).

Durante la campaña productiva 2013, productores de Brasil se vieron sorprendidos por un ataque de magnitud en gran parte de sus cultivos agrícolas principalmente en las regiones Norte, Nordeste y Centro-Sur del país. Los cultivos atacados fueron soja, algodón, maíz, poroto y tomate, expresando gran parte de ellos toxinas Bt. *H. zea* fue hallada dañando órganos reproductivos de algodón y maíz y *H. armigera* algodón y soja. Esta detección de individuos resistentes fue coincidente con el primer reporte de esta última en el vecino país (Ávila et al. 2013, Czepak et al. 2013). En Latinoamérica actualmente 10 países comercializan cultivos Bt de los cuales la mitad presentan registro de daños por algún tipo de plaga, y cuatro de ellos por lepidópteros del género *Helicoverpa*. *H. armigera* fue detectada en cultivos Bt de algodón, soja y maíz en Brasil (Ávila et al. 2013; Blanco et al. 2016), *H. zea* en maíz Bt en Argentina y Puerto Rico, y *H. gelatopoeon* en soja Bt en Uruguay (Blanco et al. 2016).

3.1.2 Situación de la problemática de resistencia a cultivos Bt en Argentina

El primer cultivo transgénico aprobado en Argentina fue el de soja tolerante al glifosato en 1996, coincidente con la aprobación del primer cultivo transgénico a nivel mundial. El segundo fue el cultivo de maíz capaz de expresar la proteína Cry1Ab en 1998. De allí en más la aprobación de eventos transgénicos fue sucediéndose en forma continua y constante. Hasta el corriente año se autorizaron 46 eventos (y combinaciones de eventos) que incluyen tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos o combinaciones de ambas en soja, maíz y algodón. Los últimos eventos aprobados para la comercialización incluyen también una variedad de papa resistente a un virus, uno de soja que produce alto contenido de aceite oleico, otro de soja con tolerancia a estrés hídrico, una variedad de cártamo que expresa pro-quimosina bovina y uno de alfalfa con tolerancia a glifosato y disminución en el contenido de lignina

(<https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/biotecnologia/ogm/>, ArgenBio 2018). Los materiales aprobados que incluyen eventos para el control de insectos se listan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Cultivos genéticamente modificados para el control de insectos con aprobación en Argentina

Cultivo	Característica introducida	Evento Bt/ Combinación	Proteína expresada	Año aprobación
Maíz	RL	176	Cry1Ab	1998
Algodón	RL	MON531	Cry1Ac	1998
Maíz	RL	MON810	Cry1Ab	1998
Maíz	RL	Bt11	Cry1Ab	2001
Maíz	RL+ TGI	TC1507	Cry1F	2005
Maíz	RL + TG	NK603 x MON810	Cry1Ab	2007
Maíz	RL + TG + TGI	1507 x NK603	Cry1F	2008
Algodón	RL + TG	MON 1445 x MON531	Cry1Ac	2009
Maíz	RL + TG	Bt11 x GA21	Cry1Ab	2009
Maíz	RL	MON89034	Cry1A.105 y Cry2Ab	2010
Maíz	RC + TG	MON88017	Cry3Bb	2010
Maíz	RL + RC + TG	MON89034 x MON88017	Cry1A.105 Cry2Ab Cry3Bb	2010
Maíz	RL	MIR162	Vip3Aa20	2011
Maíz	RL + TG + TGI	Bt11xGA21xMIR162	Cry1Ab Vip3Aa20	2011
Maíz	RC	MIR604	Cry3A	2012
Maíz	RL + RC + TG + TGI	Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 *	Cry1Ab Vip3Aa20 Cry3A	2012
Maíz	RL TG TGL	MON89034 x TC1507 x NK603	Cry1A.105 y Cry2Ab Cry1F	2012
Maíz	RL + TG	MON89034 x NK603	CryA.105 y Cry2Ab	2012
Soja	RL + TG	MON87701 X MON89788	Cry1Ac	2012
Maíz	RL + TG + TGI	TC1507 x MON810 x NK603	Cry1F Cry1Ab	2013
		TC1507 x MON810		
Maíz	RL + TG + TGI	Bt11 x MIR162 x TC1507 x GA21 *	Cry1Ab Vip3Aa20 Cry1F	2014

Maíz	RL + TG + TGI	TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 *	Cry1F Cry1Ab Vip3Aa20	2016
Maíz	RL + TG + TGI	TC1507 x MON89034 x MIR162 x NK603 *	Cry1A.105 y Cry2Ab Cry1F Vip3Aa20	2016
Maíz	RL+ TG + TGI + T 2,4-D T ariloxifenoxi	MON-89034-3 x MON-00603-6 MON-00603-6 *	Cry 1 A.105 Cry 2Ab Cry1Fa2	2018
Maíz	RL + RC + TG + TGI	SYN-05307-1 y SYN-BT011-1xSYN-IR162-4xSYN-IR604-5xDAS-01507-1xSYN-05307-1xMON-00021-9 *	Cry 1Ab Vip3A20 Cry1Fa2 mcry3A	2018

RL: Resistencia a insectos lepidópteros; RC: resistencia a insectos coleópteros; TG: tolerancia al herbicida glifosato; TGI: Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio; T 2,4-D: Tolerancia al herbicida 2,4-D; T ariloxifenoxi: tolerancia a los herbicidas del grupo ariloxifenoxi.

La superficie total de cultivos transgénicos implantados en nuestro país en 2015 fue 24,49 millones de hectáreas y en 2016 fue levemente menor (23,81 millones de hectáreas). Con estos valores Argentina mantiene su lugar como tercer productor mundial de cultivos transgénicos luego de Estados Unidos y Brasil, representando el 13% de la superficie implantada con cultivos genéticamente modificados a nivel mundial. En 2016, 18,7 millones de hectáreas fueron implantadas con soja transgénica, de la cual el 13% (2,52 millones) contenía el evento MON 87701 (Tabla 3.2) para el control de lepidópteros. El área implantada con maíz transgénico fue 4,74 millones de hectáreas de las cuales el 87% de los materiales contenía algún tipo de evento relacionado al control de insectos. La superficie implantada con algodón fue 0,38 millones de hectáreas de las cuales el 38% contenía algún evento para el control de lepidópteros (ISAAA 2016).

El cultivo de maíz presenta actualmente el mayor desafío en cuanto al control de lepidópteros de la subfamilia Heliothinae, registrándose en la mayoría de los eventos niveles de daño variables según la toxina incorporada. La plaga blanco de la tecnología es *H. zea*, que junto con *S. frugiperda* y *Diatraea saccharalis* han atraído la atención y el esfuerzo de las empresas para lograr el evento (o el apilamiento de eventos) que controle estas plagas en forma eficiente. Numerosos técnicos e investigadores aseguran que en los años en los que la densidad poblacional de *H. zea* es alta, los niveles de infestación a campo son importantes, llegando incluso al 100% de espigas afectadas en los eventos más antiguos. Esta plaga trae la complejidad adicional que es de muy difícil control con insecticidas químicos de contacto ya que las larvas se ubican dentro de la espiga, debajo de la chala y la accesibilidad de los productos es muy baja. Además, el equipamiento para aplicar un cultivo con esa altura es limitado. En un ensayo realizado en la EEA Marcos Juárez se observó que la mayor parte de los eventos comúnmente usados en la última década en la zona centro de producción no controlan efectivamente esta plaga y que el nivel de daño alcanzado no difiere estadísticamente de un maíz no Bt. Los eventos más modernos (Vt 3 Pro = Cry1A.105 + Cry2Ab + Cry3Bb y Víptera 2 = Vip3Aa20 + Cry1Ab) presentan un control más efectivo (Balbi y Flores 2015).

Los cultivos de soja y algodón Bt en Argentina no exhiben hasta el momento reportes de plagas resistentes pertenecientes al género *Helicoverpa*. La proporción de cultivos de soja y algodón Bt es menor a la implantada con maíz Bt. Si bien diez años atrás se estimaba un aumento de la proporción de cultivos Bt en forma exponencial, las estadísticas del periodo 2014 - 2016 demuestran que la proporción de cultivos Bt implantados en el país no aumentó (ISAAA 2016).

La soja INTACTA RR2PRO que contiene la proteína insecticida Cry1Ac es uno de los cultivos que lleva pocos años de comercialización en el país, y el de menor superficie cultivada. Para la campaña 2014/15 la superficie cultivada con esta variedad fue de 700 mil hectáreas, pero ya en la campaña siguiente la superficie sembrada fue mayor a dos millones de hectáreas y las expectativas de este cultivo Bt son de crecimiento (ISAAA 2016). Los materiales de maíz MG y Power Core que expresan toxinas Cry1Ab el primero y Cry1A.105, Cry2Ab, Cry1Fa2 el segundo, ya poseen reporte de daño por *H. zea* en campañas anteriores (Balbi y Flores 2015). Los materiales VT Triple Pro son frecuentemente sembrados en el área central y en el norte del país ya que presentan un buen comportamiento ante el ataque de la oruga cogollera (*S. frugiperda*) y la oruga de la espiga (*H. zea*). Sin embargo, ante infestaciones altas se reportaron daños en campañas anteriores. Los materiales que presentan proteínas derivadas de la fase virulenta de la bacteria *B. thuringiensis* denominadas “vip” son los de mejor comportamiento actual tanto ante la oruga cogollera como ante la oruga de la espiga, por lo cual la superficie cultivada con este tipo de materiales en fecha de siembra tardía creció rápidamente en los últimos años.

La dinámica de cultivos Bt en el país, las condiciones socio-económicas que determinen los costos de producción y la elección de uno u otro material determinarán el nivel de exposición de plagas del género *Helicoverpa* a las toxinas Bt en el futuro.

3.2 Objetivos del capítulo

3.2.1 Objetivo general

Caracterizar la composición en especies del género *Helicoverpa* en la zona núcleo maicera y sojera de Argentina a partir de larvas colectadas directamente de materiales Bt (distintos eventos) y no Bt.

3.2.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar la frecuencia de aparición de estadios inmaduros de las distintas especies en los cultivos de soja, maíz y alfalfa en cada localidad relevada aplicando la técnica molecular PCR-RFLP desarrollada para tal fin.
- 2) Registrar posibles diferencias en la frecuencia de aparición de las distintas especies del género *Helicoverpa* en materiales que expresan distintas toxinas con propiedades insecticidas (Cry 1Ac, Cry 1 Ab, Cry1A.105, Cry 2Ab, Cry1Fa2, Vip3Aa20).

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Área bajo estudio

El estudio se llevó a cabo en la región productiva núcleo de Argentina incluyendo sitios de muestreo en las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires, las cuales registran las mayores producciones nacionales de soja y maíz y abarca zonas de producción tambera en las cuales el insumo base de alimentación del ganado es la alfalfa (Figura 3.1).

El muestreo se realizó en las mismas cinco localidades representativas de distintos agroecosistemas correspondientes a la zona núcleo en las cuales se capturaron individuos adultos mediante trampas de luz: Rafaela, Pergamino, Laboulaye, Marcos Juárez y Manfredi.

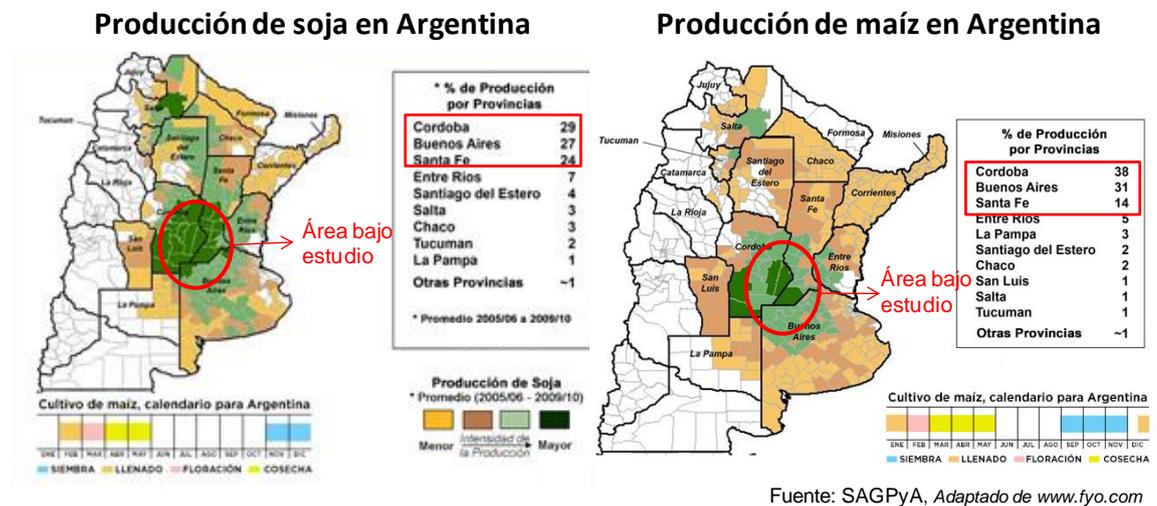


Figura 3.1: Áreas de producción nacional de soja y maíz.

3.3.2 Recolección del material biológico y conservación

Para la caracterización del complejo de especies de *Helicoverpa* en estado larval, en cultivos transgénicos Bt y no Bt, se colectaron individuos lotes de producción de soja, maíz y alfalfa. En el caso de soja y maíz se muestrearon lotes con variedades e híbridos transgénicos que expresan proteínas derivadas de *B. thuringiensis* para el control de lepidópteros y lotes con variedades e híbridos no Bt. Los materiales transgénicos Bt evaluados se detallan a continuación (Tabla 3.3):

Tabla 3.3: Materiales transgénicos para el control de lepidópteros muestreados

Soja	Proteína insecticida expresada	Aprobación en Argentina
INTACTA RR2PRO	Cry 1 Ac	2012
Maíz		
MG	Cry1Ab	2007

VT Triple pro	Cry1A.105, Cry2Ab, Cry3Bb1	2010
Viptera	Vip3Aa20	2011
Power Core	Cry1A.105, Cry2Ab, Cry1Fa2	2012

La elección de la técnica de muestreo depende de los objetivos planteados en el estudio y los recursos disponibles (Lowe et al. 2004). Dentro de las técnicas empleadas en la recolección y monitoreo de plagas agrícolas encontramos la observación directa y colecta manual, muestreo con paño horizontal, paño vertical y redes de barrido (Twine y Evans 1991). La observación directa y colecta manual proporciona más información por individuo (ubicación en el cultivo, abundancia por planta) por lo cual fue la técnica empleada para la recolección de larvas en el caso de los materiales de maíz Bt y no Bt. La soja fue examinada también por observación directa para detección de la plaga, pero la recolección fue realizada mediante el uso del paño vertical en los casos en que el follaje había cubierto el entresurco, ya que al ser una planta de follaje abundante, la observación directa luego de que cubrió el entresurco torna difícil y se corre el riesgo de detectar menos orugas.

En el cultivo de maíz se realizó un muestreo siguiendo dos transectas diagonales en forma de cruz en cada lote inspeccionándose la cantidad de espigas al azar que conformaran la cantidad de muestras necesarias. Cada transecta diagonal se recorrió hasta obtener 25 orugas de cualquier estadio larval. En materiales de mejor control las transectas fueron más largas y en materiales de bajo comportamiento ante las plagas del género y en el maíz no Bt las transectas fueron más cortas, incluso en algunos la infestación de los lotes fue del 100% por lo cual la transecta abarcó 25 plantas de forma diagonal, y en aquellos lotes en los cuales la infestación fue menor, la cantidad de espigas muestreadas fue mayor. En el caso de la soja se muestrearon brotes, hojas y vainas de 100 plantas de soja (50 por transecta diagonal) y en hasta 300 en lotes con baja infestación, y fueron realizadas estaciones de muestreo con paño vertical en número de 10 a 30 cuando la fenología de la planta superó el estadio V6. Para los muestreos en lotes de alfalfa se utilizó la red de barrido realizándose cinco golpes de red por estación de muestreo con un total de 20 a 50 estaciones de muestreo al azar por lote, según el nivel de infestación. Cada cultivo fue relevado en cinco localidades totalizando una cantidad de 40 lotes. Los cultivos de maíz fueron monitoreados durante el estado reproductivo y la colecta de larvas se realizó de 15 a 25 días después del inicio de la floración femenina. Sólo fueron visitados maíces de segunda fecha de siembra para cada localidad ya que estos son más propensos al ataque de orugas de la espiga del género *Helicoverpa*. Las colectas fueron realizadas en febrero de 2016 en todas las localidades. La cantidad de muestras obtenidas por lote se describen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Cantidad de muestras obtenidas en cada localidad según cultivo. Amplicones obtenidos a partir de cada set de muestras luego de aplicada la técnica de PCR.

Localidad	Lote	N° muestras	Amplicones
Rafaela	Maíz MG	50	41
	Maíz Power Core	50	41
	Maíz VT 3 Pro	50	49
	Viptera	-	-

	Maíz No Bt	50	46
	Soja Bt	-	-
	Soja No Bt	50	50
	Alfalfa	50	48
Manfredi	Maíz MG	50	50
	Maíz Power Core	50	44
	Maíz VT 3 Pro	50	45
	Viptera	-	-
	Maíz No Bt	50	39
	Soja Bt	-	-
	Soja No Bt	50	50
	Alfalfa	50	50
Marcos Juárez	Maíz MG	50	50
	Maíz Power Core	50	50
	Maíz VT 3 Pro	50	50
	Viptera	-	-
	Maíz No Bt	50	42
	Soja Bt	-	-
	Soja No Bt	50	50
	Alfalfa	50	50
Laboulaye	Maíz MG	50	40
	Maíz Power Core	50	50
	Maíz VT 3 Pro	50	50
	Viptera	-	-
	Maíz No Bt	50	30
	Soja Bt	-	-
	Soja No Bt	50	50
	Alfalfa	50	50
Pergamino	Maíz MG	50	28
	Maíz Power Core	50	50
	Maíz VT 3 Pro	50	50
	Viptera	-	-
	Maíz No Bt	50	50
	Soja Bt	-	-
	Soja No Bt	-	-
	Alfalfa	50	50
	Total	1450	1343

Cada individuo colectado fue colocado en un microtubo de 1,5 ml y conservado en frío durante el traslado. La conservación posterior se realizó en freezer a -20°C hasta el momento de su procesamiento. En maíces Viptera y sojas Bt no se hallaron orugas.

En el momento de extracción de ADN, se utilizó una porción correspondiente a los primeros segmentos abdominales. La porción no utilizada de cada insecto se conservó en microtubos individuales a -20°C , para posteriores estudios o repeticiones de la técnica.

Los individuos colectados en cultivos transgénicos fueron acompañados por una porción de material vegetal sobre el cual se encontraron las larvas alimentándose con fines de determinar si efectivamente la planta expresaba la toxina Bt para el control de lepidópteros.

3.3.3 Extracción de ADN y aplicación de la técnica de rápida identificación de las muestras

Al igual que en la diferenciación de especies en polillas capturadas en trampas de luz se aplicó la técnica de PCR-RFLP previamente desarrollada (Arneodo et al. 2015). Esta técnica permite la detección de especies en todos los estadios de la vida de los insectos por lo cual es efectiva discriminando especies también en estadios inmaduros. La extracción del ADN de las larvas se realizó también orgánicamente mediante la técnica de CTAB (Doyle y Doyle 1987). Las extracciones y la aplicación de la técnica fueron realizadas en tandas de 15 a 25 individuos.

3.3.4 Detección de la toxina Bt en los materiales transgénicos con propiedades insecticidas

El análisis de la detección del gen Bt se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR en tiempo final del promotor 35 S del virus del mosaico de coliflor en 15 plantas de cada evento transgénico en el cual se encontraron larvas del género *Helicoverpa*. Este promotor es muy utilizado en ingeniería genética para la transformación de plantas (De Guglielmo et al. 2016) y al menos uno de los eventos transgénicos que expresan las proteínas Cry para los maíces Bt muestreados en este trabajo lo contienen, por lo cual se utilizó como indicador de transgénesis. Este análisis fue acompañado en paralelo con la amplificación en el mismo ciclo del gen endógeno de maíz que codifica para la producción de zeína. Se realizó posteriormente la determinación del gen específico que codifica para cada proteína insecticida expresada en los tres eventos analizados (MG, VT 3 Pro y Power Core) en el Laboratorio de Detección de OGM (Instituto de Biotecnología del INTA Castelar), mediante la técnica de PCR en tiempo real. En esta oportunidad se analizaron dos muestras de cada evento transgénico. Esto fue realizado para confirmar que la cantidad de semillas sin ser transgénicas no superara el límite permitido por INASE que es un 5% (consideradas semillas fuera de tipo) y para confirmar que las orugas halladas estaban consumiendo un material transgénico para el control de lepidópteros. Ningún lote muestreado presentaba la característica de refugio en bolsa.

3.4 Resultados

3.4.1 Frecuencia de aparición de estados inmaduros de las especies pertenecientes al género *Helicoverpa* en cultivos de maíz, soja y alfalfa de la región central de Argentina

La frecuencia de aparición de larvas de las distintas especies, determinada mediante la técnica molecular varió en baja magnitud entre las localidades elegidas. Se colectaron 300 orugas por localidad, excepto en Pergamino, donde se capturaron 250, dando un total de 1450 individuos para procesar. Luego de la extracción de ADN total, la cantidad de muestras exitosamente amplificadas por PCR y analizadas por RFLP fue de 1343. La falta de amplificación de las muestras restantes pudo deberse a la degradación del ADN o baja calidad del mismo.

En todas las localidades la única especie encontrada en el cultivo de maíz (considerando tanto lotes Bt como no Bt) fue *H. zea*. En el cultivo de soja en Rafaela, la única especie presente fue *H. gelotopoeon*. En el cultivo de alfalfa de esta misma localidad fueron encontradas tanto *H. gelotopoeon* como *H. zea*, componiéndose la muestra de 98% de las orugas correspondientes a *H. gelotopoeon* y el 2% restante de la especie *H. zea* (Figura 3.2).

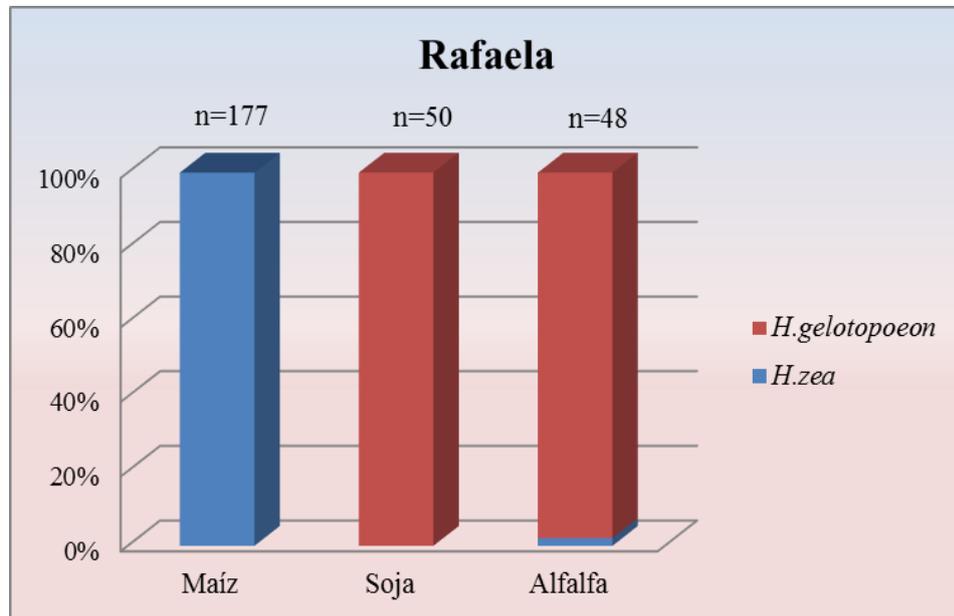


Figura 3.2: Proporción de especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Rafaela.

En Marcos Juárez en el cultivo de maíz se encontró solamente la especie *H. zea* pero en las leguminosas fueron identificadas las especies *H. gelotopoeon* y *H. zea*. En soja la composición de la muestra fue 96% *H. gelotopoeon* y 4% *H. zea* y en alfalfa la muestra se compuso de 98% *H. gelotopoeon* y 2% *H. zea* (Figura 3.3).

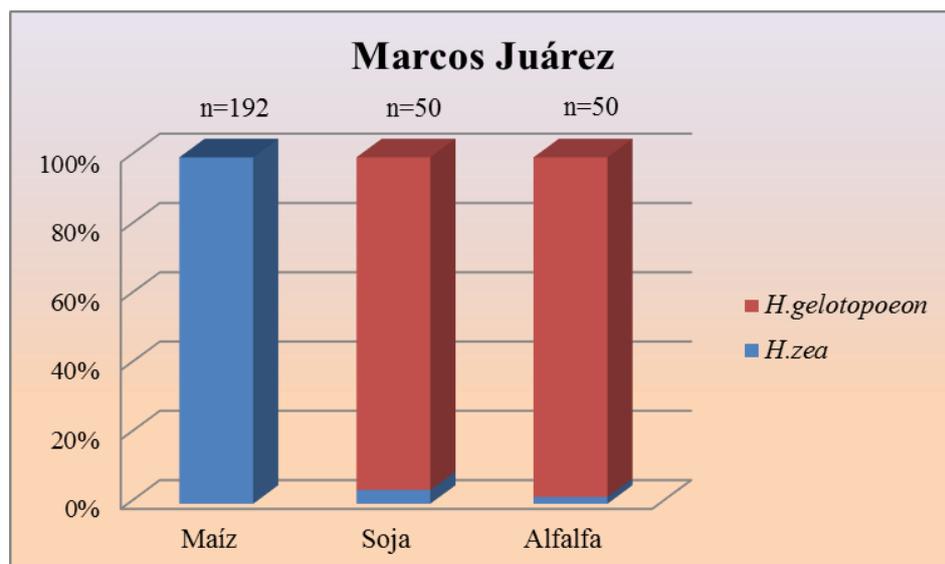


Figura 3.3: Proporción de especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Marcos Juárez.

En la Figura 3.4 se observa el patrón de restricción de muestras obtenidas de un cultivo de soja luego de la digestión del fragmento aplicado de la COI con la enzima HinfI. Se observan 14 muestras con una banda de ADN de 638 pb y otra de 174 pb correspondientes a *H. gelotopoeon* y una muestra con un solo fragmento (consecuente de no encontrar la enzima Hinf I sitios de restricción) de 812 pb propio de *H. zea*.

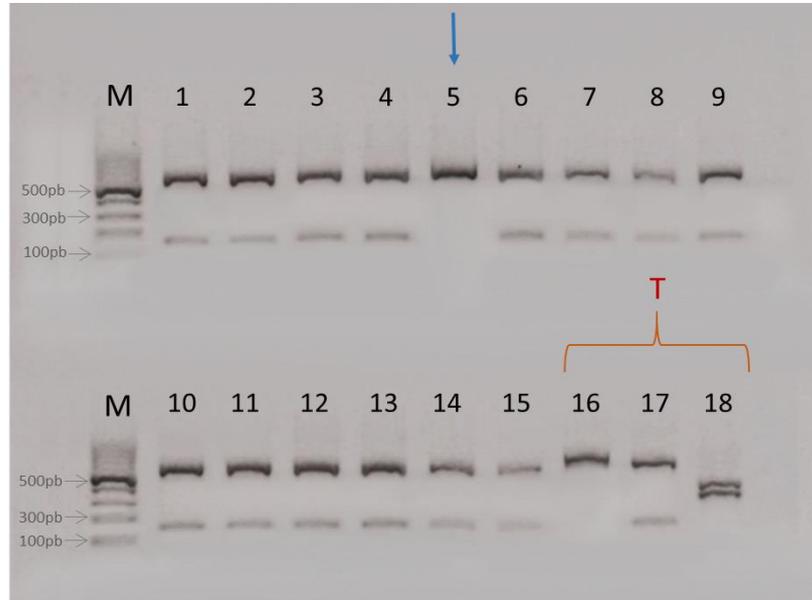


Figura 3.4: Análisis molecular en orugas extraídas del cultivo de soja para la localidad Marcos Juárez. M: Marcador de peso molecular. 1-4: *H. gelotopoeon* 5: *H. zea* 6-15: *H. gelotopoeon*. T: testigos morfológicos. 16: testigo *H. zea* 17: testigo *H. gelotopoeon* 18: testigo *H. armigera*.

Con respecto a los resultados del estudio realizado en las localidades Manfredi y Laboulaye se observó que *H. zea* fue la única especie presente en maíz y *H. gelotopoeon* la exclusiva de soja y alfalfa (Figuras 3.5 y 3.7).

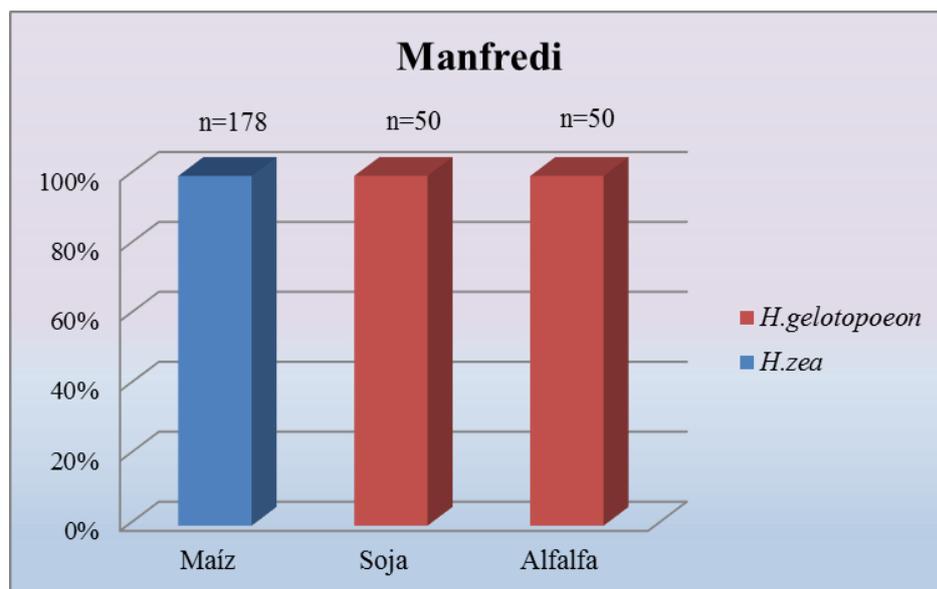


Figura 3.5: Especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Manfredi.

En la Figura 3.6 se observa un gel típico de muestras de alfalfa de la localidad de Manfredi resultante de la aplicación de la técnica de identificación molecular en el cual todas las muestras revelan los dos fragmentos correspondientes a la especie *H. gelotopoeon*.

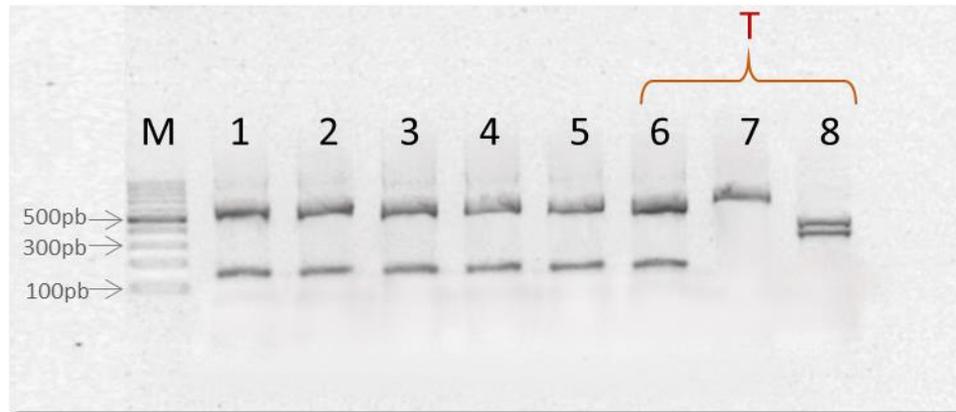


Figura 3.6: Gel de agarosa resultante de la técnica PCR-RFLP aplicada a orugas de alfalfa de la localidad Manfredi. M: marcador(100-1000pb) Muestras 1-5 *H. gelotopoeon*. T= testigos morfológicos: 6=*H. gelotopoeon*, 7=*H. zea*, 8=*H. armigera*.

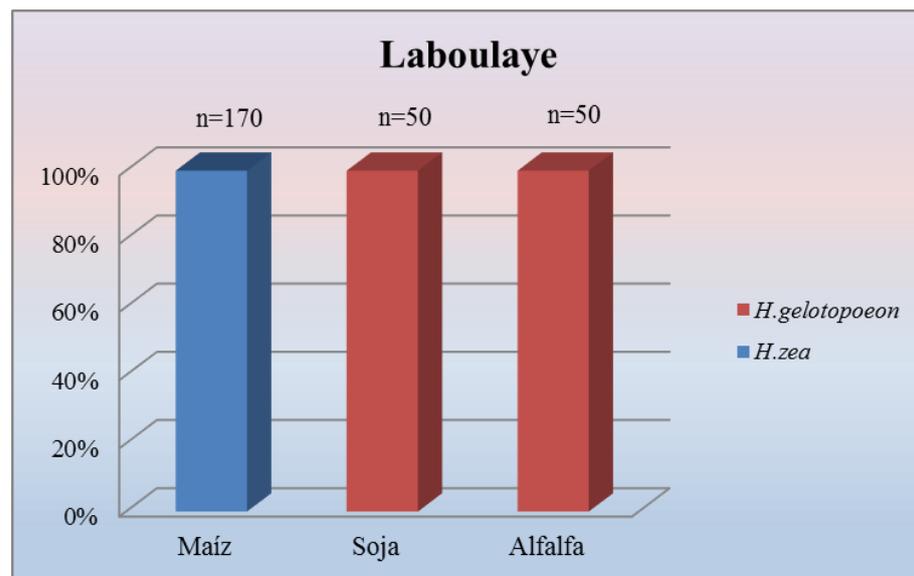


Figura 3.7: Especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Laboulaye.

En Pergamino la especie representativa de las bolilleras en el cultivo de maíz fue también *H. zea*. En el cultivo de soja no fue hallada ninguna de las especies pertenecientes al género *Helicoverpa* en los muestreos realizados. En el cultivo de alfalfa el 98% de la muestra se compuso de *H. gelotopoeon* y el 2% correspondió a *H. zea* (Figura 3.8)

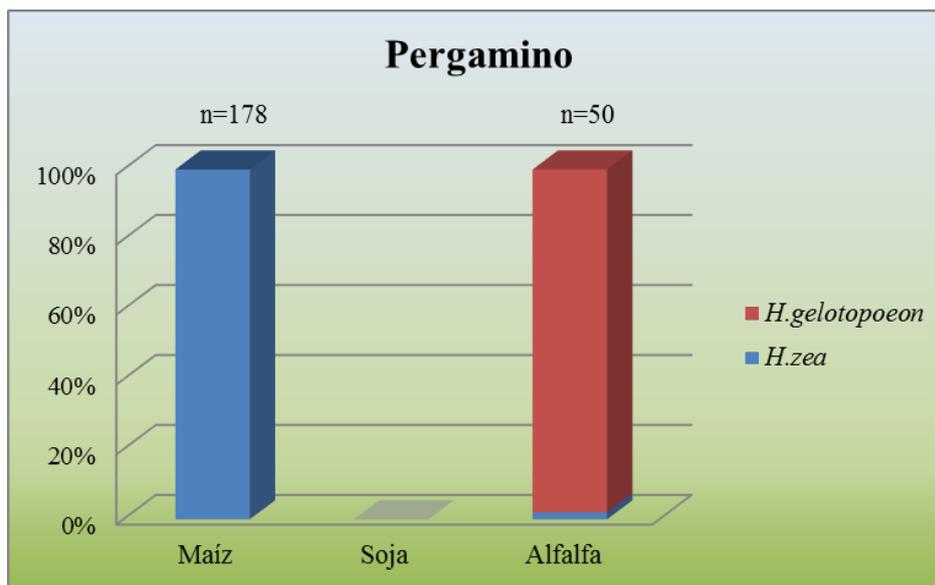


Figura 3.8: Proporción de especies del complejo de bolilleras encontradas en maíz, soja y alfalfa de la localidad Pergamino.

En ninguna de las muestras de orugas colectadas en cultivos de maíz, soja y alfalfa de las localidades evaluadas fue encontrada la especie *H. armigera*.

Al realizar el análisis de varianza de verosimilitud máxima mediante análisis loglineal con un modelo saturado para las variables localidad, cultivo y especie observamos que las interacciones localidad*especie, cultivo*especie y localidad*cultivo no son significativas ($Pr > \text{ChiSq} > 0.05$) (Tabla 3.5). Considerando esta apreciación, se realizó un nuevo análisis bajo un modelo de efectos principales.

Tabla 3.5: Análisis de la varianza de verosimilitud máxima con modelo saturado para las muestras de orugas colectadas en la región centro

Análisis de varianza de verosimilitud máxima			
Origen	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
especie	1	4.39	0.0361
localidad	4	3.41	0.4921
localidad*especie	4	3.79	0.4353
cultivo	5	41.1	< 0.0001
cultivo*especie	1	0.33	0.5652
localidad*cultivo	17	15.83	0.5361
Ratio de verosimilitud	0	.	.

En el modelo de efectos principales podemos observar que la variable localidad no es determinante ($pr > \text{ChiSq} = 0.7269$). Esto implica que orugas tanto *H. zea* como de *H. gelotopoeon* estuvieron representadas en todas las localidades evaluadas (Tabla 3.6).

Tabla 3.6: Análisis de la varianza de verosimilitud máxima con modelo de efectos principales para las muestras de orugas colectadas en la región centro

Origen	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
especie	1	66.08	< 0.0001
localidad	4	2.05	0.7269
cultivo	5	69.47	< 0.0001
Ratio de verosimilitud	22	19.5	0.6141

El cultivo y la especie manifestaron ser variables con efecto significativo en la distribución poblacional ($Pr > ChiSq < 0.00001$). Este resultado implica una asociación entre las variables que indica que la especie encontrada en cada cultivo varía conforme cuál sea el cultivo bajo estudio. Las estimaciones de parámetros y las pruebas para parámetros individuales se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Estimaciones de parámetros y pruebas de verosimilitud máxima para cada uno de ellos

Análisis de estimaciones de verosimilitud máxima					
Parámetro		Estimación	Error estándar	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
especie	<i>H. zea</i>	-18.325	0.2254	66.08	< 0.0001
localidad	Rafaela	-0.0618	0.0556	1.24	0.266
	Manfredi	0.0138	0.0542	0.07	0.7987
	Marcos Juárez	0.0578	0.0532	1.18	0.2772
	Laboulaye	-0.0118	0.0547	0.05	0.8295
cultivo	MaízMG	11.472	0.1613	50.6	< 0.0001
	MaízVT3	12.925	0.16	65.3	< 0.0001
	MaízPWC	12.550	0.1603	61.3	< 0.0001
	MaízNoBt	11.232	0.1615	48.36	< 0.0001
	Soja	-24.545	0.3066	64.1	< 0.0001

En cuanto a las muestras tomadas en cultivos transgénicos, en las cinco localidades fueron encontrados lotes que contenían todas las toxinas bajo evaluación en el presente estudio. Sin embargo, la ocurrencia de cultivos transgénicos en cada zona varió fuertemente dependiendo de la ubicación, calidad del suelo, potencial de rendimiento, actividad predominante (mayormente agrícola como Marcos Juárez y Manfredi, o zonas mixtas agrícolas-ganaderas como Pergamino, Laboulaye y Rafaela), cantidad de empresas presentes en la zona para la comercialización de los distintos eventos y costo de la semilla.

En todas las localidades relevadas fueron encontradas orugas atacando espigas de maíces transgénicos que expresan las toxinas Cry 1 Ab (evento MG), Cry1A.105 y Cry 2Ab (evento VT 3 Pro) y Cry1A.105, Cry 2Ab y Cry 1F (evento Power Core). Se incluyó la misma cantidad de orugas de cada lote para cada evento transgénico. Sin embargo, el nivel de infestación varió entre localidades y lotes. Se encontraron orugas del complejo en todos los lotes muestreados excepto en sojas INTACTA RR2PRO y en maíces Viptera.

Si bien la evaluación de los niveles de infestación no fue objetivo del presente estudio, cabe mencionar que el mismo varió entre los lotes muestreados. El cultivo de maíz no Bt fue el que presentó los mayores niveles de infestación y ésta fue muy variable según la tecnología del híbrido cuando se trató de lotes transgénicos Bt.

En todos los casos, la especie hallada en maíz fue *H. zea*. En cada fecha para una misma localidad, las orugas encontradas en eventos MG se correspondieron con el mismo estadio larval y similar tamaño a las orugas halladas en maíces no transgénicos para el control de lepidópteros. Las orugas halladas sobre VT 3 Pro presentaron el tamaño y desarrollo larval menor y las encontradas en eventos Power Core fueron de un tamaño intermedio.

El presente estudio también incluyó el muestreo de lotes de soja transgénica que expresa la toxina Cry 1Ac para el control de lepidópteros. En ninguna de las localidades se encontraron orugas del género *Helicoverpa* en soja Bt.

3.4.2 Detección del evento transgénico en plantas extraídas del campo con daño de orugas bolilleras del género *Helicoverpa*

Los resultados del análisis de la detección de genes Bt en cultivos transgénicos fue positiva en todos los casos. Tanto la detección realizada en el Laboratorio de detección de OGM del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar mediante la técnica de PCR en Tiempo Real (qPCR) como la realizada en el laboratorio de INTA Marcos Juárez por PCR Punto Final arrojaron que todas las muestras vegetales analizadas contenían el gen Bt que le daba la característica al híbrido.

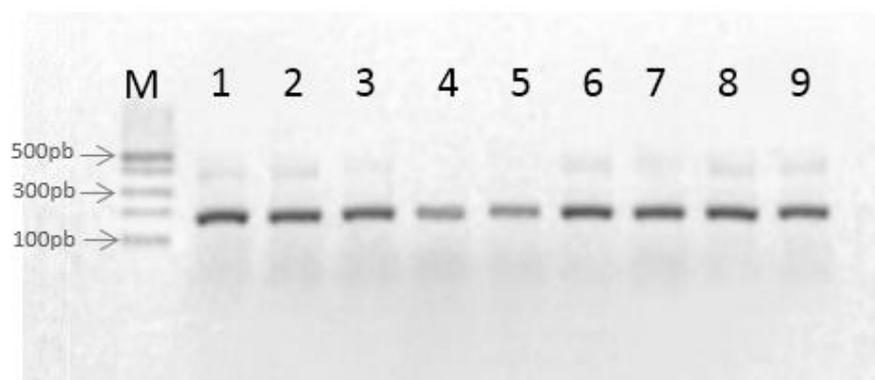


Figura 3.9: Detección del gen Bt mediante la amplificación por PCR en tiempo final del promotor 35 S del virus del mosaico de coliflor en trozos de láminas de maíz transgénico.

3.5 Discusión

La persistencia de los organismos plaga en áreas agrícolas se debe en parte a su habilidad de adaptarse a la evolución de los agroecosistemas y fundamentalmente a las prácticas de manejo que dominan la agricultura a través de los años. El género *Helicoverpa* reviste importancia económica tanto mundialmente como en Argentina siendo la incidencia de distintas especies variable según el cultivo dominante en el paisaje. En la región central, el paisaje durante el verano se encuentra dominado por los cultivos de maíz y soja en grandes extensiones, con parches de cultivos de alfalfa, sorgo y girasol en menor superficie.

La forma en que una polilla elige el hospedero en la cual va a dejar su descendencia ha sido estudiada por Fitt et al. en 1989, y posteriormente por Jallow et al. en 2004. Está comprobado que los adultos responden a compuestos volátiles emanados por las plantas y que poseen mecanismos de recepción química que median el aterrizaje en un hospedero adecuado. Sin embargo, existen particularidades del comportamiento de los lepidópteros plaga que aún resultan inciertas. El presente estudio da cuenta de esos comportamientos diferenciales, ya que la presencia de las especies del género *Helicoverpa* detectada mediante trampas de luz no tuvo un correlato directo en los cultivos monitoreados, incluso cuando estas plagas fueron citadas como problemáticas para estos mismos cultivos en diferentes países, como es el caso de *H. armigera* en maíz y soja Bt, o *H. gelotopoeon* en soja Bt (Ávila et al. 2013; Blanco et al. 2016).

En el monitoreo realizado cada especie mostró una marcada preferencia por un cultivo en particular. *Helicoverpa zea* fue la única especie encontrada en los cultivos de maíz de la zona bajo estudio. En los cultivos de maíz transgénico para el control de lepidópteros, *H. zea* fue encontrada en todos aquellos híbridos que expresaban proteínas Cry, pero no así en los materiales que expresaban proteínas Vip. La presencia de *H. zea* en maíces transgénicos ya había sido reportada previamente en el mundo (Horner et al. 2003; Blanco et al. 2016) y también en Argentina (Balbi y Flores 2015). De todas maneras, este trabajo confirma la presencia de la plaga consumiendo tejidos de materiales transgénicos que expresan las proteínas Cry 1Ac, Cry 1 Ab, Cry1A.105, Cry 2Ab, Cry1Fa2 en cinco localidades de la región central de Argentina en forma simultánea, lo cual indica que existen poblaciones de *H. zea* resistentes a maíces Bt. Los cultivos que expresaban la proteína Vip en general no manifestaron daño en espiga, salvo una excepción que se ilustra en la Figura 3.10, donde se observa una espiga hallada a campo en un lote de maíz Viptera de la localidad de Manfredi en la cual se puede observar el orificio que dejó una oruga alimentándose del tejido interno del marlo. Si la expresión de



Figura 3.10: Daño en maíz Viptera de la localidad Manfredi

la proteína Cry en el marlo fuera menor, la oruga estaría ingiriendo sub-dosis de la misma, lo cual podría contribuir a la evolución de resistencia a esta toxina para la cual todavía la plaga es susceptible.

H. zea es comúnmente hallada en cultivos de soja de otros países, pero en Argentina no había sido registrada sobre este cultivo (Margheritis y Rizzo 1965, Navarro et al. 2009). Sin embargo, Murúa et al. (2016) la hallaron en bajas proporciones en lotes de soja de las localidades de La Cocha en provincia de Tucumán y Jiménez en la provincia de Santiago del Estero en el año 2014. La baja proporción en que fue encontrada *H. zea* en cultivos de soja tanto en este estudio como en el realizado previamente indica que este cultivo no sería de su preferencia mientras se encuentre el cultivo de maíz en el mismo paisaje. De todas maneras, conocer la presencia de esta especie en el cultivo de soja conduce a mejorar las prácticas de manejo a adoptar en aquellos años en los cuales las poblaciones son altas. Coincidentemente con Margheritis y Rizzo (1965), y Navarro et al. (2009), se la halló alimentándose en lotes de alfalfa, aunque no contribuyó en gran proporción al complejo de bolilleras en este cultivo. Estas bajas proporciones halladas en leguminosas de la región central dan cuenta de que la especie se encuentra en lotes de alfalfa y soja esporádicamente utilizando a estas leguminosas como hospedero alternativo o de baja preferencia frente al cultivo de maíz.

Helicoverpa gelotopoeon fue hallada alimentándose exclusivamente de los cultivos de soja y alfalfa. Navarro et al. (2009) la citan en cultivo de maíz, pero en el presente estudio ningún individuo fue detectado en este cultivo. En las leguminosas monitoreadas, esta especie fue la prevalente en todos los lotes y en todas las localidades. En el cultivo de soja para estos años de baja densidad poblacional se la encontró preferentemente actuando como defoliadora en etapas iniciales de desarrollo del cultivo.

Helicoverpa armigera no fue encontrada en ninguno de los tres cultivos monitoreados, sean transgénicos para el control de lepidópteros o no. Sin embargo, fue detectada en algunas localidades en una baja proporción mediante trampas de luz. La situación atravesada por Brasil durante los años 2013 y 2014 (que inició la alerta y monitoreo en nuestro país) fue excepcional. La misma se caracterizó por altas densidades poblacionales de especies del género *Helicoverpa* y por la presencia de *H. armigera* en cultivos de soja, maíz, algodón y tomate (Czepak et al., 2013; Specht et al. 2013; Ávila et al. 2013). En el presente estudio las densidades poblacionales fueron muy bajas, y los cultivos más importantes de la región central del país no sufrieron la presencia de esta plaga cuarentenaria considerando el muestreo realizado. Estos datos constituyen un importante punto de partida para futuros trabajos tendientes a evaluar la evolución de la plaga en la región núcleo sojera y maicera de nuestro país.

En los lotes de soja transgénica para el control de lepidópteros monitoreados en la región centro de Argentina para las cinco localidades relevadas no fueron encontradas orugas de ninguna especie perteneciente al género *Helicoverpa*. Yu et al. (2012) han detectado la supervivencia de *H. armigera* cuando se alimentaba de soja transgénica en poblaciones de China y también ha sido reportada como una plaga problemática en cultivos transgénicos de soja en Uruguay por Blanco et al. (2016). En Argentina la soja transgénica para el control de lepidópteros se comercializa desde el año 2012 y su adopción aún no es masiva en la región central como sí lo es para el cultivo de maíz. En el año 2016 la superficie de soja implantada fueron 18,7 millones de hectáreas de las cuales 2,52 millones contaron con el evento transgénico que expresa la toxina Cry 1 Ac para el control de lepidópteros. Esta superficie representó un 3% de la soja implantada en todo el país (ISAAA 2016). La forma en que esta tecnología se incorpore al paisaje de la

región centro va a determinar el impacto que tenga en la dinámica de las especies pertenecientes al género *Helicoverpa*, como indica la marcada diferencia de susceptibilidad a soja Bt entre especies reportada en otros países (Luttrell et al. 1999; Blanco et al. 2016). Si el cultivo de soja Bt se sigue expandiendo en Argentina, una gran superficie cubierta por esta leguminosa transgénica para el control de lepidópteros podría cambiar la dinámica del complejo favoreciendo a *H. armigera* ya que tiene reportada ventaja sobre *H. zea* y *H. gelotopoeon* en cuanto a la tolerancia a la toxina Cry 1 Ac.

3.6 Conclusiones

- En el cultivo de maíz, tanto Bt como no Bt, la única especie del género *Helicoverpa* hallada fue *H. zea* en todas las localidades.
- En el cultivo de soja no Bt y alfalfa la especie predominante fue *H. gelotopoeon*. En las localidades Rafaela y Marcos Juárez se encontró una baja proporción de *H. zea* consumiendo estas leguminosas. En Pergamino se halló esta última solo en alfalfa, en baja proporción. En Manfredi y Laboulaye, no se registró *H. zea* sobre leguminosas.
- En maíces Bt fue hallada *H. zea* en todos aquellos que expresan toxinas Cry con grado de infestación variable según el evento transgénico en cuestión (MG, VT3Pro y Power Core). En eventos que expresan proteínas vip (Viptera) no se encontraron orugas.
- En soja Bt no se detectaron orugas del género *Helicoverpa*.
- *H. armigera* no fue hallada en estado larval sobre ninguno de los cultivos evaluados.

CAPITULO 4

4.1 Introducción

4.1.1 Utilización del ADN mitocondrial para estudios filogeográficos

La cladística o sistemática filogenética es un método taxonómico ampliamente utilizado. Fue formulado por el entomólogo alemán Hennig en 1950 para construir clasificaciones naturales, pero se convirtió en un método clasificatorio más robusto luego que comenzó a interactuar con diferentes disciplinas biológicas, como la biogeografía, ecología, evolución, etología y conservación. Todas estas interacciones enriquecieron el método y ampliaron su campo de aplicación más allá de la taxonomía, y permitieron analizar el modo en que se originan las especies por fragmentación de comunidades reproductivas y aislamiento espacial (Lanteri et al. 2002).

La historia de la especiación por la cual un conjunto dado de taxones (especies o grupos de los mismos) divergieron de un ancestro común puede ser representada por un diagrama de ramificación llamado cladograma. Cada segmento de línea en tal figura representa la sucesión de generaciones en un mismo linaje, mientras que cada punto de ramificación o nodo representa el ancestro común más reciente de los linajes derivados de ella (Mitter et al. 1993).

Cuando una nueva especie es encontrada en un territorio los investigadores buscan realizar inferencias sobre las rutas de introducción del nuevo organismo y conocer de dónde éste deriva. Existen dos metodologías para el estudio de nuevas especies en un determinado espacio: los métodos basados en observaciones directas y los basados en información de patrones poblacionales mediante el estudio de su genética (Estoup y Guillemaud 2010).

Para realizar inferencias genéticas en el reino animal la herramienta molecular más utilizada son las secuencias mitocondriales. En la mayoría de los animales el ADN mitocondrial se hereda por vía materna porque es el gameto femenino quien las aporta. Las células somáticas de animales e insectos poseen cientos a miles de mitocondrias cada una con varias copias de ADN mitocondrial (ADNmt). Sin embargo, existe un haplotipo (variante de ADN) mitocondrial preponderante en cada individuo. Esta característica se denomina homoplasmia y constituye una de las bases del análisis filogeográfico de individuos (Lanteri y Confalonieri 2004). Las secuencias de ADN mitocondrial conocidas como haplotipos registran una historia matrilineal de eventos mutacionales, los cuales pueden conectarse de un modo filogenéticamente inteligible en un árbol de genes (Domínguez-Domínguez y Vazquez-Domínguez 2009). En una revisión de 41 estudios sobre insectos de importancia económica, Cognato (2006) determinó que el uso de loci mitocondriales era la implementación más corriente del área de estudio de la genética de insectos (84%) y que la mitad de ellos utilizaron el gen que codifica para la COI.

4.1.2 Análisis filogeográfico y su aplicación en el estudio de *H. armigera* en la región

La filogeografía se define como el análisis espacial de los linajes genéticos (Avice et al. 1987). En ella, la genética de poblaciones y la sistemática encontraron su punto de coincidencia en un enfoque holístico. Entre las múltiples aplicaciones del análisis filogeográfico cabe señalar la determinación del lugar de origen y vías de dispersión de plagas agrícolas, el grado de estructura poblacional de una especie, la correlación de variación en caracteres cromosómicos o genéticos con gradientes geográficos y/o ecológicos, el tipo de especiación que explica la co-ocurrencia de distintos morfotipos de una especie, el reconocimiento de poblaciones en riesgo de extinción y estudios de

filogeografía comparada, que permiten ponderar la influencia de la dispersión y la vicarianza en la evolución de especies codistribuidas (Lanteri y Confalonieri 2004).

Un requisito fundamental para poder establecer genealogías génicas es el uso de marcadores o secuencias de ADN que no recombinen. Debido a esto la mayoría de los trabajos de filogeografía utilizan marcadores de herencia citoplasmática, no mendeliana, como el ADN mitocondrial o el cloroplástico en plantas.

Dado que los haplotipos o variantes de ADN mitocondrial registran una historia matrilineal de eventos mutacionales, es posible conectarlos en un filograma, el cuál puede superponerse luego a la distribución geográfica de la especie en estudio (Avice 2000). Los filogramas se superponen a la distribución geográfica a fin de interpretar el proceso evolutivo responsable de la dispersión en el espacio de las especies bajo estudio. Dentro de cada filogrupo, los haplotipos se separan generalmente por un sólo paso mutacional y la presencia de haplotipos distintos en un mismo filogrupo, evidencia la variabilidad genética y el tiempo de divergencia (Scataglini et al. 2001). Los diferentes grados que alcanza la estructura poblacional de una especie dependen de su naturaleza. En aquellas especies con gran movilidad las poblaciones son generalmente poco divergentes y están estructuradas débilmente desde el punto de vista filogeográfico. Existen factores que determinan que la estructura poblacional sea fuerte pese a que la especie posea una gran capacidad de dispersión, el comportamiento modifica esta tendencia cuando adquiere características como filopatría al sitio natal o fidelidad al grupo social (Lanteri y Confalonieri 2004).

El enfoque filogeográfico ayuda a explicar las causas históricas de distribución de especies, permite identificar extinciones y recolonizaciones, eventos de expansión y cuellos de botella fundamentales en la distribución sobre el territorio. Entre las aplicaciones del análisis filogeográfico se encuentran comúnmente estudios de orígenes y vías de dispersión de especies consideradas plagas (Lanteri y Confalonieri 2004). La reconstrucción de rutas de invasión toma su valor al momento de definir y testear diferentes hipótesis respecto a los factores ambientales y genéticos responsables de las invasiones biológicas. Contar con esta información nos facilita el diseño de estrategias de control o prevención de invasiones (Estoup y Guillemaud 2010).

Los estudios de la distribución geográfica de linajes génicos han sido usados para describir eventos históricos, como son la fragmentación de hábitats, la expansión en el territorio de poblaciones, migración, vicarianza o extinción (Domínguez-Domínguez y Vazquez-Domínguez 2009). La variabilidad genética de las poblaciones invasoras depende de las características históricas y demográficas de su introducción. Estas características incluyen el número y composición genética de las poblaciones fuente, el número de introducciones al nuevo territorio, la cantidad de individuos introducidos en cada episodio de introducción, el número de poblaciones intermedias entre la población introducida inicialmente y aquella que se convirtió en la invasora y de la diseminación geográfica de las poblaciones introducidas en cada evento. Las actividades humanas promueven la introducción de especies a nuevas áreas y aceleran la dispersión espacial de las mismas mediante el tráfico aéreo, terrestre y marítimo (Tay et al. 2017). Por otra parte, ejercen un rol crucial e indirecto al modificar el paisaje homogeneizando los ambientes a través de la agricultura, en especial mediante la monocultura. Esta homogeneización del ambiente decrece en magnitud la respuesta de evolución necesaria de las especies para adaptarse nuevos escenarios de colonización (Estoup y Guillemaud 2010).

A través de los últimos 15 años numerosos conocimientos fueron empleados para medir la dispersión, migración y flujo de genes de *H. armigera* en Europa, África, Asia y Oceanía. Estos estudios condujeron a diversas interpretaciones y teorías ya que existe

evidencia de dispersión en bajos niveles, pero también migración en grandes escalas (Scott et al. 2005; Behere 2007). A partir del 2012 se incorporaron poblaciones del continente americano al estudio de haplotipos y migraciones de esta especie (Mastrangelo et al. 2014). Tan diversa es la estructura genética y tantas teorías se elaboraron en base a la dispersión de *H. armigera* en el mundo que hasta se ha comenzado a hablar de bioterrorismo asociado a esta especie (Stauffer 2014).

Cuando una nueva especie es introducida a una región en múltiples ocasiones la probabilidad que esta se establezca y se convierta en invasora se incrementa. Una forma de evaluar el número de incursiones y su origen es a través de inferencias basadas en el uso de ADN mitocondrial ya que nos brinda información sobre eventos matrilineales fundacionales (Tay et al. 2017). Dentro de los últimos cinco años se han realizado estudios mitocondriales de esta especie con muestras colectadas en muy diversos territorios (Australia, China, India, Pakistan, Uganda, Burkina Faso, Nueva Zelanda, Francia, España, Madagascar, Gana, Camerún, Senegal, Brasil, Uruguay y Paraguay) con el objetivo de consolidar una base de datos que permita dar claridad a la forma de dispersión de *H. armigera* a través de los continentes (Tay et al. 2013; Arnemann et al. 2016; Tay et al. 2017). En Argentina han comenzado a realizarse estudios mitocondriales (Arneodo et al. 2015) pero la distribución de haplotipos en el territorio aún resulta incierta.

Atendiendo a la importancia del hallazgo de *H. armigera* en la región agrícola productiva de nuestro país, se realizó una red de haplotipos con regiones parciales de los genes mitocondriales que codifican para la enzima citocromo oxidasa subunidad I y citocromo b de los individuos colectados, con el fin de hipotetizar sobre el avance de la especie en la región central del territorio argentino desde una perspectiva filogeográfica.

4.2 Objetivos del capítulo

4.2.1 Objetivo general

Comprender el avance de la población de *H. armigera* en el país mediante una aproximación filogeográfica.

4.2.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar una aproximación filogeográfica a partir de análisis de secuencias mitocondriales y redes de haplotipos para comprender el avance de *H. armigera* en el país.
- 2) Comparar los haplotipos hallados en nuestro país con aquellos reportados recientemente en otros países de América y el mundo.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Análisis filogeográfico de las muestras colectadas

En la región centro como resultado del muestreo sobre cultivos de soja, maíz y alfalfa y la colecta de adultos en trampas de luz fueron hallados cuatro individuos adultos colectados exclusivamente en trampas de luz. Debido a la baja presencia de *H. armigera* en los muestreos realizados se incorporaron al análisis dos individuos colectados en trampas de luz de la localidad de Marcos Juárez durante el año 2015, anteriores a la muestra tomada en el presente estudio identificados como Marcos Juárez (3) y Marcos Juárez (4), y cuatro individuos colectados durante 2014 que formaron parte del muestreo utilizado para el desarrollo de la técnica de rápida identificación (Arneodo et al. 2015), dos pertenecientes a Las Breñas (Chaco) y dos pertenecientes a Rapelli (Santiago del Estero) denominados Las Breñas (1) y (2), y Rapelli (1) y (2). Los individuos de Las Breñas fueron colectados en estado adulto en trampa de luz y los de Rapelli fueron extraídos de un cultivo de garbanzo en estado larval y luego criados hasta alcanzar el estado adulto en laboratorio. Los sitios de los cuales se obtuvieron muestras de *H. armigera* se identifican en la Figura 4.1.



Figura 4.1: Sitios en los cuales se colectaron muestras para análisis de ADN mitocondrial

Se utilizaron regiones parciales de ADN mitocondrial: el gen que codifica para la enzima citocromo oxidasa subunidad I, y un gen del citocromo b. Los pares de iniciadores utilizados para la amplificación de la COI fueron los reportados previamente (Arneodo et al. 2015). Los utilizados para la amplificación regiones del citocromo b fueron Cytb-F02 (5' GAA TCC TTT AAT TTA AAA TAT AC 3') y Cytb-R02 (5' AAA TAT GGG TTA

GTT AAA GTT AA 3') que amplifican regiones de 434 pares de bases (Behere et al. 2008). Las condiciones de PCR para los cebadores H3Fw, H3Rv, Cytb-F02, Cytb-R02 fueron: 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 50°C por 30 s, y 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 2 min (Arneodo et al. 2015; Behere et al. 2008). Los productos de PCR fueron purificados usando ADN Puri-Prep-GP Kit (INBIO, Tandil, Argentina). Las muestras fueron secuenciadas en un secuenciador ABI PRISM 3500 XL (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) en el CICVyA-INTA (Hurlingham, Argentina). Las secuencias fueron realizadas en todos los casos con lecturas “forward” y “reverse”.

4.3.2 Análisis estadísticos de variabilidad genética

Una vez obtenidas las secuencias, que fueron de alta calidad, las mismas fueron editadas con ayuda del programa Chromas, el reverso complementario de la lectura reversa y el alineamiento de las secuencias fue realizado con el programa MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016). La red de haplotipos fue confeccionada utilizando el programa PopART (Leigh y Bryant 2015) con el algoritmo TCS (Clement et al. 2000), la diversidad haplotípica, nucleotídica y el estadístico D_{Tajima} se calcularon con el programa DnaSp (Rozas et al. 2017) y los árboles de Neighbor Joining (NJ) fueron confeccionados con el programa MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016). Los parámetros de cada programa no especificados en esta sección son los que cada uno de ellos tiene determinado por defecto.

4.4 Resultados

4.4.1 Similitudes genéticas a partir del análisis de las secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica para la COI

En el alineamiento de las secuencias correspondientes a la región parcial de la COI del ADN mitocondrial bajo estudio (699 pb) se hallaron 7 polimorfismos de nucleótido simple. Cuando incorporamos las muestras de *H. armigera* obtenidas al árbol Neighbor Joining del género *Helicoverpa* realizado en el capítulo 2 (Sección 2.4), el resultado es el siguiente:

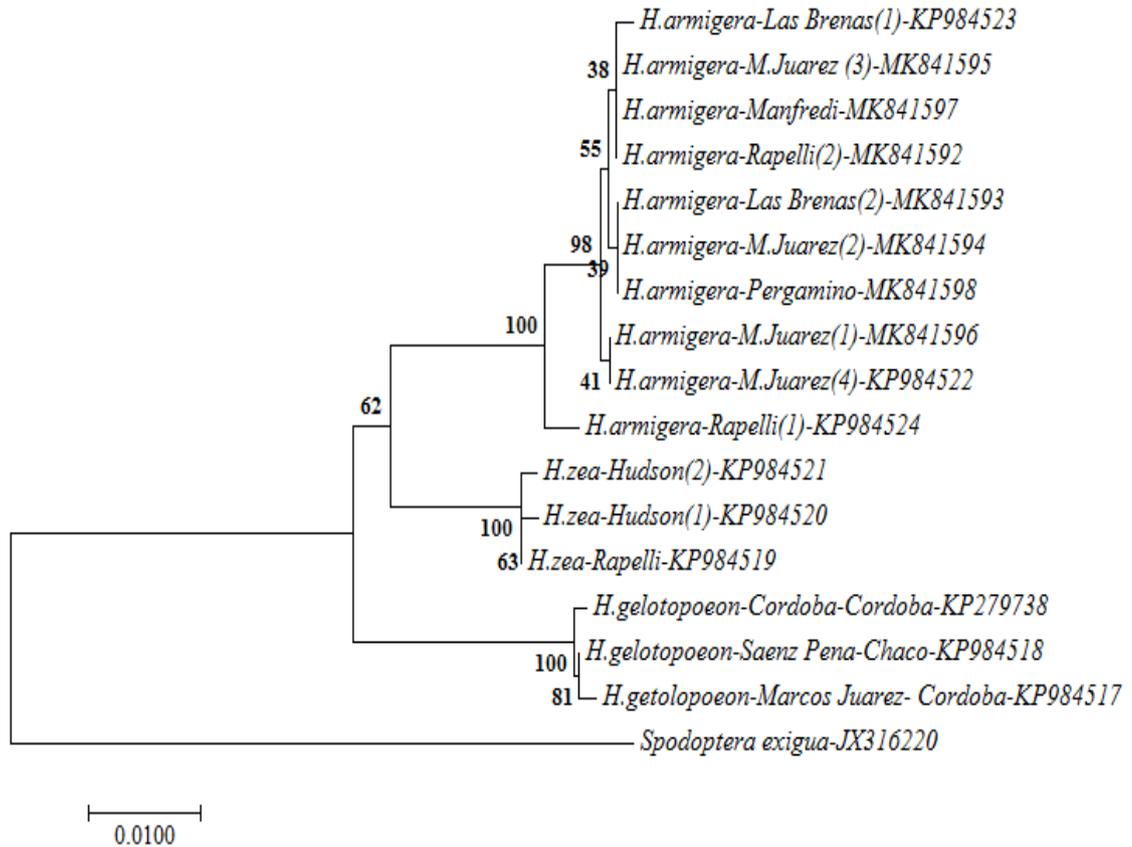


Figura 4.2: Árbol de similitudes genéticas mediante Neighbor joining de secuencias correspondientes a la región COI encontradas en el presente estudio y las reportadas previamente en Argentina por Arneodo et al 2015. Las secuencias reportadas en el banco de genes NCBI se encuentran etiquetadas junto a su código de acceso. *S. exigua* fue incorporada al análisis como outgroup.

4.4.2 Haplotipos encontrados a partir del análisis de secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica para el citocromo b

La región del genoma analizada, que corresponde a 430 pares de bases del gen mitocondrial que codifica para el citocromo b, fue ampliamente utilizada en el mundo para describir la variabilidad genética de *H. armigera* y en búsqueda de dilucidar sus vías de dispersión. El análisis de esta región del genoma para las mismas 10 muestras presentadas en la sección anterior (4.4.1) revela la presencia de 3 haplotipos, nombrados arbitrariamente con una numeración creciente (Hap 1 – Hap 3).

El haplotipo 1 se encuentra mayormente representado en la región centro del país siendo compartido entre 7 de las 10 muestras analizadas (M. Juárez (1), M. Juárez (2), M. Juárez (3), M. Juárez (4), Manfredi, Pergamino, Las Breñas (2)). El haplotipo 2 fue hallado solamente en la región del norte (Las Breñas (1), Rapelli (2)) al igual que el haplotipo 3 que está representado por solo una muestra (Rapelli (1)), la cual es muy distante respecto al resto, existiendo cinco pasos mutacionales entre este último y los haplotipos 1 y 2. El conocimiento de estos haplotipos nos permite realizar una comparación entre las variantes genéticas encontradas en Argentina con las reportadas en el resto del mundo como se muestra en las Figuras 4.3, 4.4 y 4.5.

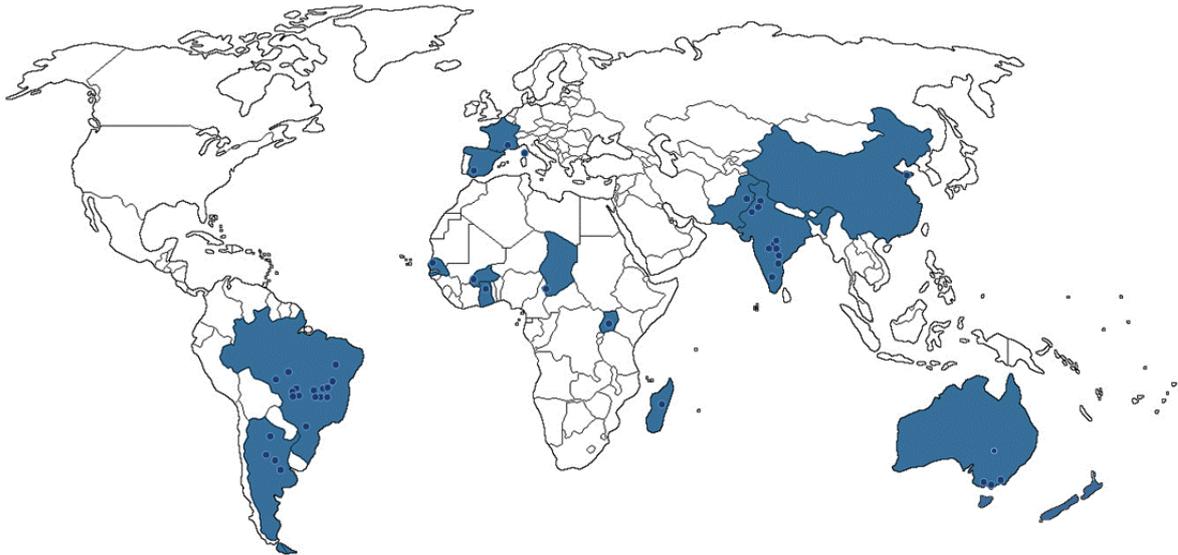


Figura 4.3: Mapa esquemático de los países del mundo en los cuales se encontró el Hap 1 de la región parcial del citocromo b analizada. Estos se marcaron en color azul y las localidades en los cuales se reportan las muestras se marcaron con puntos en azul oscuro.

El denominado haplotipo 1 en esta Tesis fue reportado en 15 países ubicados en los cinco continentes. El mapa fue confeccionado considerando sólo los alineamientos que presentaron una identidad del 100% en una región de 409 pares de bases. Es una variante genética que se encuentra dispersada en todo el mundo, en diversos ambientes y variados cultivos. Se lo reportó mundialmente en cultivos de algodón, trigo, maíz, tomate, girasol, arveja, poroto, mijo perla, berenjena, y especies del género *Medicago*. En Brasil se halló este haplotipo en las regiones nordeste, centro-oeste, sudeste y sur.

El haplotipo 2 se encontró en 10 países del mundo. Al igual que el haplotipo 1 se encuentra expandido por los 5 continentes. Si bien se encuentra reportado en una menor cantidad de localidades y con menor número de muestras, tiene una amplia presencia mundial. Se lo halló en cultivos de trigo, maíz, algodón, garbanzo, poroto, tomate y especies del género *Medicago*. En Argentina fue encontrado sólo en la región norte.

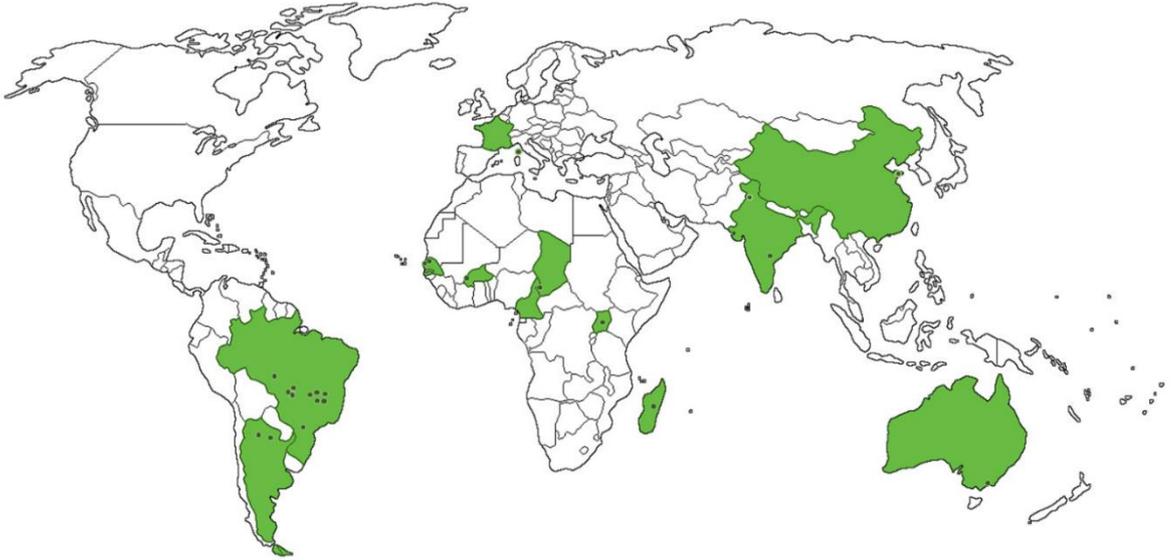


Figura 4.4: Mapa esquemático de los países del mundo en los cuales se encontró el Hap 2 de la región parcial del citocromo b analizada. Estos se marcaron en color verde y las localidades en los cuales se reportan las muestras se marcaron con puntos en verde oscuro.

El haplotipo 3, que en Argentina se encuentra representado por una sola muestra de Rapelli, es una variante genética de *H. armigera* poco frecuente en el mundo. Se encuentra reportada en Kampala (Uganda) en cultivos de algodón, en Dalmore (Australia) en maíz y recientemente en cultivos de tomate en Brazabrantes y Alto Parnaíba (Brasil). La localidad de Brazabrantes dentro del estado Goiás se ubica a 761 m sobre el nivel del mar y a aproximadamente 2000 kilómetros en línea recta de la localidad de Rapelli en la cual fue hallada en Argentina.



Figura 4.5: Mapa esquemático de los países del mundo en los cuales se encontró el Hap 3 de la región parcial del citocromo b analizada. Estos se marcaron en color rojo y las localidades en los cuales se reportan las muestras se marcaron con puntos más oscuros.

Considerando los reportes de regiones parciales del citocromo b encontradas en el mundo se procedió a conformar un árbol de similitudes genéticas mediante el método Neighbor joining con muestras de los cinco continentes. Las secuencias fueron tomadas del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Existen muestras en las cuales el reporte fue posterior al primer ingreso de la secuencia en el banco de genes, y que presentaron un 100% de identidad respecto a las ya reportadas, por lo cual las incluídas en el siguiente árbol de similitudes genéticas pueden encontrarse asociadas a una mayor cantidad de muestras de distintos lugares en el mundo (Figura 4.6).

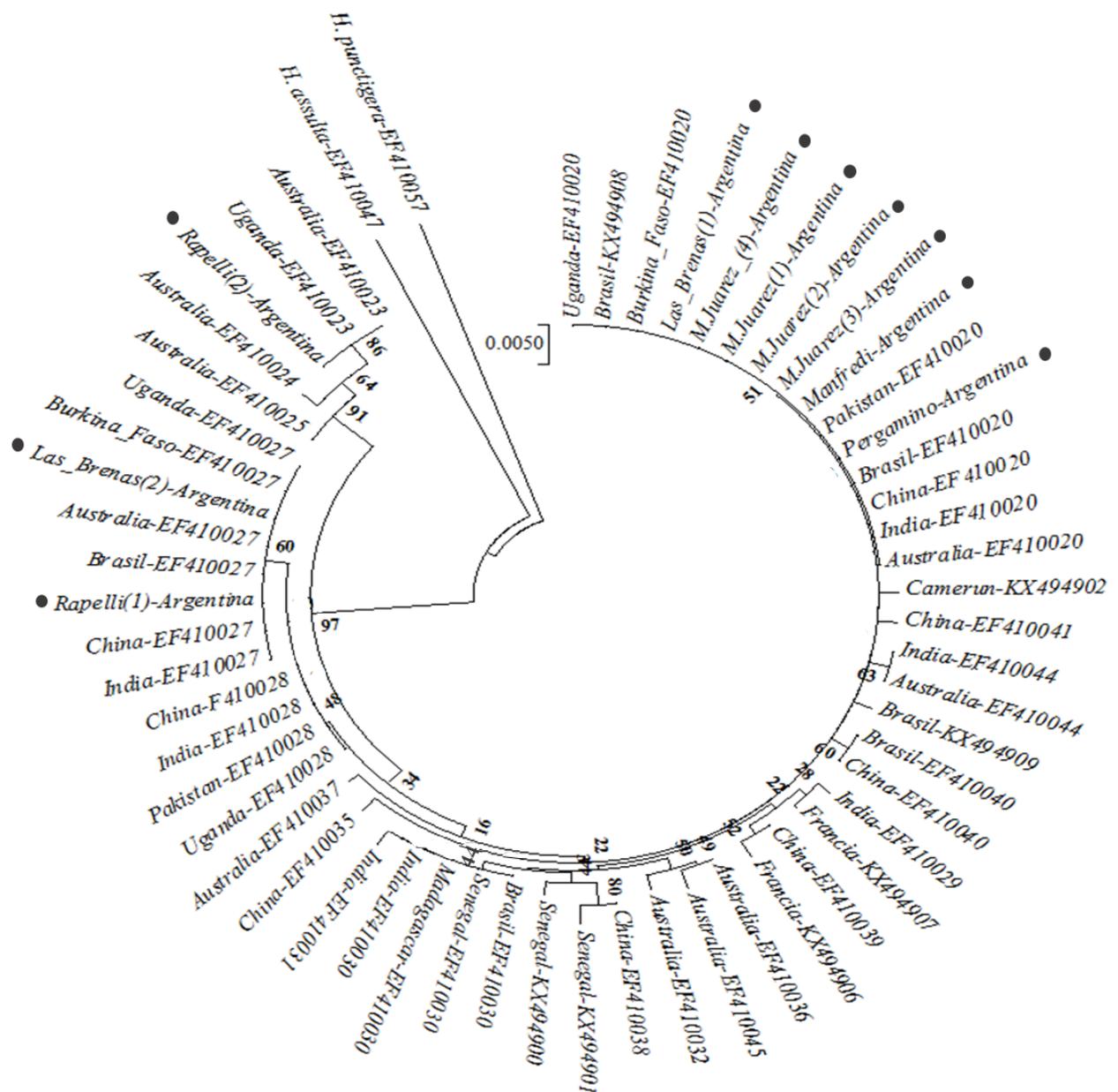


Figura 4.6: Árbol de similitudes genéticas mediante el método Neighbor joining de secuencias correspondientes a la región Cit b encontradas en el presente estudio y las reportadas previamente en el mundo. Las secuencias reportadas en el banco de genes NCBI se encuentran etiquetadas junto a su número de acceso. Los círculos grises corresponden a las muestras de esta Tesis. *H. punctigera* y *H. assulta* fueron incorporadas al análisis como outgroup.

4.4.3 Haplotipos encontrados a partir del análisis de secuencias nucleotídicas parciales de los genes que codifican para la COI y el gen Cit b concatenadas

Cuando las secuencias parciales del genoma mitocondrial fueron analizadas en forma concatenada se determinaron siete haplotipos, tres de los cuales comprendieron más de una muestra y cuatro representados por muestras individuales. Fueron nombrados arbitrariamente con una numeración creciente (Hap 1 – Hap 7). De los siete haplotipos, dos se diferenciaron más visiblemente del resto (Figura 4.7).

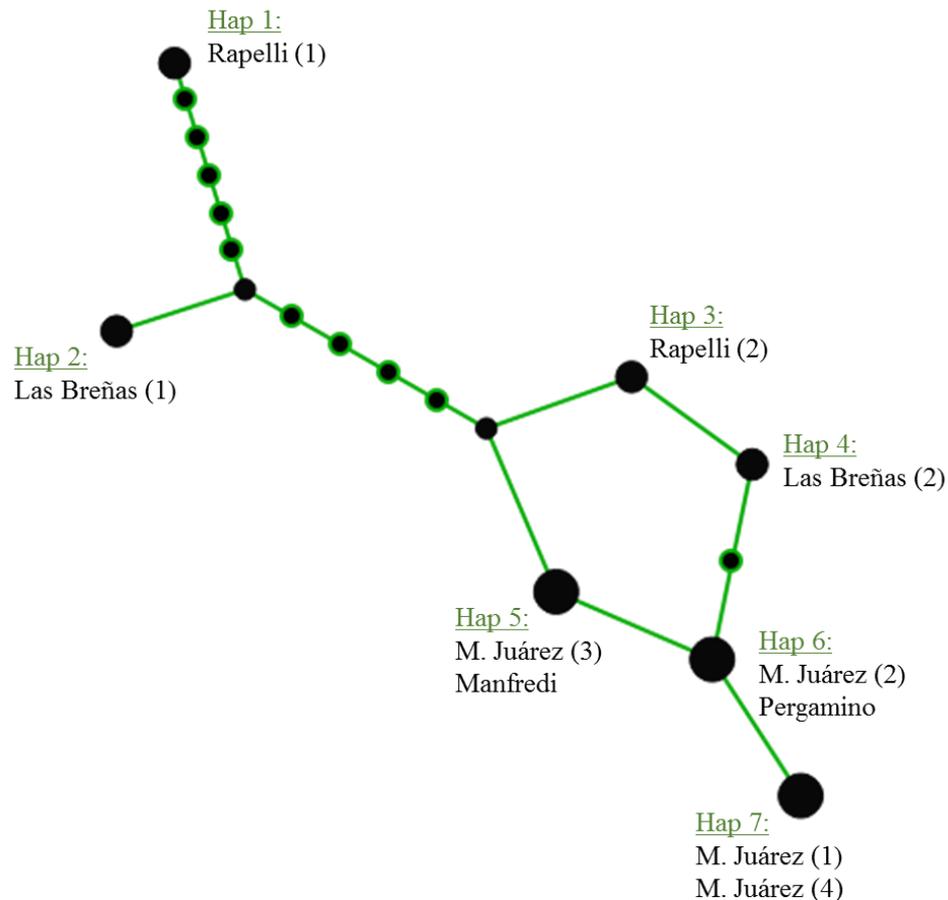


Figura 4.7: Red de haplotipos utilizando el método TCS a partir de regiones parciales de COI y Cit b concatenadas. Se hallaron 7 haplotipos denominados Hap 1, Hap 2, Hap3, Hap 4, Hap 5, Hap 6, Hap 7. Debajo de cada nombre se encuentran ubicadas las muestras correspondientes a cada haplotipo.

Los haplotipos 1 y 3 fueron hallados en dos muestras distintas de la localidad de Rapelli. Los haplotipos 2 y 4 fueron hallados en dos muestras distintas correspondientes a la localidad de Las Breñas. La muestra (3) de la localidad Marcos Juárez fue agrupada con la única muestra obtenida en la localidad de Manfredi en el aquí denominado haplotipo 5. Las muestras Marcos Juárez (2) y Pergamino se agruparon en el haplotipo aquí denominado 6. El análisis agrupó a las muestras Marcos Juárez (1) y (4) en el haplotipo 7.

Las secuencias concatenadas reúnen todos los polimorfismos hallados en las muestras de *H. armigera* colectadas en la región norte y centro de Argentina.

4.4.4 Caracterización de la diversidad genética hallada en las regiones parciales del genoma mitocondrial secuenciado

Se realizó la caracterización de las muestras en cuanto a la diversidad haplotípica y nucleotídica en ambos segmentos parciales del ADN mitocondrial y de las secuencias concatenadas. Los cálculos fueron realizados a partir de una secuencia de 699 pares de bases para COI, 411 pares de bases para Cit b, y 1110 pares de bases en la secuencia concatenada. Los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Resultado obtenido del análisis de diversidad haplotípica para las regiones del ADN mitocondrial evaluadas:

Región ADN mitocondrial	Diversidad haplotípica (h)	Error estándar
COI (5 haplotipos)	0.844	0.080
Cit b (3 haplotipos)	0.511	0.164
COI + Cit b (7 haplotipos)	0.933	0.062

La diversidad haplotípica de la región COI, tomando en consideración que se hallaron cinco haplotipos distintos en el presente estudio, arrojó un valor significativo y con un error estándar aceptable considerando que el estudio se basó en 10 muestras. El valor hallado para el citocromo b fue menos significativo debido a la menor variabilidad encontrada y el error estándar fue mayor. Cuando se analizó la secuencia concatenada, la reunión de la variabilidad de ambas regiones arrojó una diversidad haplotípica de 0.933. Esto implica que existe una alta variabilidad haplotípica en las muestras analizadas en esta Tesis.

La diversidad nucleotídica en los tres casos fue de consideración, ya que numerosos trabajos reportan una diversidad similar a la aquí hallada considerando más de 20 haplotipos en su análisis, y en este caso la diversidad se mantiene alta habiéndose encontrado siete variantes para las regiones concatenadas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Resultado obtenido del análisis de diversidad nucleotídica para las regiones del ADN mitocondrial evaluadas:

Región ADN mitocondrial	Diversidad nucleotídica (π)	Error estándar
COI (5 haplotipos)	0.00318	0.00120
Cit B (3 haplotipos)	0.00443	0.00207
COI + Cit b (7 haplotipos)	0.00441	0.00223

Profundizando el análisis de diversidad genética en búsqueda de aportar información sobre la manera en que esta nueva plaga está avanzando en territorio argentino se procedió a calcular el estadístico D_{Tajima} que, teniendo en cuenta el número medio de sitios que difieren entre cada par de secuencias, el número de sitios polimórficos totales y el número de secuencias analizadas, realiza una inferencia sobre la dinámica poblacional. El valor D_{Tajima} para COI es -0.92403, para Cit b es -1.11638, y para la concatenación de ambas secuencias -0.35911. La interpretación del estadístico sugiere

que la población está en expansión. Sin embargo, el estadístico resultó no significativo ($p > 0.1$) para las muestras analizadas en el presente estudio.

4.5 Discusión

Las genealogías génicas se establecen mediante el uso de marcadores moleculares o secuencias de ADN no recombinantes como es el ADN mitocondrial. Cuando se incorporan las características del territorio a estos análisis filogenéticos los estudios toman características de filogeográficos. La filogeografía tiene múltiples aplicaciones entre las cuales se destacan los estudios destinados a conocer el lugar de origen de un determinado organismo y las vías de dispersión de plagas así como también las causas de variaciones genéticas encontradas y su correlación con gradientes geográficos o ecológicos (Lanteri y Confalonieri 2004).

La diversidad genética de una especie invasora ofrece pistas sobre los linajes fundadores. Cuando a estas pistas se incorpora información de distribución geográfica nos permite inferir orígenes y vía de incursión. Cuando una especie es introducida en una nueva región, sus posibilidades de establecerse se ven modificadas por la dinámica de las introducciones y la repetitividad de estos eventos. Cuanta más diversidad genética se introduce en una nueva área mayores son las posibilidades de establecimiento (Tay et al. 2017). La migración de especies desde el ecuador hacia los polos ha estado teniendo lugar por lo menos en los últimos 80 siglos. Los inmigrantes que se dirigen hacia latitudes mayores de cada región transportan una menor variabilidad respecto a la población fuente. La fracción de la población que migra sufre procesos de cuellos de botella, aislamiento y deriva que confieren un cambio en sus frecuencias alélicas (Bradshaw y Holzapfel 2010) modificándose su adaptabilidad a los distintos agroecosistemas.

Helicoverpa armigera se encuentra reportada en Argentina en ocho provincias (Salta, Chaco, Tucumán, Santiago del Estero, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y Buenos Aires), revelando que está presente en el área de agricultura extensiva y mixta del país. Fue reportada en los cultivos de soja, garbanzo y girasol (Arneodo et al. 2015; Murúa et al. 2016). Sin embargo, en la región centro de nuestro país y a partir del muestreo de 1343 individuos del género *Helicoverpa* spp. no fue hallada directamente sobre los cultivos de alfalfa, soja y maíz. En Brasil se encuentra reportada en maíz, soja, algodón, y sorgo; en Uruguay en maíz, y en Paraguay fue colectada en lotes de soja mediante trampas de luz (Blanco et al. 2016; Arnemann et al. 2016).

Cuando observamos el árbol de Neighbor Joining del género *Helicoverpa* con la especie *H. armigera* incorporada, se destaca la variabilidad presente en las secuencias de esta especie, aún entre individuos de la misma zona geográfica. Esto es contrario a lo que habría de esperarse para una población que viene colonizando en sentido norte-sur de acuerdo a la sucesión de ciclos estacionales anuales. Esta gran variabilidad genética encontrada puede dar un indicio de múltiples incursiones, o de una población fragmentada debido a una alta afinidad por un cultivo huésped en particular (o maleza), o debido a algún tipo de aislamiento por distancia.

Al analizar los haplotipos obtenidos en cuanto a la secuencia del citocromo b, encontramos un haplotipo muy presente a lo largo y ancho del mundo (Hap1), uno con gran dispersión, pero menor representatividad (Hap2), y uno de los denominados mundialmente como “haplotipo raro” (Hap3). Este último se encuentra reportado en lugares muy distantes del cual fue hallado en nuestro país (Tay et al. 2017).

Si bien hay reportes de movimientos de esta especie en grandes trayectos (Nibouche et al. 1998), también existen indicios de aislamiento por distancia, implicando que las migraciones a las regiones cultivadas se dan por vuelos desde regiones linderas y

no desde regiones lejanas (Scott et al. 2005). En ese caso la dispersión a cortas distancias concordaría con el hallazgo de una alta variabilidad genética en las principales regiones productoras argentinas, en las cuales el paisaje se encuentra fragmentado en grandes áreas de monocultivo de soja y maíz, con parches de otros cultivos de menor importancia como alfalfa, arveja o garbanzo.

Helicoverpa armigera es una plaga que se encuentra reportada en los cinco continentes consumiendo plantas cultivadas como silvestres de 68 familias diferentes (Zalucki et al. 1986; Cunningham y Zalucki 2014). En India, varios reportes sugirieron que esta plaga podía ser categorizada en razas basándose en las preferencias alimentarias (Bhattacharjee 1972; Reed y Pawar 1982). Sin embargo, estudios posteriores no encontraron asociaciones significativas (Behere et al. 2007). El tiempo de desarrollo larval, el peso larval y pupal, la supervivencia y la fertilidad fueron evaluadas para una población brasilera del estado de Bahía mantenida en condiciones de laboratorio. Esa población no sobrevivió en maíz ni sorgo, pero mostró un buen “fitness” en cultivos de soja, algodón y poroto (Reigada et al. 2016). Sin embargo, Leite et al. (2014) hallaron dos poblaciones consumiendo maíz en el mismo estado (Bahía). Esto abre la posibilidad de existencia de genotipos asociados a determinado cultivo o rango de cultivos hospederos o una afinidad característica de cada población por una especie o rango de especies hospederas determinado.

La resistencia de *H. armigera* a cultivos transgénicos para el control de lepidópteros fue previamente reportada (Gunning et al. 2005; Xu et al. 2005). Este aspecto podría hipotéticamente otorgarle ventajas en el cultivo de maíz de nuestra región, ya que el 95% de la superficie se cultiva con materiales transgénicos Bt. Sin embargo, y a pesar de que el muestreo fue mayor en este cultivo considerando todos los lotes transgénicos evaluados, no fue hallada en maíz en el presente estudio. Estos resultados podrían deberse a que en la región el cultivo de maíz no es un nicho vacío ya que *H. zea* se encuentra muy presente logrando infestaciones mayores al 80% incluso en lotes Bt (Balbi y Flores 2015).

Si las poblaciones halladas en nuestro país fueran asociadas al cultivo de soja en particular, y teniendo en cuenta que aún se halla en bajas proporciones respecto de otras especies del género *Helicoverpa* en sí, resulta muy factible que haya escapado al muestreo realizado debido al número de muestras analizadas.

Las pérdidas económicas ocasionadas por *H. armigera* en Brasil en el periodo 2012-2014 fueron estimadas en 2 mil millones de dólares (Lopes-da-Silva et al. 2014; Reigada et al. 2016). Diversos estudios genéticos fueron realizados en el vecino país y la gran variabilidad genética encontrada tras identificar diversos linajes fundadores fue mayor a la esperada en todos los casos (Mastrangelo et al. 2014 y Leite et al. 2014). En el presente estudio, y a pesar de que el número de individuos estudiados fue bajo (n total=10), se constató una alta diversidad genética. Tanto la diversidad haplotípica como nucleotídica se asemejó en gran medida a la reportada por Tay et al. en 2017 tomando como referencia 97 haplotipos encontrados en todo el mundo considerando regiones parciales de los genes COI y Cit b concatenadas. Esto implica que las regiones de ADN seleccionadas en el presente estudio resultaron muy informativas y variables.

En concordancia con los análisis realizados por Leite et al. en 2014 en Brasil, *H. armigera* muestra signos de expansión en América del Sur. La presencia de la especie en nuestro país, reportada por primera vez en 2014, se evidencia tanto en la región norte de producción como en la región centro. Tras décadas de estudios genéticos, utilizando ADN mitocondrial para la reconstrucción filogeográfica, se asume que un haplotipo genético

podría representar un evento de incursión independiente (Ascunze et al. 2011; Goldstien 2011; Tay et al. 2017). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que podría existir más de un linaje maternal de *H. armigera* en Argentina y abren hipótesis de las posibles vías de entrada de esta plaga a este país que aún requieren ser testeadas.

4.6 Conclusiones

- El análisis de secuencias de ADN mitocondrial manifiesta la alta variabilidad genética de *H. armigera* en el país.
- La comparación de secuencias del ADNmt correspondientes al gen Cit b con muestras reportadas en otras partes del mundo indentifican dos haplotipos ampliamente distribuidos en el mundo (Hap 1 y Hap 2) y un haplotipo poco frecuente (Hap 3).
- El análisis a partir de secuencias concatenadas de regiones parciales de la COI y Cit b del ADN mitocondrial revela la presencia de 7 variantes genéticas. Esto sugiere que podría existir más de un linaje maternal de *H. armigera* en el país y brinda información valiosa para estudios de detección y vías de dispersión de esta plaga cuarentenaria.

CAPITULO 5

5.1 Cumplimiento de los objetivos propuestos

- Se logró caracterizar la composición en especies del complejo “*Heliothis - Helicoverpa*” en la región bajo estudio tanto de individuos adultos colectados mediante trampas de luz como de estados inmaduros colectados en los cultivos de interés (Capítulo 2).
- La técnica de PCR-RFLP utilizada resultó válida en la discriminación de especies del género *Helicoverpa* tanto en estado adulto como larval (Capítulos 2 y 3).
- Se identificaron caracteres morfológicos de relevancia taxonómica para la discriminación de *H. subflexa* y *H. stombleri* y los análisis moleculares permitieron posicionarlas filogenéticamente dentro del complejo estudiado (Capítulo 2).
- Fue posible la caracterización de la composición en especies del género *Helicoverpa* en cultivos de maíz, soja y alfalfa (Capítulo 3).
- Se constató la presencia de orugas del género *Helicoverpa* consumiendo maíces transgénicos para el control de lepidópteros (excepto en lotes Viptera) y su ausencia en soja transgénica Bt (Capítulo 3).
- Se realizó una aproximación filogeográfica de *H. armigera* mediante redes de haplotipos que aporta información sobre la variabilidad genética de esta especie en Argentina (Capítulo 4).
- Se identificaron haplotipos de *H. armigera* reportados en países cercanos como en países ubicados en otros continentes (Capítulo 4).

5.2 Conclusiones generales

- Las especies de la subfamilia Heliothinae que se encuentran en trampas de luz de la región central de Argentina corresponden a los géneros *Helicoverpa* (*H. zea*, *H. gelotopoeon*, *H. armigera*) y *Heliothis* (*H. virescens* y *H. subflexa*).
- *Heliothis subflexa* es una especie que no estaba reportada para la región central de nuestro país. Los estudios moleculares y de caracterización morfológica y genitálica realizados en esta Tesis constituyen una herramienta útil para su identificación.
- El análisis genético de *H. stombleri* a partir de ADN de origen mitocondrial y nuclear afirma que esta es una especie sinónima de *H. zea* y que no existe evidencia suficiente para reconocerla como otra especie.
- El cultivo de maíz es atacado por *H. zea* en toda la región centro, el daño se extiende incluso a lotes implantados con híbridos transgénicos para el control de lepidópteros, siendo el evento Viptera el único eficaz en su control dentro de los materiales evaluados.
- En los cultivos de soja y alfalfa la especie predominante es *H. gelotopoeon*. Estos cultivos sirven como hospederos alternativos u ocasionales de *H. zea*, la cual se halló en estas leguminosas en una baja proporción.
- La especie *H. armigera* fue encontrada en estado adulto mediante trampas de luz. Sin embargo, no fue hallada en estado larval sobre ninguno de los cultivos bajo estudio. El análisis molecular de esta especie reveló una alta variabilidad (7 variantes genéticas sobre un total de 10 individuos analizados), lo que abre interrogantes sobre sus vías de entrada y dispersión en el territorio argentino.

5.3 Futuras líneas de investigación

- Determinación de la variación de la frecuencia de cada especie del género *Helicoverpa* en los ambientes evaluados para una serie de tiempo que incluya condiciones climáticas diversas con fin de comprender cómo impactan estas condiciones al desarrollo de una u otra especie del género.
- Monitoreo de la frecuencia de especies que aún se encuentran en baja porporción en la región centro y que implican un riesgo a la actividad agrícola en el país (*H. armigera* y *H. virescens*).
- Incorporación de información biológica y molecular al estudio de *H. subflexa* y evaluación de implicancias relacionadas a la presencia de ésta en la dinámica de las restantes especies del complejo estudiado.
- Dilucidación del origen y sostenimiento en el tiempo de *H. stombleri*.
- Generación de información referida al ataque de *H. zea* en maíces transgénicos. Evolución de la resistencia. Determinación de mecanismos de resistencia simple y cruzada a las distintas toxinas Bt que se utilizan en Argentina.
- Ampliación del conocimiento sobre la potencialidad de daño de *H. armigera*, plaga cuarentenaria que se encuentra presente en la región productiva núcleo del país. Profundización en el estudio de las posibles vías de ingreso y monitoreo de su resistencia a insecticidas y toxinas Bt.

BIBLIOGRAFÍA

- Agresti, A. 1996. An introduction to categorical data analysis. Wiley, New York, 290 p.
- Albernaz, K.C., Silva-Brandao, K.L., Fresia, P., Consoli, F.L., Omoto, C. 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.
- ArgenBio: Consejo Argentino para la información y Desarrollo de la Biotecnología. 2018. Eventos y combinaciones de eventos aprobados en Argentina para su siembra, consumo y comercialización. Disponible en <http://www.argenbio.org/index.php?action=cultivos&opt=5>
- Arnemann, J. A., James, W. J., Walsh, T. K., Guedes, J. V. C., Smagghe, G., Castiglioni, E., y Tay, W. T. 2016. Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. Genetics Molecular Research 15(2).
- Arneodo, J. D., Balbi, E. I., Flores, F. M., Sciocco, A. 2015. Molecular Identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae) 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.
- Ascunce, M. S., Yang, C. C., Oakey, J., Calcaterra, L., Wu, W. J., Shih, C. J., Goudet J; Ross K.G. & Shoemaker, D. 2011. Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta*. Science 331, 1066–1068.
- Ávila, C.J., Viván L.M., Tomquelski G.V. 2013. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Circular técnica 23 EMBRAPA. 12 pp.
- Avisé, J. C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetic and systematics. Annual Review of Ecology, 18, 489-522.
- Avisé, J.C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Universidad de Harvard Press, Londres. 453 pp.
- Bado, S. G., Cerri, A. M., & Vilella, F. (2005). Fauna insectil asociada a cultivos de dos especies de *Physalis* (Solonaceae) en Argentina. En: Boletín Sanidad Vegetal, Plagas, 31, 321-333.
- Baker, T.C., S.A. Ochieng, A.A. Cossé, S.G. Lee, J.L. Todd, C. Quero, & N.J.A. Vickers. 2004. A comparison of responses from olfactory receptor neurons of *Heliothis subflexa* and *Heliothis virescens* to components of their sex pheromone. Journal of Comparative Physiology. 190(2), 155-165.
- Balbi, E. I. & Flores, F.M. 2015. Evaluación del daño causado por el “Cogollero de maíz” (*Spodoptera frugiperda*) y presencia de la “Isoca de la espiga” (*Helicoverpa zea*) en diferentes híbridos de maíz transgénico. En: Maíz Actualización 2015, INTA. 34, 21 – 26.
- Behere, G., Tay, W.T., Russel, D.A., Heckel, D.G. Appleton B.R. 2007. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. BMC Evolutionary Biology 7, 1:117.

- Behere, G.T., Tay, W.T., Russel, D.A., Batterham, P. 2008. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research* 98, 599–603.
- Benda, N.D., C. Brownie, C. Schal, F. Gould. 2011. Field observations of oviposition by a specialist herbivore on plant parts and plant species unsuitable as larval food. *Environmental Entomology* 40(6), 1478-1486.
- Bhattacharjee, N. S. *Heliothis armigera* (Hubner) a polytypic species. 1972. *Entomological Newsletter* 2, 3-4.
- Blanco, C.A.; Chiaravalle, W.; Dalla-Rizza, M.; Farias, J.R.; García-Degano, M.F.; Gastaminza, G.; Mota-Sánchez, D.; Murúa, M.G.; Omoto, C.; Pieralisi, B.K.; Rodríguez, Jairo; Rodríguez-Maciel, J.C.; Terán-Santofimio, H.; Terán-Vargas, A.P.; Valencia, Sandra Jimena; Willink, E. 2016. Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. *Current Opinion in Insect Science*, 15(1): 131-138.
- Bradshaw, W. E. & Holzapfel C. M. 2010. Insects at not so low temperature: Climate change in the temperate zone and its biotic consequences. En: *Low temperature biology of insects*. Denlinger, D. L. & Lee R. E. Cambridge University Press, 242 – 275.
- Campos de Melo, A. P., Fernandes, P. M., Neto, S., Ferreira, G. A., & Seleguini, A. 2017. First record of *Chloridea* (*Heliothis*) *subflexa* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) on cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Brazil. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(2), 267-272.
- Castellano, A.; Issaly, L.; Iturrioz, G.; Mateos, M. y Terán, J. 2009. “Análisis de la Cadena de la Leche en Argentina”. *Estudios Socioeconómicos de los Sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales N°4*, Ediciones INTA. ISSN 1852-4605.
- Cho, S., Mitchell, A., Regier, J. C., Mitter, C., Poole, R. W., Friedlander, T. P., Zhao, S. 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 (4), 650-656.
- Cho, S., Mitchell, A., Mitter, C., Regier, J., Matthews M., Robertson R. 2008. Molecular phylogenetics of heliothine moths (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae), with comments on the evolution of host range and pest status. *Systematic Entomology* 33, 581–594.
- Clement, M., D. Posada, K. A. Crandall. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657–1659.
- Cognato, A. I. 2006. Standard percent DNA Sequence difference for insects does not predict species boundaries. *Journal of Economic Entomology* 99 (4), 1037-1045.
- Common, I. F. B. 1953. The Australian species of *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) and their pest status. *Australian Journal of Zoology*, 1(3), 319-344.
- Cunningham, J. P. & Zalucki M.P., 2014. Understanding Heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) Pests: What is a Host Plant? *Journal of Economic Entomology* 107 (3), 881-896.
- Czepak, C., Cordeiro Albernaz, K., Vivan, L. M., Oliveira Guimarães h., Carvalhais T. 2013. First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Tropical* 43 (1), 110-113.

- De Guglielmo, C., Zoraya, M., & Fernandez Da Silva, R. 2016. Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18(2), 119-128.
- De Souza, B. R., Tay, W. T., Czapak, C., Elfekih, S., & Walsh, T. K. 2016. The complete mitochondrial DNA genome of a Chloridea (*Heliothis*) subflexa (Lepidoptera: Noctuidae) morpho-species. *Mitochondrial DNA Part A* 27(6), 4532-4533.
- Domínguez-Domínguez, O. & Vázquez-Domínguez, E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32, 59-70.
- Dowd, P.F. 2001. Biotic and Abiotic Factors Limiting Efficacy of Bt Corn in Indirectly Reducing Mycotoxin Levels in Commercial Fields. *Journal of Economic Entomology* 94 (5), 1067-1074.
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 11-15.
- Estoup, A. & Guillemaud T. 2010. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* 19, 4113-4130.
- Federici, B. 1998. Broadscale use of pest-killing plants to be true test. *California Agriculture* 52 (6) 14- 21.
- Firempong, S., & M. P. Zalucki. 1990. Host plant preferences of populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from different geographic locations. *Australian Journal of Zoology* 37, 665-673.
- Fitt, G. P. 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology* 34, 17-52.
- Fitt, G.P. 1991 Ecological studies of *Helicoverpa* species in cropping areas. En: Twine, P.H. & Zalucki, M.P., (Eds) A review of *Heliothis* research in Australia. Conference and workshop series. Queensland Department of Primary Industries, Brisbane 47-56.
- Frazier, M. R., Huey, R. B. and Berrigan, D. (2006). Thermodynamics constrains the evolution of insect population growth rates: "Warmer is better". *The American Naturalist* 168, 512-520.
- Gamundi, J.C., & Massaro R.A., 1995. Del ojómetro al paño vertical. *Boletín técnico INTA Oliveros*.
- Goldstien, S. J., Dupont, L., Viard, F., Hallas, P. J., Nishikawa, T., Schiel, D. R., Gemmill N.J., Bishop, J. D. 2011. Global phylogeography of the widely introduced North West Pacific ascidian *Styela clava*. *PLoS One* 6(2), e16755.
- Gould F., Anderson, A., Reynolds, A., Bumgarner L., Moar, W. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Economic Entomology* 88(6), 1545-1559.
- Gunning, R. V., Dang, H. T., Kemp, F. C., Nicholson, I. C., & Moores, G. D. 2005. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Applied and environmental microbiology* 71(5), 2558-2563.
- Hardwick, D. F. 1965. The corn earworm complex. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 97 (40), 5-247.
- Hardwick, D. F. 1970. The biological status of "*Heliothis stombleri*". *Canadian Entomology* 102, 339-341.
- Hennig, W. 1950. *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik*, Berlin: Deutscher Zentralverlag, 370 pp.

- Horner, T.A., Diveli, G.P., Herbert, A. 2003. Development, Survival and Fitness Performance of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in MON810 Bt Field Corn. *Journal of Economic Entomology* 96 (3), 914-924.
- Huang, F., Andow, D., Buschman, L.L. 2011. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 140,1-16.
- Huey, R. B. 2010. Evolutionary physiology of insect thermal adaptation to cold environments. En: *Low temperature biology of insects*. Denlinger, D. L. & Lee R. E. Cambridge University Press 223 -241.
- International Service for the acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. Disponible en <http://www.isaaa.org/>
- Jaenike, J. 1978. On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theory of Population Biology* 14, 350-356.
- Jallow, M. F., Cunningham, J. P., & Zalucki, M. P. 2004. Intra-specific variation for host plant use in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): implications for management. *Crop protection*, 23(10), 955-964.
- Jallow, M. F., & Matsumura, M. 2001. Influence of temperature on the rate of development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, 36(4), 427-430.
- Kriticos, D. J., Ota, N., Hutchison, W. D., Beddow, J., Walsh, T., Tay, W. T., Borchert, D.M., Paula-Moreas, S.V., Czapak, C. & Zalucki, M. P. 2015. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? *Plos One* 10(3), 1-24.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular and Biology Evolution* 33(7), 1870-4.
- Kurban, A., Yoshida, H., Izumi, Y., Sonoda, S. and Tsumuki., H. 2005. Pupal diapause of *Helicoverpa armigera*: sensitive stage for photoperiodic induction. *Applied entomology zoology* 40 (3), 457–460.
- Lanteri, A. A., Loiácono, M. S., Margaría, C. 2002. Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos. Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática PRIBES 2002. Costa, C., Vanin, S. A., Lobo J. M. & Melic, A. (Eds.), 207-220.
- Lanteri, A. A. & Confalonieri, V.A. 2004. Filogeografía: Objetivos, métodos y ejemplos. En: *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía* Llorente Bousquets J. & Morrone J.J.(Eds.) 185-193.
- Leigh, JW, Bryant D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.
- Leite, N.A., Alves-Pereira, A. Correa, A. S., Zucchi, M. I., Omoto, C. 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).
- Li, G., Wu, K., Gould, F., Feng, H., He, Z., Guo, Y. 2004. Frequency of Bt resistance genes in *Helicoverpa armigera* populations from the Yellow Rivercotton-farming region of China. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 112, 135–143.
- Li, Q.Q., Li, D.Y., Ye, H., Liu, X.F., Shi, W., Cao, N., Duan, Y.Q. 2011. Using COI gene sequence to barcode two morphologically alike species: the cotton bollworm and

- the oriental tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Biology Report* 38, 5107-5113.
- Liu, Z., Gong, P., Wu, K., Wei, W., Sun, J., Li, D. 2007. Effects of larval host plants on over-wintering preparedness and survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* 53, 1016–1026.
- Liu, F., Xu, Z., Zhu, Y. C., Huang, F., Wang, Y., Li, H., Li, H., Gao, C., Zhoua, W., Shena, J. 2010. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing *Bt* cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. *Pest Management Science* 66, 155–161.
- Liu, Z.D., Li, D.M, Gong, P.Y., Wu, K.J. 2004. Life table studies of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on different host plants. *Environmental Entomology* 33, 1570-1576.
- Liu, Z., Scheirs J., Heckel D.G. 2010. Host Plant Flowering Increases Both Adult Oviposition Preference and Larval Performance of a Generalist Herbivore. *Environmental Entomology* 39, 552-560.
- Lopes-da-Silva, M., Sanches, M., Stancioli, A., Alves, G. & Sugayama, R. 2014. The Role of Natural and Human-Mediated Pathways for Invasive Agricultural Pests: A Historical Analysis of Cases from Brazil. *Agricultural Sciences* 5, 634–646.
- Lowe, A., Harris, S., Ashton, P. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Wiley-Blackwell, 344 pp.
- Luttrell, R. G., Wan, L., Knighten, K. 1999. Variation in Susceptibility of Noctuid (Lepidoptera) Larvae Attacking Cotton and Soybean to Purified Endotoxin Proteins and Commercial Formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Journal Economic Entomology* 92 (1), 21-32.
- Maelzer, D.A., Zalucki, M. P. 1999. Analysis of long-term light-trap data for *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: the effect of climate and crop host plants. *Bulletin of Entomological Research* 89, 455–463.
- Margheritis, A. E., & Rizzo, H. F. 1965. *Lepidópteros de interés agrícola; orugas, isocas y otras larvas que dañan a los cultivos*, 197 pp.
- Martínez, J.A. 2018. *Perfil General del Municipio de Pergamino – Argentina*. Secretaría de Producción. Disponible en: <http://www.pergamino.gob.ar/wp-content/uploads/2018/04/PERFIL-PERGAMINO-PRODUCCION-2018.pdf>
- Mastrangelo, T., Paulo, D. F., Bergamo, L. W., Morais, E. G. F., Silva, M., Bezerra-Silva, G., & Azeredo-Espin, A. M. L. 2014. Detection and genetic diversity of a heliothine invader (Lepidoptera: Noctuidae) from north and northeast of Brazil. *Journal of economic entomology* 107(3), 970-980.
- Mitter, C., Poole, R. W., Matthews M. 1993. Biosystematics of the Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae) *Annual Review of Entomology* 38, 207-25.
- Morey, A.C., Hutchison W. D., Vennette R.C., Burkness E.C. 2012. Cold Hardiness of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Pupae. *Environmental Entomology* 41(1), 172-179.
- Murúa, M.G., Scalora, F.S., Navarro, F.R., Cazado L.E., Casmuz A., Villagrán M.E. 2014. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Florida Entomologist* 97, 854–856.
- Murúa, M. G., Cazado, L. E., Casmuz, A., Herrero, M. I., Villagrán, M. E., Vera, A., Soza-Gómez, D.R. y Gastaminza, G. 2016. Species from the Heliiothinae Complex (Lepidoptera: Noctuidae) in Tucuman, Argentina, an update of geographical distribution of *Helicoverpa armigera*. *Journal of insect science* 16(1), 61, 1-7.

- Navarro, F.R., Saini, E.D., Leiva, P.D. 2009. Clave pictórica de polillas de interés agrícola, agrupadas por relación de semejanza. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino e IMyZA-CNIA Castelar/ Facultad de Ciencias Naturales e Instituto “Miguel Lillo”, Universidad Nacional de Tucumán. 100 pp.
- Nibouche, S., Bues, R., Toubon, J.F., Poitout, S. 1998. Allozyme polymorphism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): comparison of African and European populations. *Heredity* 80, 438–445.
- Okumura, G. T., & W. R. Bauer. 1969. A new species of *Heliothis* resembling *Heliothis zea* (Boddie), corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae). Occasional Papers N°18, Bureau of Entomology, California Department of Agriculture, Sacramento, California. 8 pp.
- Oppenheim, S.J. & F. Gould. 2002. Behavioral adaptations increase the value of enemy-free space for *Heliothis subflexa*, a specialist herbivore. *Evolution* 56(4), 679-689.
- Petrabissi, Hernán. Boletín Agrometeorológico Mensual Febrero. 2018. INTA EEA Rafaela. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_rafaela_agrometeorologia_febrero_2018.pdf
- Pogue, M.G. 2013. Revised status of *Chloridea* Duncan and (Westwood), 1841, for the *Heliothis virescens* species group (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) based on morphology and three genes. *Systematic Entomology* 38(3), 523-542.
- 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: Heliothinae). *Annals of the Entomological Society of America* 2:1222-1226.
- Pratheepa, M., Verghese, A., Bheemanna, H. 2016. Shannon information theory a useful tool for detecting significant abiotic factors influencing the population dynamics of *Helicoverpa armigera* (Hübner) on cotton crop. *Ecological modelling*, 337, 25-28.
- Reed, W., Pawar C. S. *Heliothis*: A global problem. 1982. En: Proceedings of workshop on *Heliothis* management ICRISAT, Pantancheru, A.P. India. 9-14.
- Reigada, C., Guimarães, K. F., & Parra, J. R. P. 2016. Relative fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on seven host plants: a perspective for IPM in Brazil. *Journal of Insect Science*, 16(1).
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34, 3299-3302.
- Sacchi, O. 2010. Caracterización climática del área de la Cuenca del Arroyo del Medio. Boletín del Instituto de Fisiografía y Geología 72-75, 43-46. Rosario, 20-02-2010. ISSN 1666-115X.
- Salafia, A., Blanco P., Ventura, M. 2017. Informe regional agropecuario departamento Presidente Roque Saenz Peña. Enero N° 204, 1-6.
- SAS Institute Inc. 2015. Introducción a la programación en SAS® Studio 3.3. Cary, NC: SAS Institute Inc, 32 pp.
- Scataglini, M.A., Lanteri A.A., Confalonieri V.A. 2001. Origin of the Boll Weevil population of Argentina, Brazil and Paraguay: Hypothesis based on the study of two mitochondrial genes. Integrated pest management of the cotton boll weevil in Argentina, Brazil and Paraguay. Final International Workshop, 19-20.

- Scott, K. D., Wilkinson, K. S., Lawrence, N., Lange, C. L., Scott, L. J., Merritt, M. A., Lowe A. J. y Graham, G. C. 2005. Gene-flow between populations of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is highly variable between years. *Bulletin of Entomological Research*, 95(4), 381-392.
- SENAVE. SENAVE reafirma su autoridad en materia fitosanitaria. 2014. Available: <http://www.senave.gov.py/noticias-85-SENAVE-reafirma-su-autoridad-en-materia-fitosanitaria.html>. Consulta Diciembre 2014.
- Siegfried, B.D., RangasamyM., WangH., SpencerT., Haridas, C.V., TenhumbergB., SumerfordD.V., StorerN.P. 2014. Estimating the frequency of Cry1F resistance in field populations of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Pest Management Science* 70, 725-33.
- SIIA. Sistema integrado de información agropecuaria. 2015. Disponible en <http://www.sii.gov.ar/apps/sii/estimaciones/estima2.php> Acceso Mayo 2015.
- SINAVIMO. Red de monitoreo de *Helicoverpa armigera*. Disponible en www.sinavimo.org/monitoreo-helicoverpa-armigera. Acceso: Enero 2015.
- Slosser, J. E., Phillips, J. R., Herzog, G. A., Reynolds, C. R. 1975. Overwintering survival and spring emergence of the bollworm in Arkansas. *Environmental Entomology* 4, 1015-1024.
- Specht, A, Sosa-Gomez D.R., Vieira de Paula-Moraes, S. Cavaguchi Yano S.A. 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesquisa agropecuaria brasileira* 48 (6), 689-692.
- Stauffer, C. 2014. Feature-New threat to Brazil's breadbasket: a pesky caterpillar. *Market news*. Revista febrero 2014. Disponible en <https://www.reuters.com/article/brazil-agriculture-caterpillar/feature-new-threat-to-brazils-breadbasket-a-pesky-caterpillar-idUSL2N0LN1ML20140227>
- Stone, T. B. & Sims, S. R. 1993. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera:Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology* 86 (4), 989-994.
- Storey, K.B., Storey J.M. 1991. Biochemistry of cryoprotectants. En: Lee, Jr., R.E., Delinger, D.L. (Eds.), *Insect at Low Temperature*. Chapman & Hall, New York, pp. 64–93.
- Tabashnik, B. E., Gassmann A. J., Crowder D.W., Carriere Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology* 26, 199 -202.
- Tabashnik, B. E., Van Rensburg, J. B. J., Carrière, Y. 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *Journal of economic entomology*, 102(6), 2011-2025.
- Tabashnik, B. E., Huang, F., Ghimire, M. N., Leonard, B. R., Siegfried, B. D., Rangasamy, M., Yang Y., Wu Y., Gahan L. G., Heckel, D.G., Bravo, A.& Soberón M. 2011. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biotechnology*, 29(12), 1128 – 1133.
- Tabashnik, B. E., Van Rensburg, J.B.J., Carriere Y. 2012. Field-Evolved Insect Resistance to Bt Crops: Definition, Theory and Data. *Journal of Economic Entomology* 102 (6), 2011 – 2024.
- Tabashnik, B. E., Brévault T., Carriere Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology* 31, 510 -521.
- Tay, W. T., Soria M. F., Walsh T., Thomazoni D., Sielvé P., Behere G. T., Anderson C., Downes S .2013. A Brave New World for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Plos One* 8 (11), 1-7.

- Tay, W. T., Walsh, T. K., Downes, S., Anderson, C., Jermiin, L. S., Wong, T. K., Piper M. C., Chang E. S., Macedo I. B, Czepak C., Behere, G. T., Silvie P., Soria M. F., Frayssinet M., Gordon K. H .J. 2017. Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. *Scientific Reports* 7, 45302.
- Twine P.H & Evans M.L. 1991. Collecting immature and adults *Heliothis* for distribution, host, and parasite records. En: M.P. Zalucki (Ed.) *Heliothis: Research methods and prospects* 234 pp.
- Vachon, V. Laprade, R., Schwartz J.L. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111, 1-12.
- Velasco de Stacul, M. 1978. Ecología y comportamiento del complejo de *Heliothis* en la Region Chaqueña.
- Wu K. & Guo Y. 2004. Changes in susceptibility to conventional insecticides of a Cry1Ac-selected population of *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science* 60, 680-684.
- Xu, X., Yu, L., & Wu, Y. 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and environmental microbiology* 71(2), 948-954.
- Zalucki, M. P., Darglish G., Firempong S., Twine P.H. 1986. The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: What do we know? *Australian Journal of Zoology* 34, 779-814.
- Zhang, Q., Nachman, R. J., Denlinger, D. L. 2015. Diapause hormone in the *Helicoverpa/Heliothis* complex: A review of gene expression, peptide structure and activity, analog and antagonist development, and the receptor. *Peptides* 72,196-201.

ANEXO

Secuencias de la región parcial COI de *H. subflexa* correspondientes a la sección 2.4 que aún no se encuentran en NCBI

H. subflexa 1

TAGGTAACCCAGGATCTTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAAACTATTGTTACAGCT
 CATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGTGGGTTTGGAAATT
 GACTCGTACCTTTAATATTGGGAGCCCCGATATAGCTTTTCCACGTATAAATAATATAA
 GATTTTGATTATTACCCCATCTTTAACTTTATTAATTTCCAGAAGAATTGTAGAAAATG
 GAGCAGGAACAGGATGAACAGTTTATCCCCACTTTCATCTAATATTGCTCATGGTGGT
 AGTTCAGTAGATCTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCTGGAATTTCTTCTATTTTAGGAG
 CTATTAATTTTATTACTACTATTATTAATATAAAAATTAATAATTTATCTTTTGATCAAAT
 ACCTTTATTTATTTGAGCTGTAGGAATTACTGCATTTTATTATTACTATCTTTACCAGTT
 TTAGCAGGTGCTATTACAATACTTTTAAACAGATCGAAATTTAAATACATCTTTTTTTGAT
 CCTGCTGGAGGAGGTGATCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCATCCA
 GAAGTTTATATTTAATTTTACCTGGATTTGGTATAATTTCTCATATTATTTTACAAGAA
 AGAGGAAAAAAAGAAACATTTGGTTGTTTAGGAATAATTTATGCAATATTAGCTATTGG
 ATTATTAGGATTTATTGTTTGGAGCTCACCATATATTTACAGTAGGTATAGATATTGATAC
 TCGAGCT

H. Subflexa 2

TAGGTAATCCAGGATCTTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAAATACTATTGTTACAGCTC
 ATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTGGAACTG
 ACTTGTACCTTTAATATTAGGAGCCCCGATATAGCTTTCCACGTATAAATAATATAA
 GATTTTGATTATTGCCCATCTTTAACTTTACTAATTTCTAGAAGAATTGTAGAAAATG
 GAGCAGGAACAGGATGAACAGTTTATCCCCACTTTCATCTAATATTGCCATGGAGGT
 AGTTCAGTAGATCTAGCTATTTTCTCCCTTCATTTGGCTGGAATCTCTTCTATTTTAGGA
 GCTATTAATTTTATTACTACTATTATTAATATAAAAATTAATAATTTATCTTTTGATCAA
 ATACCTTTATTTATTTGAGCTGTAGGAATTACTGCATTTTATTATTATTATCTTTACCAG
 TTTTAGCAGGTGCTATTACAATACTTTTAAACAGATCGAAATTTAAATACATCTTTTTTTG
 ATCCTGCTGGAGGAGGTGATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACC
 CAGAAGTTTATATTTAATTTTACCTGGATTTGGTATAATTTCTCATATTATTTTACAAG
 AAAGAGGAAAAAAAGAAACATTTGGTTGTTTAGGAATAATTTATGCAATATTAGCTATT
 GGATTATTAGGGTTTATTGTTTGGAGCCACCATATATTTACAGTCGGTATAGATATTGAT
 ACTCGAGCTTATT