

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

## **Identificación molecular y caracterización del patrón de distribución de estados larvales de *Astaena pygidialis* kirsch (Coleoptera: Melolonthidae) en cultivos de aguacate cv. Hass en Antioquia, Colombia**

**Jesus David Rueda Reyes**

Trabajo de investigación para optar el título de **Magister en Biología**

### **Director:**

Sergio Andrés Marchant Rojas

Biólogo *Ph.D.*

### **Codirectoras del proyecto:**

Claudia María Holguín Aranzazu

Ingeniera Agrónoma *Ph.D.*

Tatiana Mallanin Rondón Salas

Ingeniera Agrónoma *M.Sc.*

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Biología**

**Maestría en Biología**

**Bucaramanga, Santander**

**2023**

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

## **Dedicatoria**

Sin duda alguna e inequívocamente a Dios por todas las bendiciones que me permitieron cumplir con este objetivo de ser magister en biología.

A mi amado hijo Christopher quien trajo a mi vida verdadero sentido.

A mi familia ya que su apoyo incondicional en todo momento ha sido indispensable en gran medida para cada uno de mis logros.

### **Agradecimientos**

Gran gratitud a mi director de tesis, el profesor Sergio y a las codirectoras Tatiana y Claudia por darme la oportunidad de participar en este enriquecedor proyecto de investigación como parte de mi formación y crecimiento profesional.

A todos los colaboradores operativos, administrativos y de investigación de AGROSAVIA por su constante ayuda durante mi estancia en el Centro de Investigación La Selva, en especial a Ovidio Montoya quien me acompañó a todas las salidas de campo y a Rosa Helen Mira por su gran apoyo de laboratorio de entomología.

Agradezco a mis estimadas colegas, compañeras de maestría y amigas Paulin Polanco y Leidy Pico, por su compañía, ayuda y todo el café compartido durante este proceso de formación.

Finalmente, son muchas las personas por las cuales fue posible el desarrollo y finalización de este proceso, tantas que posiblemente a muchas de estas no recuerde e inclusive otras cuantas de quienes nunca imaginé ni supe de su participación y aporte en mi proceso, sin embargo, a todas y cada una de esas personas, muchas gracias.

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

## Tabla de contenido

Introducción	12
1. Preguntas de investigación	17
2. Hipótesis	17
3. Objetivos	18
3.1.1 <i>General</i>	18
3.1.2 <i>Específicos</i>	18
4. Marco teórico	19
4.1.1 <i>Importancia del cultivo de aguacate en Colombia</i>	19
4.1.2 <i>Distribución espacial de insectos</i>	20
4.1.3 <i>Los escarabajos como plagas de cultivos</i>	21
4.1.4 <i>Familia Melolonthidae</i>	22
4.1.5 <i>Subfamilia Melolonthinae</i>	24
4.1.6 <i>Género Astaena</i>	26
4.1.7 <i>Astaena pygidialis Kirsch</i>	26
4.1.8 <i>Efecto de A. pygidialis kirsch en cultivos de aguacate tipo Hass</i>	27
4.1.9 <i>Métodos de diagnóstico del grupo</i>	28
4.1.10 <i>Código de barras genético o "barcoding"</i>	29
5. Materiales y métodos	30
5.1.1 <i>Sitios de estudio y diseño de muestreo espacial</i>	30
5.1.2 <i>Abundancia e identificación de larvas.</i>	33
5.1.3 <i>Caracterización física y química del suelo y relación con la abundancia de las larvas de A. pygidialis.</i>	36
5.2.1 <i>Muestreo de larvas de A. pygidialis Kirsch en hospederos alternos.</i>	37

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

5.2.2	Análisis estadístico de hospederos de larvas de <i>A. pygidialis</i> Kirsch.	38
5.3.1	Obtención de larvas y adultos de <i>A. pygidialis</i> Kirsch	38
5.3.2	Extracción y amplificación de ADN.	39
5.3.3	Identificación molecular de especies.	40
6.	Resultados	41
6.1.1	Identificación morfológica de larvas	41
6.1.2	Análisis de abundancia y patrón de distribución espacial.	43
6.1.3	Patrón de distribución espacial.	44
6.1.4	Relación del suelo en la abundancia de larvas.	46
6.2.1	Determinación de hospederos de larvas de <i>A. pygidialis</i> Kirsch en campo.	50
6.3.1	Extracción y amplificación del ADN.	55
6.3.2	Identificación molecular de especies.	60
7.	Discusión.	70
7.1.1	<i>Distribución espacial</i>	70
7.1.2	<i>Relación del suelo en la incidencia de larvas</i>	71
7.1.3	<i>Determinación de hospederos de larvas de A. pygidialis Kirsch en campo</i>	73
7.2.1	<i>Extracción y amplificación del ADN</i>	74
7.2.2	<i>Identificación molecular de especies</i>	75
8.	Conclusiones	80
	Apéndices	104
	Apéndice A. Línea base del área de estudio	104
	Apéndice B. Físicas y químicas de los puntos de muestreo	112

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### Listado de figuras

Figura 1. Aspecto general del melolontido <i>Phyllophaga obsoleta</i>	25
Figura 2. Ubicación geográfica de las áreas de estudio	31
Figura 3. <i>Puntos de muestreo dentro de las unidades productivas</i>	33
Figura 4. <i>Larva del género Astaena</i>	34
Figura 5. Caracteres morfológicos para identificación de marceños	42
Figura 6. Variación espacio temporal de larvas <i>Astaena pygidialis</i>	44
Figura 7. Mapas de Contornos de densidades de <i>Astaena pygidialis</i> en 4 unidades productoras de aguacate y dos fechas de colecta	45
Figura 8. Matriz de correlación de Pearson entre variables	47
Figura 9. Relación abundancia de larvas con propiedades del suelo	48
Figura 10. Varianza de larvas <i>Astaena</i> respecto hospedero alternativo	52
Figura 11. Varianza de larvas respecto plantas hospederas alternas en los cultivos de aguacate	54
Figura 12. <i>ADN genómico de larvas y adultos</i>	57
Figura 13. <i>Amplicones del gen mitocondrial COI</i>	58
Figura 14. Gap de distancias genéticas intra e inter específicas	62
Figura 15. Gap y estimación de especies	63
Figura 16. Árbol de máxima verosimilitud (ML)	65
Figura 17. Árbol de inferencia bayesiana	69
Figura 18. Porcentaje de macroporos	106
Figura 19. Densidad aparente	107
Figura 20. Potencial de hidrogeno (pH)	108
Figura 21. Conectividad eléctrica	109

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

Figura 22. Contenido de humedad	110
Figura 23. Varianza de temperatura	114
Figura 24. Varianza de humedad	115
Figura 25. Varianza potencial de hidrógeno (pH)	116
Figura 26. Varianza conductividad eléctrica	117
Figura 27. Varianza contenido de arenas	118
Figura 28. Varianza contenido de limo	119
Figura 29. Varianza contenido de arcilla	120

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### Listado de tablas

Tabla 1. Ubicación y características de unidades de muestreo en fincas ubicadas en el Oriente Antioqueño.	31
Tabla 2. Abundancia de larvas de <i>Astaena</i> y marceños capturados	43
Tabla 3. Poder explicativo y significancia de modelos lineales	50
Tabla 4. Abundancias de <i>A. pygidialis</i> Kirsch en hospederos adyacentes	51
Tabla 5. Número de acceso Genbank de larvas de marceños	59
Tabla 6. Número promedio de sustituciones por sitio entre los grupos	61
Tabla 7. Caracterización física y química de suelos	105
Tabla 8. Temperatura, humedad, potencial de hidrogeno (pH) y Conductividad eléctrica (C.E) del suelo de las unidad productiva. Media y desviación estándar.	113

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### Listado de apéndices

- Apéndice A. Línea base del área de estudio.
- Apéndice B. Físicas y químicas de los puntos de muestreo.

## Resumen

**Título:** Identificación molecular y caracterización del patrón de distribución de estados larvales de *Astaena pygidialis* Kirsch (Coleoptera: Melolonthidae) en cultivos de aguacate cv. Hass en Antioquia, Colombia<sup>1\*</sup>

**Autor:** Jesús David Rueda Reyes<sup>2\*3\*</sup>

**Palabras Clave:** Barcoding, Marceños, Aguacate Hass, Edáfico, Hospedero.

### Descripción:

La composición de comunidades vegetales, hábitats, microclimas y propiedades del suelo inciden en la distribución de las especies. Estos aspectos son un componente de alto valor en agricultura de precisión que permiten establecer medidas de manejo y control de plagas en cultivos. La exportación de aguacate cv. Hass en Colombia ha crecido significativamente debido a una alta demanda en mercados como Europa y Estados Unidos. El departamento de Antioquia es uno de los principales productores, sin embargo, recientemente el escarabajo *A. pygidialis* Kirsch se ha identificado alimentándose de hojas y frutos jóvenes, generando lesiones en la corteza de la fruta que imposibilitan su exportación. El desarrollo de métodos de monitoreo y control para esta plaga actualmente es limitado, ya que se desconocen los factores que inciden en la distribución de los estados larvales del insecto en cultivos de aguacate, además de la dificultad para la identificación de estadios inmaduros. Por ende, en 4 lotes o Unidades Productivas Comerciales ubicados en el oriente Antioqueño, se determinó el patrón de distribución espacial, relación física y química del suelo con abundancia de larvas y la incidencia de plantas hospedantes y hospederos adyacentes en relación con la presencia de larvas. Además, se evaluó la efectividad de la identificación de estados larvales mediante código de barras genético. Los resultados de los análisis de distribución evidenciaron un patrón de distribución agregado, identificando que la humedad, conductividad eléctrica y pH en uno de tres lotes (UPC D) estaban significativamente asociadas a las mayores abundancias de larvas de *A. pygidialis*. El hospedante predominante fue el pasto kikuyo y junto con las malezas cadillo y siempre viva tuvieron un efecto significativo en la abundancia de larvas *A. pygidialis*. Finalmente, el análisis del código de barras genético presentó un buen desempeño, recuperando todas las especies de marceños de referencia y agrupando como un solo clado 4 de las 5 secuencias de ejemplares *A. pygidialis*. Los resultados de este estudio permiten concluir que este método es una alternativa viable de identificación de larvas a nivel de especie.

---

<sup>1\*</sup> Trabajo de Grado

<sup>2\*\*</sup> Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Sergio Marchant Rojas. Biólogo Marino Ph. D. Codirectora: Claudia María Holguín Aranzazu. Ingeniería Agronómica Ph. D.

<sup>3</sup>Codirectora: Tatiana Mallanin Rondon Salas. Ingeniería Agronómica Ms. C.

## Abstract

**Title:** Molecular identification and pattern distribution characterization of *Astaena pygidialis* Kirsch larvae stages [Coleoptera: Melolonthidae] in Hass Avocado crops from Antioquia, Colombia<sup>4\*</sup>

**Author:** Jesús David Rueda Reyes<sup>\*\*</sup>

**Key Words:** Barcoding, White grubs, Hass Avocado, Edaphic, Host.

### Description:

The composition of plant communities, habitats, microclimates, and soil properties affect species distribution. These aspects are highly valued in precision agriculture, allowing pest management and control measures in crops. Avocado cv. Hass exportation in Colombia has grown significantly due to high demand in markets such as Europe and the United States. The department of Antioquia is one of the leading producers. However, the *A. pygidialis* Kirsch beetle has recently been identified as feeding on leaves and young fruits, causing lesions on the fruit skin that make it impossible to export. The development of monitoring and control methods for this pest is currently limited since the factors that influence the distribution of the larval stages of the insect in avocado crops are unknown, in addition to the difficulty in identifying early stages. Therefore, in 4 plots or Commercial Production Units located in eastern Antioquia, the spatial distribution pattern, physical and chemical soil relationship with larval abundance, and the incidence of host plants and adjacent hosts in relation to the presence of larvae were determined. In addition, the effectiveness of identifying larval stages by genetic barcode was evaluated. Data analysis showed an aggregate distribution pattern, identifying that humidity, electrical conductivity, and pH in one of three plots (UPC D) were significantly associated with a higher abundance of *A. pygidialis* larvae. Kikuyo grass was the predominant plant host along with Cadillo and Siempre Viva weeds showing significantly higher *A. pygidialis* larvae abundance. Finally, the analysis of the genetic barcode presented a good performance, recovering all the reference Marceño species and clustering the 4 of 5 sequences of *A. pygidialis* specimens as a single clade. The results of this study allow us to conclude that this method constitutes a viable alternative for identifying larvae at the species level.

---

<sup>4\*</sup> Degree work

<sup>\*\*</sup> Science faculty. Escuela de Biología. Director: Sergio Marchant Rojas. Biólogo Marino Ph. D.

Co-director: Claudia María Holguín Aranzazu. Ingeniería Agronómica Ph. D.

Co-director: Tatiana Mallanin Rondon Salas. Ingeniería Agronómica Ms. C.

### Introducción

Los sistemas agrícolas presentan arreglos variables de suelos, hábitats, microclimas y comunidades de plantas que inciden en la distribución de especies de insectos y microorganismos (Sciarretta y Trematerra 2014). Algunas especies pueden distribuirse de acuerdo con su preferencia a características específicas del suelo, planta hospedera, y/o reflejar el resultado de interacciones con otras especies, por lo que conocer sus patrones de distribución en sistemas agrícolas es un tema de creciente interés para la ecología y el manejo de plagas y enfermedades. En literatura se han descrito múltiples ejemplos de especies con distribuciones agregadas, incluyendo a comunidades de nematodos fitoparásitos que son más abundantes en suelos con tamaños de poro superiores a 1000  $\mu\text{m}$  (Briar et al., 2011), al cucarrón plaga de cultivos de alfalfa *Hypera postica* que se encuentra en zonas de alta humedad (Moradi-Vajargah et al., 2011), el coleóptero *Diaprepes abbreviatus* que es más abundante en suelos con bajas concentraciones de magnesio y calcio (Li et al., 2004) y, los escarabajos de la especie *Oreina elongata* que mostraron preferencia por determinados hospederos en ensayos experimentales (Ballabeni et al., 2001). Estos hallazgos, han sentado las bases para el desarrollo de nuevas alternativas para el monitoreo y control de plagas y enfermedades en diferentes cultivos, conocido como manejo integrado de plagas por sitio específico (Plant et al., 2001; Karimzadeh et al., 2011; Sciarretta y Trematerra 2014), un componente importante de la Agricultura de Precisión.

El conocimiento de la ecología y distribución espacial de plagas permite predecir cómo, cuándo y dónde se debe establecer el control fitosanitario. En cultivos de papa, la identificación y tratamiento localizado de las plagas *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae* y *Empoasca fabae* ha permitido usar entre 30 y 40% menos de pesticida que prácticas tradicionales de aspersión total

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

del cultivo (Weiz et al., 1996). En ese sentido, estudios que promueven alternativas de manejo por sitio-específico no solo reducen costos de producción, sino que también ofrecen otros beneficios. En Colombia, el desarrollo de estrategias de manejo de sitio-específico de plagas son escasas pero promisorias. En cultivos de caña, la caracterización del lepidóptero *Diatraea* sp. permitió conocer su distribución espacial de forma agregada en los bordes del cultivo y determinar las edades de cultivo en que son más susceptibles al daño; información de utilidad para el diseño de métodos de monitoreo y mitigación específicas y eficientes para este insecto (Leyton-Flor et al., 2018). Experiencias similares fueron probadas en el cultivo de guayaba con resultados satisfactorios para monitoreo y control de plagas (Pinchao y Carabali, 2019).

La producción del cultivo de aguacate, cultivar (cv.) Hass (*Persea americana* Mill), ha crecido de manera significativa en Colombia en los últimos años debido a una alta demanda de este producto principalmente en Estados Unidos y Europa (AGRONET 2022). Antioquia es uno de los 15 departamentos productores de esta variedad de aguacate (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia 2018), con 16.004 hectáreas sembradas en el año 2020 (AGRONET 2022). Sin embargo, la presencia de plagas y enfermedades es uno de los factores limitantes para la producción y comercialización del fruto. En este departamento, los escarabajos marceños (Scarabaeidae: Melolonthinae), denominados de esta manera por la emergencia de los adultos en épocas de lluvia en marzo (Londoño et al., 2014), son de particular interés, porque se alimentan de hojas jóvenes y frutos de aguacate, esto afecta el valor del fruto en mercados locales e imposibilita la exportación a mercados internacionales por el daño cosmético que causan a la fruta, llegando a generar pérdidas entre el 40 y 60% (Londoño 2014; Arias et al., 2019). En específico, el agente causal del daño en frutos, *Astaena pygidialis* Kirsch, fue identificado recientemente (Holguín y Neita 2018, Holguín y Mira, 2021), por lo que la generación de métodos de monitoreo

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

y control para esta especie representan un importante aporte para la cadena de producción de aguacate cv. Hass en el departamento de Antioquia.

*Astaena* es uno de los géneros de los escarabajos marceños que son considerados plaga de impacto económico en diferentes regiones del país. En cultivos como café, maíz, pastizales, yuca, entre otros, se han encontrado sus larvas de manera agregada con abundancias desde 1 a 36 larvas/m<sup>2</sup> (Pardo-Locarno et al., 1999; Pardo-Locarno et al., 2007). Sus larvas son abundantes hasta los 15 cm de profundidad (Pardo-Locarno et al. 2003b), en un rango de temperatura del suelo entre 22.7 °C a 24.7 °C y humedad cercana al 80% (Garcia-Atencia et al., 2015). En frutales perennes como la fresa, del 30% de los recursos asignados a control de plagas, cerca del 17% son para el manejo de escarabajos marceños (larvas y adultos), lo que representa gastos de 49 millones de pesos por hectárea al año (Bernal 2011). Sin embargo, en aguacate el daño es ocasionado por los adultos y para el caso de los estados inmaduros se desconoce la estrategia de establecimiento en el cultivo ya que no se ha evidenciado alimentación de las larvas en las raíces de la planta (Londoño, 2014; Holguín y Neita 2018). Estudios recientes indican la asociación de las larvas de este escarabajo con otros hospedantes cercanos al cultivo de aguacate como pastos (Holguín y Neita, 2018, 2019). No obstante, aún se requiere mayor evidencia para confirmar esta asociación, así como la relación de los estadios larvales con otros factores (p. ej. tipo suelo), que puedan predecir la presencia de la plaga en cultivos de aguacate de la región. Por esta razón, en aguacate cv. Hass, a pesar de los avances en el reconocimiento de la distribución del daño de esta plaga en campo (Arias et al., 2019) y efectos en el cultivo (Londoño 2014, Holguín y Neita 2018, 2019, Holguín y Mira 2021), el desarrollo de métodos de monitoreo y control sigue siendo insuficiente (Arias et al., 2020), necesidad agravada por la dificultad en la identificación de estados larvales

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

que precisan de personal altamente calificado y el mantenimiento de las larvas hasta la adultes (Pardo-Lorcano 2000, Pardo-Lorcano et al. 2002a, 2002b).

La identificación de larvas de *Astaena* a nivel de especie es un proceso lento que, debido a la falta de caracteres diagnósticos macroscópicos en estados tempranos, requiere del montaje de crías para su diagnóstico en etapas adultas (Bran 2005, Palacio 2010). Las larvas de *Astaena* se reconocen morfológicamente porque carecen de la zona estriduladora ventral, y la lacinia y la galea mandibular están separadas distalmente y fusionadas proximalmente, con un punto sensorial en la sección dorsal del artejo antenal final y la apertura anal puede ser en forma angulosa o de Y (Ritcher 1966). En estado larval, solo es posible identificar efectivamente este grupo hasta género por su abertura anal en forma de Y (Pardo-Lorcano et al., 2002b). Debido a esto, el diagnóstico molecular a partir de muestras de tejido se propone como una opción oportuna y eficiente para la identificación de conoespecíficos del género (Magoga et al., 2018), siendo los genes mitocondriales buenos candidatos para su uso como códigos de barras.

El uso del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (*COI*) como código de barras para la identificación de especies ha mostrado una alta capacidad para distinguir especies estrechamente relacionadas (Harvey et al., 2003), asociar especímenes desconocidos con especies conocidas y facilitar la identificación, particularmente en especies crípticas o especies con morfología compleja (Frezal y Leblois 2008). Su efectividad se basa en la existencia de una brecha (o “gap” en inglés) en las distancias genéticas entre especies, sin un solapamiento de las distancias genéticas intraespecíficas con las interespecíficas (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2004; Barrett y Hebert 2005; Casiraghi et al., 2010). Estudios en aves y algunos artrópodos, incluidas las arañas, han respaldado la existencia de esta brecha (Hebert et al., 2004; Barrett y Hebert 2005; Hajibabaei et al., 2006). Además, otros estudios han validado el uso de códigos de barras de ADN para asignar

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

etapas larvales a adultos (Miller et al., 2005; Ahrens et al., 2007; Sipek y Dirk 2011; Mgocheki et al., 2012), en la identificación de lepidópteros (Hebert et al., 2003a; Hajibabaei et al., 2007), escarabajos (Hendrich et al., 2014), pulgones (Hemiptera) (Rui et al., 2013), dípteros (Wallman y Donnellan 2001; Harvey et al., 2003), y arañas (Barrett y Hebert 2005). Debido a esto, evaluar la efectividad de esta metodología en la identificación de larvas de marceños es una oportunidad para apoyar y acelerar el diagnóstico de esta plaga en cultivos de aguacate.

Con base en los antecedentes mencionados, la caracterización de la distribución espacial de *A. pygidialis* y su relación con factores de suelo y tipo de hospedante se presenta como un paso importante y necesario para el desarrollo de estrategias de monitoreo y manejo de esta plaga. Se espera que la generación de información útil basada en métodos de Agricultura de Precisión para el monitoreo y control de esta especie, permitirán aumentar los rendimientos y disminuir el impacto ambiental ocasionado por técnicas de control de plagas generalistas, proceso que se verá acelerado por la implementación de un método de diagnóstico basado en el ADN de estados inmaduros de este insecto.

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

## 1. Preguntas de investigación

1. ¿Las características del suelo y el tipo de hospederos pueden explicar la abundancia y distribución de larvas de *A. pygidialis* Kirsch en cultivos de aguacate?
2. ¿Es el uso de códigos de barra del ADN es una estrategia efectiva para la identificación de larvas de *A. pygidialis* en cultivos de aguacate?

## 2. Hipótesis

La abundancia de larvas de *A. pygidialis* Kirsch en suelo se puede explicar por factores físicos y químicos del suelo.

El uso de códigos de barras de ADN acelera el proceso de identificación de *A. pygidialis* Kirsch en cultivos de aguacate.

### 3. Objetivos

#### 3.1.1 *General*

- Contribuir al desarrollo de métodos para la identificación y monitoreo de *Astaena pygidialis* Kirsch en estados larvales presentes en cultivos de aguacate.

#### 3.1.2 *Específicos*

- Caracterizar el tipo de distribución espacial de larvas de *A. pygidialis* Kirsch y su relación con factores físicos y químicos del suelo en cultivos de Aguacate Hass.
- Determinar hospederos alternos y su incidencia en la presencia de larvas de *A. pygidialis* Kirsch en cultivos de Aguacate Hass.
- Evaluar la efectividad del uso de código de barras de ADN en la identificación de *A. pygidialis* Kirsch en estados de desarrollo tempranos.

### 4. Marco teórico

#### 4.1.1 *Importancia del cultivo del aguacate en Colombia*

De acuerdo con datos del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), el aguacate es el tercer frutal más importante del país y su cultivo, el de mayor crecimiento por la amplitud del rango altitudinal (0 a 2500 msnm) en el que puede ser cultivado con fines comerciales (Mejía 2015). En 2010 en Colombia habían 21.590 ha cultivadas, los departamentos del Eje Cafetero y Antioquia los de mayor crecimiento por la alta demanda del aguacate cv. Hass, principal variedad de exportación (Vega 2012). Desde el 2014 hasta el 2017 el área sembrada de cv. Hass en el país aumentó en un 40% (FINAGRO 2018, Granados y Valencia 2018), con un incremento de 190 veces pasando de 20 toneladas exportadas en la temporada 2008 y 2009, a 3800 toneladas en la cosecha del 2014-2015 (Mejía 2015), con un crecimiento que ha sido sostenido. Durante el 2017 se presentó, respecto al año anterior, un incremento del 9% en las exportaciones (FINAGRO 2018, Granados y Valencia 2018). Para el 2020 el departamento de Antioquia pasó a ser el principal productor de Aguacate en el país con 16.000 ha cultivadas y una producción de 290.000 t (AGRONET 2022). Sin embargo, la tendencia de crecimiento en la producción y exportación del aguacate puede verse gravemente afectado cuando no se cuentan con medidas eficientes en el control y manejo de plagas como *A. pygidialis* Kirsch, un escarabajo que afecta directamente la estética de los frutos, imposibilitando su exportación (Holguín y Neita 2018).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### 4.1.2 *Distribución espacial de insectos*

La distribución geográfica de los insectos está mayoritariamente mediada por disponibilidad de alimento y la capacidad de soportar las condiciones ambientales (Schowalter 2016). La temperatura, disponibilidad de agua y características químicas del ambiente son los principales promotores o limitantes de la supervivencia de insectos (Curry 1994), los cuales debido a su relativamente elevada proporción área-volumen, tienden a vivir en microhábitats que minimizan las fluctuaciones ambientales, habitando refugios como madera, hojarasca y suelo (Seastedt y Crossley 1981). En consecuencia, los insectos frecuentemente presentan patrones de distribución agregados como ha sido evidenciado en varios estudios realizados en nematodos (Briar et al., 2011), sinfilidos (Johnson et al., 2013), dípteros (Benefer et al., 2016) y muchos escarabajos como especies de los géneros *Oreina* (Ballabeni et al., 2001), *Hypera* (Moradi-Vajargah et al., 2011) y *Diaprepes* (Li et al., 2004) entre muchos otros casos. Sin embargo, la distribución agregada no es una constante para todos los insectos, observándose en algunos grupos un rango de tolerancia amplio, con especies que pueden sobrevivir en condiciones gélidas de -50 °C (Lee et al., 2006) y otros grupos a temperaturas altas de hasta 50 °C (Whitford 1992).

Para los insectos que desarrollan completa o parcialmente sus ciclos de vida en el suelo, su distribución puede estar fuertemente relacionada a las características físicas y químicas del suelo. Algunos ejemplos incluyen la humedad, puede influir en el lugar y la cantidad de huevos depositados (Allsopp et al., 1992, Brill et al., 2013), el contenido de humus o profundidad del horizonte A en el suelo (Hann et al., 2015), las concentraciones de algunos elementos como Mg, Ca, Fe (Li et al., 2004) y los hospederos, que se refleja como un cambio en la abundancia dependiendo de la preferencia del insecto hacia sus hospederos (Pardo-Locarno et al., 2003).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### 4.1.3 *Los escarabajos como plagas de cultivos*

Mantener y cuidar los cultivos es muy importante pues aportan alimento, contribuyen al desarrollo cultural y crecimiento demográfico (Bellwood 2011; Fuller y Castillo 2015). Una estrategia para la manutención y cuidado de cultivos es estudiar y reconocer los patrones de distribución espacial de las plagas para la toma de decisiones en el control de estas (Hughes 1996). El manejo por sitio específico es efectivo para el control de plagas, como se evidenció con el escarabajo *Plectorias aliena* el cual, a través de estudios sobre su ecología y distribución espacial, lograron diseñar medidas de control para disminuir el daño en plantaciones de papa dulce (Brill et al., 2013). Aunque las medidas de manejo que han sido empleadas hasta hoy en cultivos son muy variadas, tales como el uso de pesticidas (Oberemok et al. 2015), control biológico y rotación de cultivos (Akter et al., 2019) entre otras; las estrategias diseñadas partiendo de la biología de las especies, como el uso de luz UV para afectar la orientación y navegación de los insectos (Fennell et al., 2019) pueden ser más efectivas, teniendo en cuenta que la mayoría de las medidas de control no son especie-específicas, por lo que se pueden estar afectando otros grupos con importantes roles ecológicos como la polinización y el ciclo de nutrientes (Brown et al., 2010; Oberemok et al., 2015; Chagnon et al., 2015).

Los insectos son el grupo biológico con mayor riqueza de especies, entre 850.000 y 1.000.000 de especies descritas actualmente, dentro de las cuales, alrededor de 400.000 corresponden al orden Coleóptera en el que se agrupan todos los escarabajos (Stork 2009); algunos de estos, tanto sus larvas como adultos, pueden producir daños a los cultivos, los primeros alimentándose de las raíces y los últimos de hojas y frutos, así como también afectando granos almacenados (Levine y Oloumin-Sadeghi 1996, Cao et al., 2002). Los escarabajos pueden afectar

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

además el sabor, color y aroma de los productos (Grimaldi y Engel 2005), generando daños que se pueden traducir en pérdidas económicas multimillonarias (Oliveira et al. 2014). En Colombia, datos de la Cooperativa de Cultivadores de Fresa de Soratá, indican que aproximadamente el 20% del costo asociados al cultivo de fresa son destinados al control de plagas y enfermedades, de los cuales; cerca del 17% son para el manejo de escarabajos Melolontidos, lo que representa 49 millones de pesos por hectárea al año (Bernal 2011).

En cultivos de aguacate (*Persea americana* cv. Hass) del departamento de Antioquia, se ha evidenciado daño de frutos y hojas por parte de Melolonthidos, cuyo daño presenta una distribución similar a la aleatoria que va desde los bordes hacia el centro de los cultivares, con pérdidas de entre 120 y 380 USD (Arias et al., 2020). En el caso concreto del Marceño *A. pygidialis* Kirsch, los adultos se alimentan de las hojas jóvenes y la cáscara de los frutos en primeras fases de desarrollo (Holguin y Neita 2018, Holguin y Mira 2021), lo que representa una limitante para la exportación del fruto a mercados de Europa y Estados Unidos. Es importante destacar que, aunque el estadio larval de *A. pygidialis* no ocasiona daños directos en las raíces o frutos del aguacate, comprender la distribución espacial de las larvas en el cultivo se presenta como una estrategia para el control efectivo de esta plaga. Este conocimiento contribuirá a la implementación de medidas preventivas y correctivas dirigidas a minimizar el impacto económico y a garantizar la calidad de los cultivos destinados a la exportación, fortaleciendo así la sostenibilidad y competitividad del sector agroindustrial.

### **4.1.4 Familia Melolonthidae**

La familia Melonthidae, es un grupo descrito inicialmente por Endrödi en 1966 con representación en casi todas las regiones biogeográficas, con alrededor de 1800 especies dentro de

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

la familia. Presentan coloración variada y tallas que van desde los 3 y 170 mm, frecuentemente con dimorfismo sexual y con larvas de tipo escarabeiforme. Son reconocidos ampliamente por su dieta fitófaga o fitosaprófaga, donde los adultos consumen secreciones, restos o tejidos vegetales y los estados inmaduros usualmente son xilófagas, rizófagas o fitosaprófagas (Cherman y Morón 2014). En la actualidad, la validez de esta clasificación es debatida ya que algunos autores, guiados por la clasificación realizada por Lawrence y Newton en 1995, reconocen este grupo como subfamilia de Scarabaeidae y dentro del grupo Pleurosticti (subfamilias fitofagas). Otros autores siguen la clasificación hecha por Balthasar en 1963 y modificada por Paulian en 1988, en la que Pleurosticti es considerada familia y Melolonthidae una subfamilia de esta. Sin embargo, en Latinoamérica se sigue la clasificación hecha por Endrodi en 1966 y modificada por Morón en 1997, donde Melolonthidae es una familia. Esta clasificación es ampliamente utilizada por los especialistas del grupo en la región (Cherman y Morón 2014), y como no es objetivo de esta investigación dilucidar dichas relaciones filogenéticas, este proyecto tomará como referencia la clasificación tradicional para Latinoamérica.

En el país se tienen registradas aproximadamente 580 especies pertenecientes a esta familia (Restrepo-Giraldo et al., 2003). De las 113 especies para Antioquia, alrededor de 50 especies son registradas en el oriente antioqueño (Vallejo y Orduz 1996). Las especies fitófagas de este grupo presentan ciclos de vida anuales o bianuales, y en algunos casos grandes explosiones poblacionales de adultos hacia las temporadas lluviosas (principalmente los meses de abril a mayo en Latinoamérica), coincidiendo con la proliferación y crecimiento de plantas, como también con la renovación foliar, esta última propiciada por las condiciones ambientales favorables (Carrillo y Morrón 2003, Martínez-Hernández et al., 2010).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

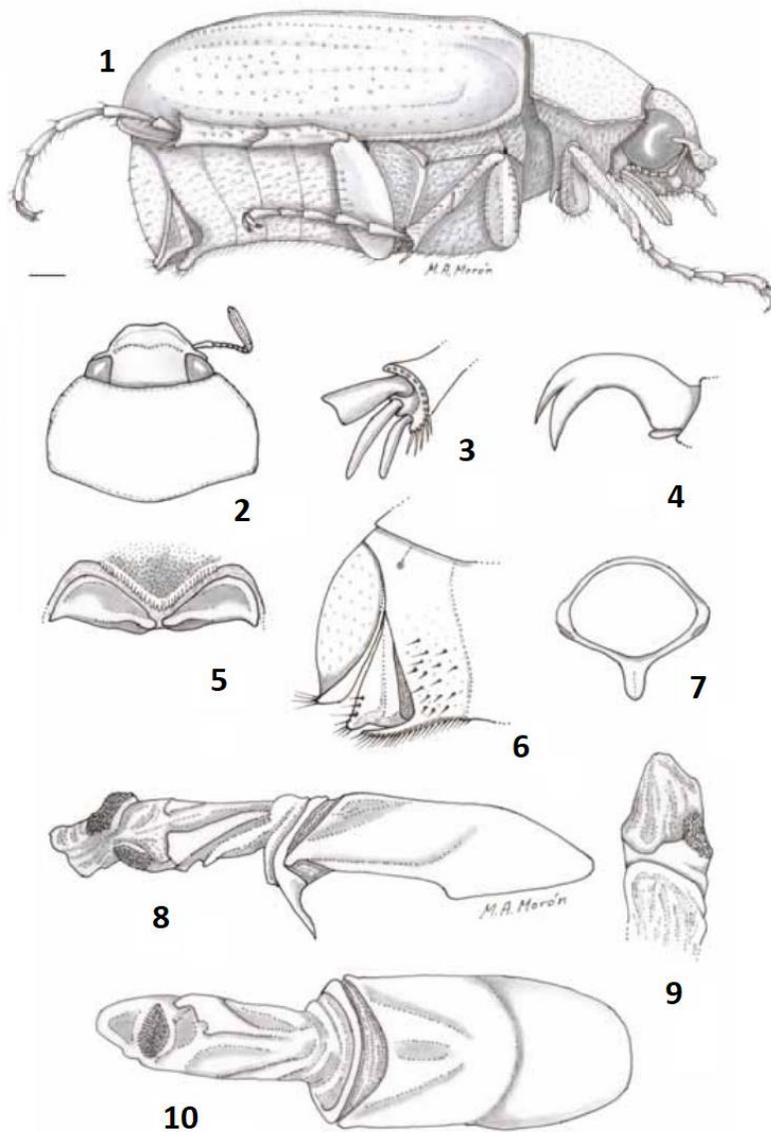
### 4.1.5 *Subfamilia Melolonthinae*

Las especies de esta subfamilia se pueden identificar morfológicamente debido a que los bordes del clípeo ocultan la mandíbula y ocasionalmente parte de esta última sobresale lateralmente. Adicionalmente en las patas presentan uñas tarsales bífidas o dentadas que en algunos casos pueden ser simples (Neta y Gail 2008). En los estados larvales la zona estriduladora ventral de la mandíbula está generalmente ausente. la lacinia y la galea mandibulares están separadas distalmente y fusionadas en la región proximal. Además, se reconocen porque poseen un punto sensorial en la sección dorsal del artejo antenal final (**Figura 1**). Regularmente la apertura anal denota forma de Y o de líneas angulosas (Ritcher 1966).

Una particularidad de este grupo es que en una sección del colon se desarrolla una cámara de fermentación dilatada conocida como región proctodeal del tubo digestivo en larvas, la cual, debido a sus características histológicas, da fuertes indicios sobre estrechas relaciones con microorganismos al momento de las larvas obtener nutrientes para su desarrollo, lo que conlleva a un ineficiente aprovechamiento de nutrientes a partir de su dieta, obligando a las larvas a procesar mayores cantidades de alimentos, por lo que eventualmente sus heces contienen elevadas cantidades de nutrientes, siendo esto de gran valor ecológico (Morón 1994).

**FIGURA 1**

*Aspecto general del melolontido *Phyllophaga obsoleta**



*Nota:* 1) Vista lateral de un macho y algunas partes del melolontido *P. obsoleta*. 2) vista dorsal de cabeza y pronoto. 3) sección latero-distal del ápice de la metatibia. 4) Aspecto lateral de la uña protarsal. 5) vista ventral del extremo posterior del abdomen. 6) vista lateral del extremo posterior del abdomen. 7) región distal de parámetros, sin edeago. 8) vista lateral de la cápsula genital con el edeago extendido. 9) vista ventral del ápice del edeago. 10) Aspecto dorsal de la cápsula genital con edago extendido. Tomada de Morón 2006.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### 4.1.6 *Género Astaena*

Las especies de este género se distinguen de los demás por su abertura anal en forma de Y, cabeza de color amarillo y presentar una palidia única transversal (Pardo-Lorcano et al., 2002b). Para el año 2007 Evans y Smith reportan la presencia de 131 especies de este género para Centro y Sudamérica, siendo Brasil y Colombia los de mayor riqueza, este último con aproximadamente 30 especies. Estos escarabajos son conocidos por alimentarse de las hojas en cultivos como trigo, cítricos, café y aguacate, entre otros, distribuyéndose altitudinalmente desde 1.000 hasta los 3.000 m.s.n.m, (Pardo-Lorcano 1994). En el país, las larvas se han encontrado en distintos cultivos como café, fique, maíz, pastizales, yuca, entre otros, encontrándose de manera agregada en el suelo con densidades que van de 1 hasta 36 larvas/m<sup>2</sup>, aunque las larvas son difíciles de ver en las primeras etapas de su desarrollo debido al reducido tamaño (Pardo-Locarno et al., 1999; Pardo-Locarno et al., 2007). Las mayores abundancias de larvas se han encontrado asociadas a pastizales, cultivos de yuca y café a una profundidad de suelo de 15 cm, temperaturas entre 22.7 °C a 24.7 °C, humedad alrededor del 80% y temperaturas ambientales de aproximadamente 29 °C (Pardo-Locarno et al., 2002b; Garcia-Atencia et al., 2015)

### 4.1.7 *Astaena pygidialis* Kirsch

Esta especie solo ha sido reportada en Colombia (Evans y Smith 2007). Sus larvas desarrollan 3 estados o instares cuyo desarrollo sucede exclusivamente en el suelo, tienen un ciclo de vida anual con picos poblacionales de adultos hacia los meses de marzo a mayo durante su emergencia (Pardo-Locarno et al., 2007). Pese a su relevancia económica por ser plaga de diversos

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

cultivos, tanto sus larvas como su estado adulto (Pardo-Lorcano et al., 2007), es muy poco lo que se conoce sobre la especie.

En el año 2010 Palacios identificó *A. aff pygidialis* Moser, con ejemplares recolectados en Rónegro, Antioquia, con las siguientes características diagnósticas: presencia de 12 a 14 plegmas en el Plegmatium, 12 a 14 setas Acanthoparias, conjunto de setas finas y robustas de color negro en los segmentos abdominales VII y VIII, además con un par de setas grandes de color negro en la región pedal.

### **4.1.8 Efecto de *A. pygidialis kirsch* en cultivos de aguacate cv. Hass**

Estudios realizados al complejo de especies que conforman el grupo Melolonthidae presentes en Antioquia respecto al impacto económico, distribución espacial y daño generado a los cultivos evidenciaron que estos escarabajos afectan las hojas y corteza de los frutos principalmente en la primera etapa de desarrollo de estos; los daños se presentan inicialmente en los bordes, luego se dispersa por el borde y posteriormente hacia el interior de los cultivos con distribución similar entre el daño producido a hoja y frutos (Arias et al., 2020).

Recientemente, a partir de monitoreos nocturnos se logró establecer que el daño en los cultivos no es generado por varias especies del complejo Melolontinae como se pensaba, si no, por una especie en concreto, adultos de *A. pygidialis* Kirsch, los cuales fueron encontrados alimentándose de las hojas y corteza de los frutos; además, se logró establecer que las larvas no se alimentan de las raíces de los árboles de Aguacate (Holguín y Neita 2018; Holguín y Mira 2021).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### 4.1.9 *Métodos de diagnóstico del grupo*

En estados larvales las características del raster y el labro-epifaringe son determinantes para separar el género *Astaena* de los demás géneros de la familia Melolonthidae, y para las pupas se tienen en cuenta características torácicas y cefálicas (Pardo-Locarno et al., 2007). Muchas especies de Melolóntidos se suelen agrupar en complejos de especies, como el denominado complejo “Gallina ciega” en México, en el que se han logrado diferenciar cerca de 16 especies, lo cual requirió de realizar seguimiento al desarrollo de las larvas hasta llegar a adultos para poder asociarlas a estos últimos y determinar su identidad (Aragón et al., 2010). En muchos casos, como en el complejo de “Chizas” para Colombia, debido a las intrincadas claves taxonómicas y falta de personal entrenado con experticia en el grupo, los estudios se ven obligados a separar los individuos por morfotipos y utilizar entre 4 y 5 propuestas de claves taxonómicas distintas (García-Atencia et al., 2015; García-Atencia y Martínez-Hernández 2015), lo que hace necesario trabajar con un gran número de ejemplares de los cuales se pueda obtener o apreciar un patrón morfológico distintivo para cada especie (Bran et al., 2006).

Identificar especies es una labor ardua y con un estimado de entre 10 a 15 millones de especies en la tierra, el contar con solamente 1 millón de estas descritas (Hammond 1992), demuestra su dificultad. La presencia de variabilidad genética (Chen y Dorn 2010), especies crípticas (Collins y Paskewitz 1996), claves taxonómicas complejas y cambiantes durante su ontogenia (Aragón et al., 2010; Cherman y Morón 2014; García-Atencia et al., 2015), hacen de la clasificación taxonómica una tarea muy demandante en tiempo y experticia (Magoga et al., 2018), que conlleva a que en muchos casos las asignaciones basadas solo en morfología resulten erróneas (Avisé 1989). En los casos de difícil identificación por escasa diferenciación morfológica, entre

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

especies cercanamente emparentadas y tiempos prolongados de desarrollo para identificación en etapa adulta, las herramientas moleculares han demostrado un buen desempeño con diagnósticos rápidos (Benefer et al., 2010; Lefort et al., 2014; Magoga et al., 2018) hasta en casos en los que se trabaja con material altamente degradado como en contenidos estomacales (Pompanon 2012).

### **4.1.10 Código de barras genético o "barcoding"**

El barcoding es una herramienta molecular que permite diferenciar especies entre sí, a partir de secuencias de ADN únicas y distintivas, las cuales funcionan a modo de identificadores propios para cada especie (Hebert *et al.*, 2003). El principio subyacente del *Barcoding* está en el porcentaje de diferenciación entre las secuencias, entendiéndose que la varianza entre secuencias de la misma especie es mucho menor respecto a la de otra; este porcentaje de diferenciación o "gap" es generalmente una distancia genética mayor a la intraespecífica pero menor a la interespecífica (Hebert et al., 2003; Hebert et al., 2004; Casiraghi et al., 2010). Estos códigos son obtenidos principalmente del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa I (COI), más específicamente el fragmento de aproximadamente 650 pares de bases hacia el extremo 5' del mismo (Hebert et al., 2003; Hebert et al., 2004; Barrett y Hebert 2005), que posteriormente son reportados por la publicación asociada a bases de datos especializados como BOLD y Genbank (Krishnamurthy y Francis 2012).

Esta técnica ha demostrado alta eficiencia en diferenciar especies estrechamente emparentadas (Harvey et al., 2003), asociar especímenes desconocidos con especies conocidas y facilitar la identificación entre especies (Frezal y Leblois 2008) además de reducir los tiempos y aumentando el número de especies que pueden ser discriminadas con poco esfuerzo muestral (Petersen et al., 2014; Kowalska et al., 2019). En ciertos casos, las herramientas moleculares como

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

el *barcoding* son indispensables para una oportuna y efectiva identificación de las especies como insectos considerados plaga, ya que, en muchos casos la identificación a nivel de especie a partir de huevos y estados larvales no es factible (Valentini et al., 2009). Un ejemplo de la efectividad de estos métodos corresponde al estudio de 93 especies de Lepidopteros pertenecientes a la familia *Lymantriidae*, las cuales, debido a la dificultad de su identificación en estados larvales, y considerando que muchas de estas especies son consideradas plagas, el estudio de los códigos de barras genéticos a partir de muestras de ADN de adultos se logró hacer su identificación precisa (Ball et al., 2006). En Rwanda, la técnica ha sido validada con éxito al lograr la asociación exitosa de secuencias obtenidas a partir de larvas con secuencias de adultos de Melolonthidos previamente identificados (Nyamwasa et al., 2016).

### 5. Materiales y métodos

**Objetivo Específico 1:** Caracterización del tipo de distribución espacial de larvas de *A. pygidialis* Kirsch y relación con factores físicos y químicos del suelo en cultivos de aguacate Hass.

#### 5.1.1 *Sitios de estudio y diseño de muestreo espacial*

Para la caracterización de la distribución espacial de larvas *A. pygidialis*, se seleccionaron 4 Unidades Productivas Comerciales (UPC) de aguacate cv. Hass con historial de daño de la plaga, ubicadas en los municipios de La Ceja (UPC A y B), El Retiro (UPC C) y San Pedro de los Milagros (UPC D) en el departamento de Antioquia (**Tabla 1, Figura 2**).

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

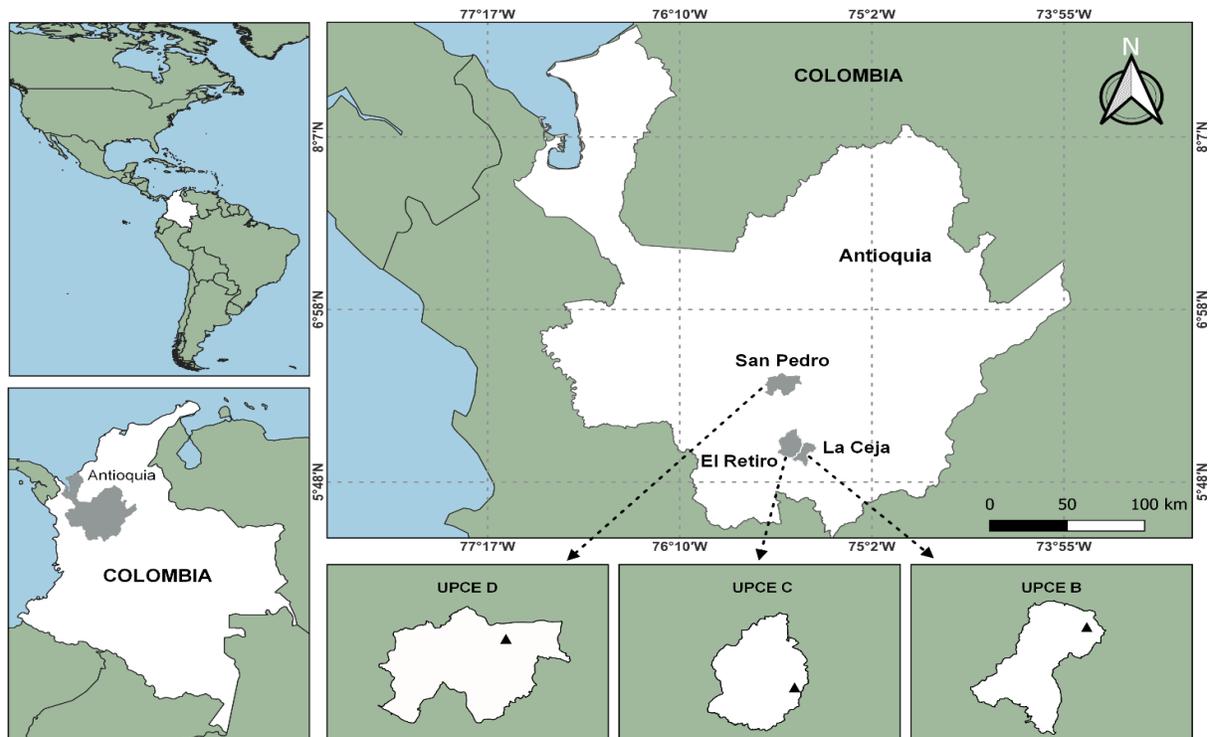
**Tabla 1**

*Ubicación de muestreo en fincas ubicadas en el oriente antioqueño*

MUNICIPIO	LOTE (UPC)	ÁREA (HA.)	HÁBITATS O CULTIVOS ADYACENTES	LATITUD	LONGITUD
LA CEJA	A	2.9	Kikuyo	6°01'51.5"	75°22'45.6"
LA CEJA	B	1	Kikuyo	6°02'02.1"	75°22'54.7"
EL RETIRO	C	2.6	Kikuyo + vegetación boscosa	6°01'46.7"	75°27'43.7"
SAN PEDRO DE LOS MILAGROS	D	0.56	Kikuyo	6°01'46.7"	75°27'43.7"

**FIGURA 2**

*Ubicación geográfica de las áreas de estudio*



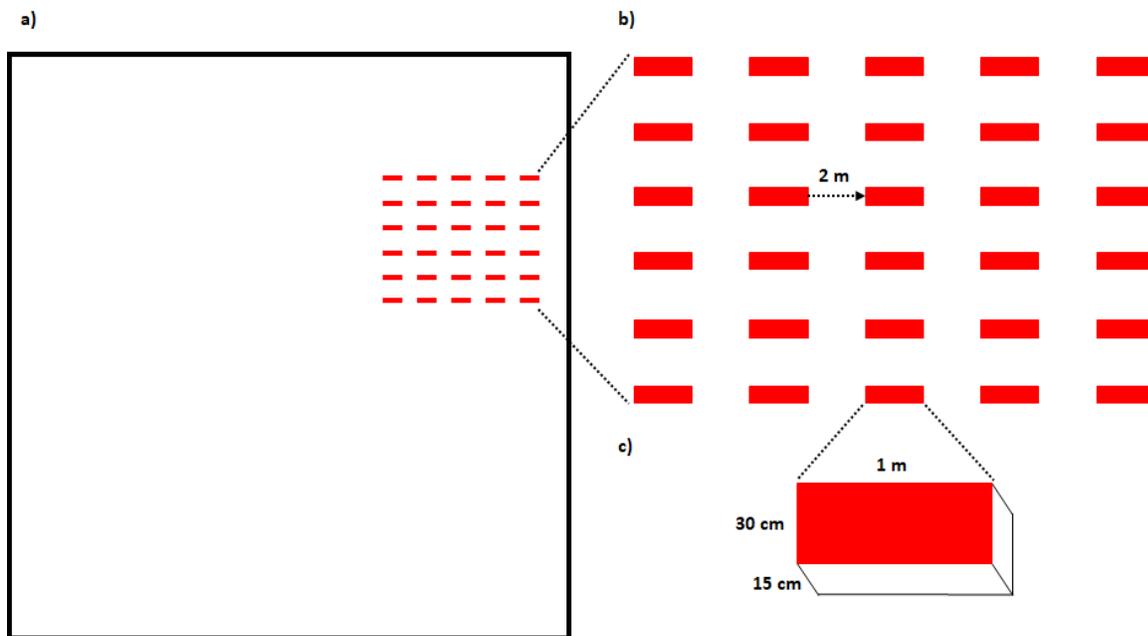
Nota: Unidades Productivas Comerciales de Exportación (UPC) de Aguacate consideradas en el estudio. Ubicación de las parcelas representadas por un triángulo.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

El muestreo de larvas se desarrolló estableciendo, en el suelo del cultivo, 6 transectos con 5 puntos de colecta separados por distancias de 2 metros para un total de 30 puntos, ubicando los puntos en las calles de los cultivos de aguacate, iniciando desde el borde de cada lote, considerando que hacia el borde es donde se ha reportado el mayor daño y abundancia de larvas en cultivos (**Figura 3**) (Arias et al. 2020; Holguín y Neita, 2019). Dado a la mayor abundancia de larvas *Astaena* hasta los 15cm de profundidad, (Pardo-Locarno et al. 2003b) en cada punto, la unidad de muestreo en el suelo consistió en un metro lineal x 30 cm de ancho y 15 cm de profundidad comprendiendo un área superficial de cada punto de 0.3 mts<sup>2</sup>. En estos se obtuvieron los datos necesarios para determinar abundancia de larvas, características físicas y químicas del suelo y las plantas hospederas. Los muestreos se realizaron en 2 periodos de tiempo T1 (julio-septiembre) y T2 (octubre-noviembre) del año 2020.

**FIGURA 3**

*Puntos de muestreo dentro de las unidades productivas*



*Nota:* Esquema de muestreo dentro de cada UPC. (a) Área de establecimiento de transectos dentro del lote, (b) Transectos de muestreo en campo (líneas) y sitios de recolección de larvas (cuadrados rojos), (c) Dimensiones de cada punto de recolección de larvas.

### 5.1.2 Abundancia e identificación de larvas

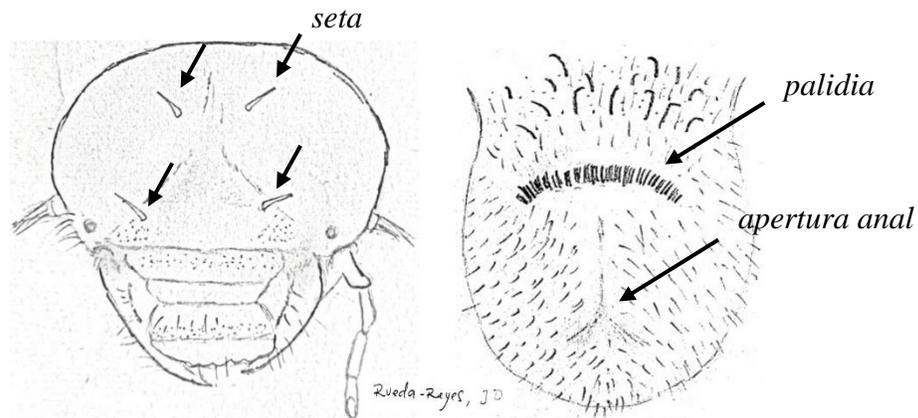
En cada punto de muestreo del suelo descrito anteriormente (5.1.1) se colectaron y contaron el número de larvas “chisas” presentes, seguidamente fueron almacenadas en bolsas plásticas sellables debidamente rotuladas con un poco de suelo del mismo punto de muestreo y se transportaron al laboratorio de entomología del Centro de Investigación La Selva de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) para la identificación de estas a nivel de género. Las larvas recolectadas fueron preservadas mediante un tratamiento de inmersión en agua caliente (100° C aprox.) durante 5 minutos y posteriormente depositadas en viales rotulados con etanol al 70% para permitir conservar las características morfológicas de los individuos. La identificación se realizó mediante el uso de claves taxonómicas y comparación con

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

morfotipos afines a géneros reportados para la zona presentes en la colección taxonómica de trabajo del CI La Selva, que cuenta con especímenes previamente identificados por un taxónomo especialista (Pardo-Lorcano et al., 2002; Pardo-Lorcano et al., 2007; Neita-Moreno et al., 2012). Los caracteres considerados para la identificación de las larvas fueron forma de la abertura anal, patrón de setas en capsula cefálica y palidia en el raster (**Figura 4**) y morfología de espiráculos (Pardo-Lorcano et al., 2002; Pardo-Lorcano et al., 2007).

### FIGURA 4

*Larva del género Astaena*



*Nota:* Vista esquemática de los caracteres morfológicos diagnósticos del género *Astaena*. Setas de cápsula cefálica formando un trapecio (*izquierda*), palidia simple formada por una hilera arqueada de pali y abertura anal en forma de Y (*derecha*).

Algunas de las larvas recolectadas, entre 3 a 5, fueron preservadas en viales de vidrio con etanol al 96% para análisis moleculares en el laboratorio de Fisiología, Genómica y Transcriptómica del grupo de investigación CINBIN de la Universidad Industrial de Santander. Se realizó un análisis descriptivo de la abundancia de larvas de *A. pygidialis* por lotes (UPC) y fecha de muestreo. El promedio de las densidades poblacionales fue comparado mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con lotes (UPC) y fecha de recolecta como factores, en el software JMP v.16.2. La fecha de muestreo fue incluida como una medida repetida en una estructura de

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

covarianza autoregresiva de primer orden (ANOVA, PROC MIXED). Los valores de abundancia fueron transformados utilizando  $\text{Log}_{10}(x+1)$  para homogeneizar la varianza de los datos previo a los análisis estadísticos de ANOVA.

Las densidades poblacionales fueron visualizadas utilizando mapas de contornos utilizando JMP v.16.2 (SAS Institute INC., Cary, NC). El patrón de distribución de las larvas fue estimado para cada unidad productiva mediante la función *Dispimorisita* del paquete Vegan (Oksanen et al., 2020) en R debido a su fácil implementación, interpretación y robustez frente a diferentes escalas espaciales (Morisita 1959; Vivas y Notz 2011). Este índice permite identificar un patrón uniforme cuando los valores del índice son entre 0 y 1, la inexistencia de un patrón o aleatoriedad se da con valores iguales a 1 y valores mayores a 1 indican un patrón de dispersión espacial agregado. Se calculó la relación de varianza sobre la media como un índice de dispersión (ID) para determinar la distribución de las densidades de larvas por lote en cada fecha de muestreo (Taylor 1961; Taylor y Woidwod 1982). Este índice toma en consideración los conteos de las larvas por unidad de muestreo y provee una indicación sobre el patrón de distribución de los conteos. Para conteos distribuidos de manera uniforme, la varianza es cercana a cero y el índice ID es cercano a cero; para una distribución aleatoria, la varianza y la media son similares, por lo que el índice ID se aproxima a uno; y para una distribución agregada, la varianza es relativamente grande, por lo que el índice DI es mayor a 1.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### **5.1.3 Caracterización física y química del suelo y relación con la abundancia de las larvas de *A. pygidialis***

Para determinar las características físicas y químicas del suelo, se realizó inicialmente un levantamiento de línea base de cada unidad productiva utilizando un muestreo completamente al azar. La línea base se construyó considerando dos profundidades (0-5 y 10-15cm), y recolectando aleatoriamente 12 submuestras disturbadas de suelo que fueron empleadas para formar 4 muestras compuestas, 2 por cada profundidad evaluada. Además, se recolectaron muestras no disturbadas utilizando un tomador de muestras tipo Ujhland, el cual, almacena las muestras en cilindros de aluminio (5cm de alto y 4.86 cm de diámetro: con un volumen de 92.75 cm<sup>3</sup>) para un total 16 muestras de suelo compuesto y 48 cilindros. En las muestras de suelos no disturbadas se determinaron las variables físicas, densidad aparente mediante método de cilindro con volumen conocido (Forsythe 1975), distribución del tamaño de partículas con hidrómetro (Day 1965), porosidad total y distribución de tamaño de poros por mesa de tensión y humedad (Walter 1986).

El porcentaje de humedad (%H) del suelo se determinó por humedad gravimétrica en estufa a 105 °C por 24 horas hasta alcanzar peso constante. Las muestras compuestas (500g aprox.) se transportaron en bolsas plástica sellables debidamente marcadas y fueron tendidas en papel Kraft dentro de marcos de madera enmallados en el fondo hasta secar a temperatura ambiente y a la sombra, de las cuales, en recipientes plásticos individuales se agregaron 10 g de suelo + 25 mL de agua destilada que fueron agitados por 10 min en agitador automático y se determinó el pH y conductividad eléctrica (Pla 1969). Las variables químicas fueron determinadas a partir de muestras compuestas de suelo disturbadas y consistieron en la medición de pH y conductividad eléctrica (Pla 1969).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

Posteriormente, para determinar la relación entre las características físicas y químicas del suelo y la abundancia de larvas “chisas”, en cada punto de muestreo (ver sección 5.1.1 y 5.1.2), se colectaron muestras de suelo las cuales fueron transportadas al laboratorio del CI La Selva para determinar las variables Densidad aparente (Da), Porosidad total (PT), macro y microporos, Distribución tamaño de partículas (DTP) y humedad. Además, en el caso de la UPC B, también se realizó la separación de las fracciones de arena, muy gruesa, gruesa, media, fina y muy fina, mediante lavado sobre batería de tamices con tamaño de poro de 1000mm, 500mm, 250mm, 125mm, y 75mm (Day 1965).

**Objetivo específico 2:** Determinación de hospederos y su incidencia en la presencia de larvas de *A. pygidialis* Kirsch en cultivos de aguacate Hass.

### **5.2.1 Muestreo de larvas de *A. pygidialis* Kirsch en hospederos alternos**

Para determinar el efecto de las plantas hospedantes alternas (especies vegetales en los puntos de muestreo) de *A. pygidialis*, en cada sitio de muestreo descrito en el punto 5.1.1 de la sección de métodos se realizó una prueba estadística para evaluar su relación con la abundancia de larvas presentes. Se realizaron muestreos de forma aleatoria (puntos de igual dimensión a los realizados para la sección 5.1.1) en hospederos adyacentes (áreas contiguas a los lotes de estudio) al cultivo de aguacate. El número de muestras colectadas fue proporcional al área del hospedante, variando entre 10 y 15 puntos de muestreo por hospedero. Las larvas se contaron y clasificaron por género mediante análisis morfológicos descritos en la sección 5.1.2.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### 5.2.2 *Análisis estadístico de hospederos de larvas de A. pygidialis Kirsch*

Con los promedios de larvas en los diferentes hospedantes encontrados, se realizó un análisis de varianza de una vía para identificar el efecto de los hospederos en la abundancia de larvas utilizando JMP v.16.2 previa transformación de la varianza de los datos empleando  $\log_{10}(x+1)$ . El efecto de los hospederos alternos se evaluó adicionalmente mediante análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis y posterior prueba post hoc con corrección de Bonferroni disponible en el paquete STATS (R Core Team 2020). Además, se exploró la relación entre la presencia de larvas *Phyllophaga*, *Cyclocephala*, *Plectris* y el total de las larvas con la incidencia de *A. pygidialis* mediante un modelo lineal múltiple con la técnica *stepwise* para identificar la relación entre sus abundancias.

**Objetivo específico 3:** Evaluación de la efectividad del uso de código de barras de ADN en la identificación de *A. pygidialis* Kirsch en estados de desarrollo tempranos.

### 5.3.1 *Obtención de larvas y adultos de A. pygidialis Kirsch*

Se obtuvieron larvas provenientes de los puntos de muestreo para determinar la distribución espacial y los hospederos a las unidades productoras de aguacate. Algunas larvas *Astaena* obtenidas en muestreos exploratorios durante el año 2018 fueron mantenidas en cautiverio hasta su etapa adulta para posteriores análisis moleculares. Además, muestras de escarabajos adultos de las especies *Cyclocephala sexpunctata* (2 ind), *C. fulgurata* (2 ind), *Phyllophaga obsoleta* (2 ind), *Plectris pavidata* (2 ind), *Charioderma sp* (2 ind), *Isonychus sp* (2 ind) y *A. pygidialis* (3 ind) provenientes del oriente antioqueño, fueron provistos por AGROSAVIA para su inclusión en los análisis de identificación de especies y como ejemplares de referencia.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### 5.3.2 *Extracción y amplificación de ADN*

El ADN de larvas y adultos se extrajo mediante protocolo CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio) (Martín et al., 2017, Swamy et al., 2019). La extracción en adultos se realizó a partir del macerado de individuos completos y para las larvas estas primero fueron diseccionadas en dos partes y se utilizaron los tejidos de la sección anterior para el macerado. Todos los tejidos previamente a iniciar el proceso de extracción de ADN fueron lavados con agua destilada para retirar el exceso de alcohol. La calidad de las extracciones de ADN se verificó mediante electroforesis horizontal a 100v durante 35 minutos en gel de agarosa al 1% y medición de la relación de absorbancia a 260 nm a 280 nm (Martín et al., 2017).

El marcador molecular mitocondrial COI (Citocromo oxidasa subunidad I) fue amplificado utilizando los cebadores LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994) en reacciones de 20 uL constituidas por 2 uL de Buffer10x de reacción, 0.8 uL de MgCl<sub>2</sub>, 1 uL de DNTPs, 0.12 uL de Taq Polimerasa, 0.2 uL de cada primer, 1 uL de ADN y 14,68 uL de agua tipo 1; mediante PCR, iniciando con 5 minutos de desnaturalización inicial a 95 °C seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 46 °C y 45 s a 72 °C, finalizado por 5 minutos de elongación a 72 °C. Los productos de la amplificación se enviaron a los laboratorios de CORPOGEN en Bogotá para su purificación y secuenciación en ambas direcciones.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### 5.3.3 *Identificación molecular de especies*

Luego de inspeccionar la calidad de los cromatogramas y el llamado de bases en Sequencher v5.0, se construyeron secuencias de consenso. Con la herramienta del NCBI, BLAST (Altschul et al., 1990), se buscaron posibles inserciones, deleciones, o codones de parada producidos por desplazamiento del marco de lectura y así remover potenciales pseudogenes. Además, se añadieron a posteriores análisis secuencias de los posibles géneros a los que están asociados los individuos colectados, grupos de referencia y out group según disponibilidad en GenBank. Luego a través del software BioEdit (Hall 1999) fueron sometidas a alineamiento múltiple mediante el algoritmo ClustalW y subsecuente edición.

La aproximación inicial para la delimitación molecular de las especies de larvas encontradas consistió en realizar un análisis de brecha (*Gap*), mediante un agrupamiento Neighbor-Joining con el método de distancias (p) en MEGA X (Kumar et al., 2018), estableciendo el porcentaje de diferenciación entre grupos de larvas. Posteriormente teniendo en cuenta el modelo K2P se establecieron las frecuencias de distancias intraespecífica e interespecífica para identificar el *Gap* (espacio o rango de distancias con menores frecuencia intra e interespecíficas) para el establecimiento del umbral (límite de distancia genética) con el cual se estimó el número de especies con el paquete SPIDER (Species Identity and Evolution in R) de R (Boyer et al., 2012; R Core team 2020) y con el procedimiento (ASAP) Assamble species by automatic partitioning (Puillandre et al., 2021).

Adicionalmente, fue verificada la efectividad del marcador en la delimitación de especies a través de la generación de árboles filogenéticos. A través del servidor online de IQTree (Nguyen 2014), se estimó el modelo de sustitución nucleotídica con mejor ajuste para la posterior obtención del árbol filogenético con máxima verosimilitud (Trifinopoulos et al., 2016). Adicionalmente se

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

reconstruyeron las relaciones filogenéticas usando inferencia bayesiana (IB) en BEAST 1.8.4 (Drummon et al., 2012) con 100 millones de pasos en la cadena de Mote Carlo (MCMC) y 4 réplicas. Cada corrida se visualizó en TRACER (Rambout et al., 2018) y se compararon mediante el criterio AICM para seleccionar la mejor cadena de inferencia. Con estos datos en TreeAnnotator se construyó el árbol de mayor credibilidad con 10.000 pasos de descarte. Los árboles fueron visualizados y editados en FigTree 1.4.2.

### 6. Resultados

**Objetivo específico 1:** Tipo de distribución espacial de larvas de *A. pygidialis* Kirsch y relación con factores físicos y químicos del suelo en cultivos de aguacate Hass.

#### 6.1.1 *Identificación morfológica de larvas*

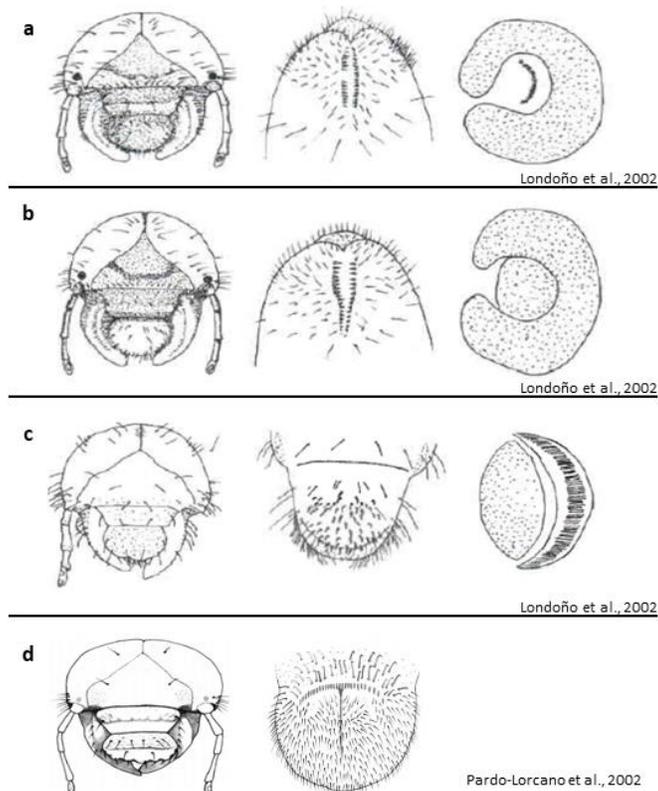
En las muestras colectadas se identificaron 4 morfotipos. El morfo 1 (afín al género *Phyllophaga*), se caracterizó por espiráculos en forma de “C” abierta, 2 pali verticales paralelos entre sí (a veces curvados a modo de paréntesis) y apertura anal en forma de “Y”, además de presentar las larvas de mayor tamaño con ensanchamiento hacia el ráster (Figura 5 a). El morfo 2 (afín a *Plectris*) presentó apertura anal recta, espiráculos en forma de “C” poco profundos y un par de pali verticales enfrentados con forma de “V” alargada hacia el abdomen y con un ligero ensanchamiento hacia el ráster (Figura 5 b). El morfo 3 (afín a *Cyclocephala*) también presenta sus espiráculos en forma de “C” pero cerrada y profundos, un patrón de setas en el ráster en forma triangular (algunas veces truncado) con la base hacia la apertura anal, la cual, era recta; estas larvas fueron las segundas de mayor tamaño (Figura 5 c). Finalmente, el morfo 4 es el afín al género *Astaena*, estas larvas fueron las de menor tamaño, la coloración en vivo del cuerpo es crema-claro a blanco con cápsula cefálica amarillo-oscuro a rojizo. En el ráster presentaban solo una hilera de

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

pali horizontal arqueado (algunas ocasiones acusado hacia el centro) con los extremos apuntando hacia la apertura anal, la cual, era en forma de “Y”. Los espiráculos poco profundos con forma arqueada y una hilera de puntos hacia el exterior. La cápsula cefálica presentaba 4 setas formando un trapecio hacia la mandíbula (Figura 5 d). Estas larvas al ser depositadas en los recipientes de transporte tenían gran movilidad y comportamiento agresivo hacia larvas de igual morfo, provocando graves lesiones en el cuerpo llegando a matar con sus mandíbulas a otras larvas al cortarlas en dos secciones.

### FIGURA 5

*Caracteres morfológicos para identificación de marceños*



*Nota:* morfología para identificar morfotipos de marceños encontrados. De derecha a izquierda: Capsula cefálica, raster y espiráculo. Afín a: *Phyllophaga* (a), *Plectris* (b), *Cyclocephala* (c) y *Astaena* (d).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### 6.1.2 *Análisis de abundancia y patrón de distribución espacial*

En total se recolectaron 1900 larvas “chisas” de escarabajos melolonthinos en los puntos de muestreo. Las larvas de *A. pygidialis* representaron el 35% (675 larvas) del total de individuos recolectados. La unidad productiva B presentó la mayor abundancia de larvas con 342 larvas, seguido por la unidad productiva A con 182 larvas y las unidades D y C con abundancia de larvas de 78 y 73, respectivamente (Tabla 2).

**TABLA 2**

*Abundancia de larvas de Astaena y marceños capturados*

MUNICIPIO	LOTE	ESTADÍSTICO	TIEMPO 1	TIEMPO 2
LA CEJA	A	Promedio $\pm$ EE	4,37 $\pm$ 0,93	1,7 $\pm$ 0,4
		Rango	0 - 21	0 - 7
		Total	131	51
LA CEJA	B	Promedio $\pm$ EE	5,53 $\pm$ 1,67	5,87 $\pm$ 1,38
		Rango	0 - 36	0 - 26
		Total	166	176
EL RETIRO	C	Promedio $\pm$ EE	1,83 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,22
		Rango	0 - 10	0 - 5
		Total	55	18
SAN PEDRO DE LOS MILAGROS	D	Promedio $\pm$ EE	1,47 $\pm$ 0,97	1,13 $\pm$ 0,45
		Rango	0 - 29	0 - 13
		<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>34</b>

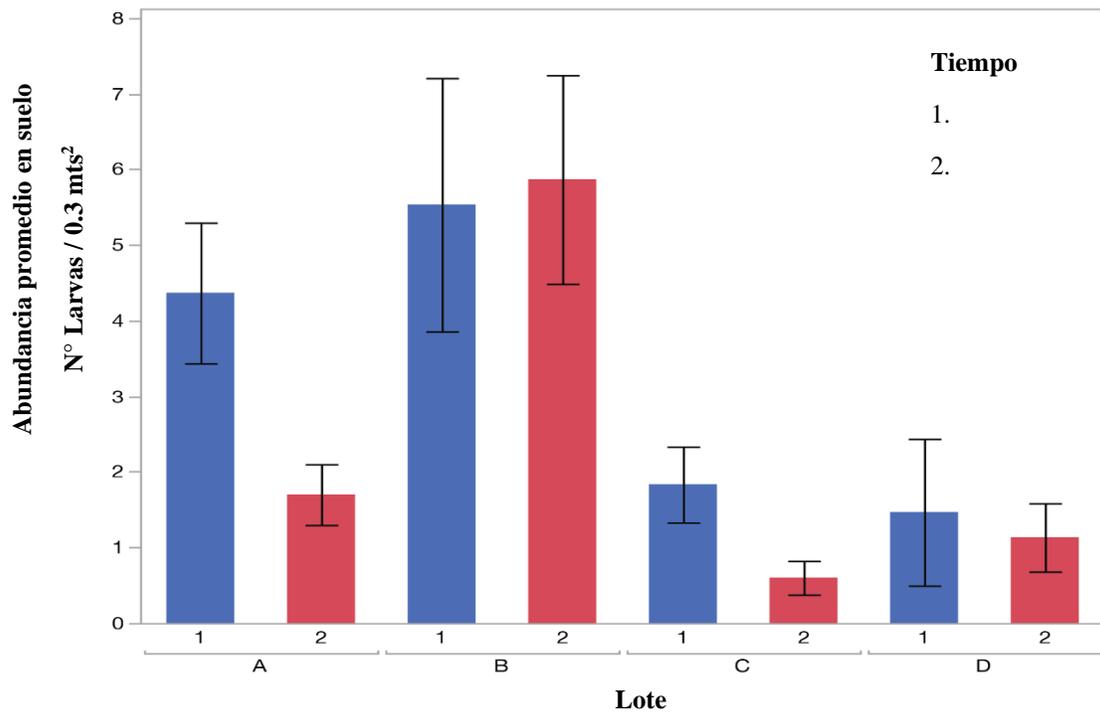
En cada lote y fecha de muestreo, la abundancia de larvas de *A. pygidialis* varió entre 1 y 36 individuos en 0,2 m<sup>2</sup>. La estimación de los componentes de la varianza mostró una estimación del componente de la varianza para efectos aleatorios de los transectos equivalentes a 0.13. El test

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

de ANOVA, PROC MIXED considerando medidas repetidas para los factores de efectos fijos mostró diferencias significativas al evaluar el factor lote (UPC) ( $P < 0,0001$ ) e interacción entre el factor fecha de muestreo y lote (UPC) ( $P < 0,0267$ ). El factor tiempo no mostró diferencias significativas en la abundancia de larvas ( $P = 0,1195$ ) (**Figura 6**).

**FIGURA 6**

*Variación espacio temporal de larvas *Astaena pygidialis**



*Nota:* Variación temporal y espacial de la población de larvas *A. pygidialis* recolectadas en 4 unidades productivas (lotes A, B, C y D) de aguacate cv. Hass en dos fechas de colecta (tiempo 1 y 2). Las densidades ( $\pm$  E.E) por 0,2 m<sup>2</sup> de suelo encontrado para todas las fechas de muestreo (n=240).

### 6.1.3 Patrón de distribución espacial

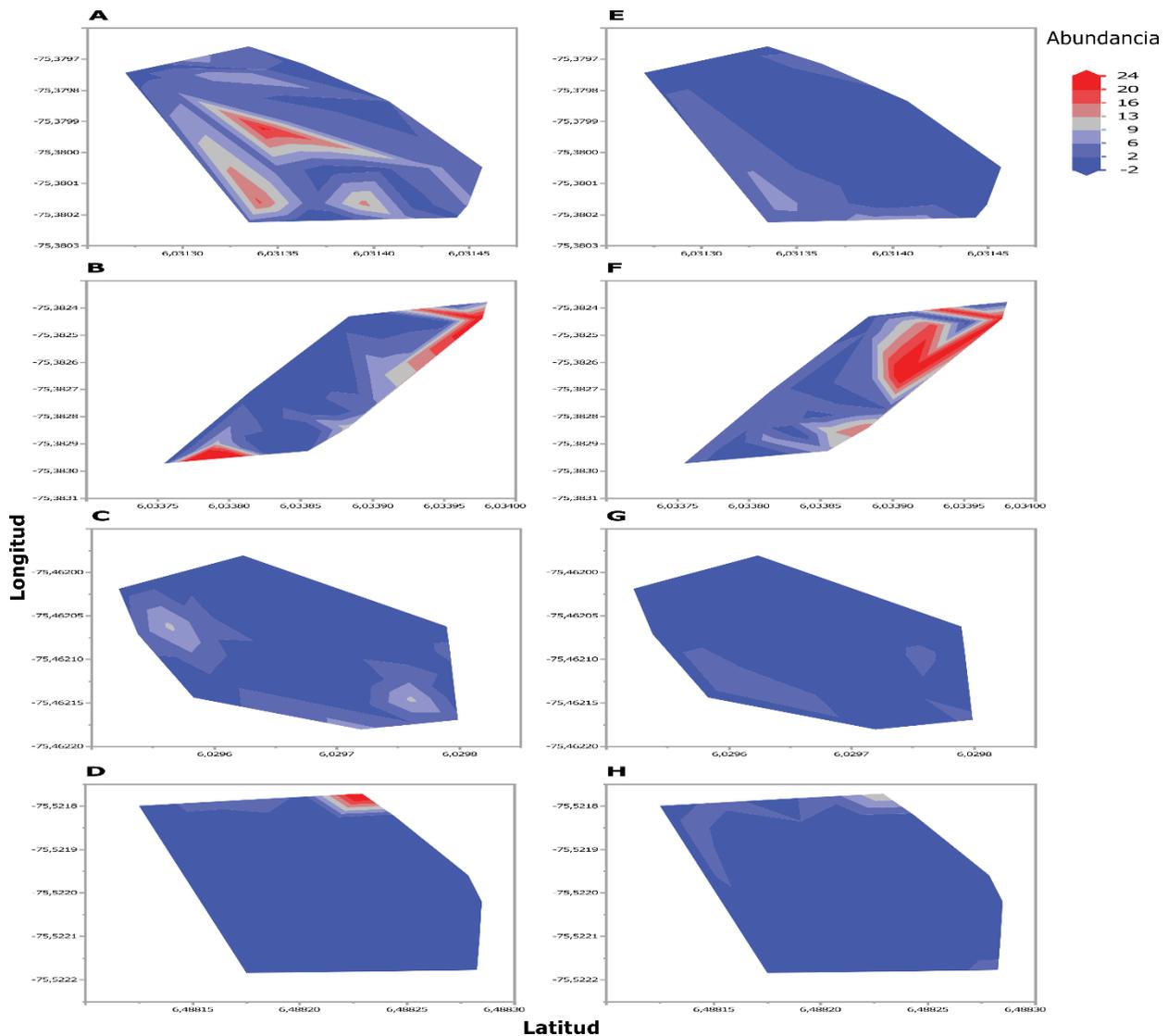
Las larvas de *A. pygidialis* recolectadas en los diferentes lotes y fechas presentaron un patrón de distribución agregado, observándose una variación temporal en el tamaño y ubicación de parches (áreas con mayor densidad de larvas). Los lotes A y D mostraron una clara disminución

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

en larvas mientras que en el lote B se observó un incremento del tamaño de los parches (**Figura 7**). Aunque el lote C mostró una disminución en la densidad de larvas con el tiempo, este no fue evidente como en los demás lotes. Los parches de larvas presentes en las unidades se ubicaron cerca de los bordes, siendo más evidente en los lotes B y D durante los dos periodos de muestreos.

### FIGURA 7

*Mapas de Contornos de densidades de Astaena pygidialis en 4 unidades productoras de aguacate y dos fechas de colecta*



*Nota:* Mapas de contornos a partir de la densidad poblacional de larvas *Astaena* observadas en las unidades productivas A, B, C y D durante el tiempo 1 (a,c,e,g) y tiempo 2 (b,d,f,h). Gradiente de abundancia desde punto sin larvas (áreas de color azul) hasta mayor número de larvas (áreas de color rojo).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

El patrón de distribución espacial agregado fue confirmado en las unidades productivas empleando el índice de Morisita (*Imor*), presentando valores mayores a 1 (**Tabla 2**), siendo este notablemente marcado en la UPC D, con una baja incidencia de larvas en la mayoría de los puntos y una abundancia de 29 larvas en 1 solo punto de muestreo. De manera similar, el índice de dispersión fue congruente con una distribución espacial agregada (**Tabla 2**).

**TABLA 2**

*Patrón de distribución de larvas según el índice de morisita (imor) e índice de dispersión (id)*

MUNICIPIO	LOTE (UPC)	ESTADÍSTICO	TIEMPO 1	TIEMPO 2
LA CEJA	A	<i>Imor</i>	2.1	2.07
		ID	5.95	2.85
LA CEJA	B	<i>Imor</i>	3.49	2.44
		ID	15.2	9.74
EL RETIRO	C	<i>Imor</i>	2.66	3.52
		ID	4.1	2.48
SAN PEDRO DE LOS MILAGROS	D	<i>Imor</i>	13.3	4.8
		ID	19.3	5.4

*Nota:* Valores *Imor* entre 0 y 1 indican una distribución uniforme y superiores a 1 patrones agregados. Para conteos uniformemente distribuidos, la varianza es alrededor de cero y el ID esperado es cercano a 0; para una distribución aleatoria, la varianza y la media son similares, por lo que DI es aproximadamente 1; y para una distribución agrupada, la varianza es relativamente grande, por lo que DI es mayor que 1.

### 6.1.4 Relación del suelo en la abundancia de larvas

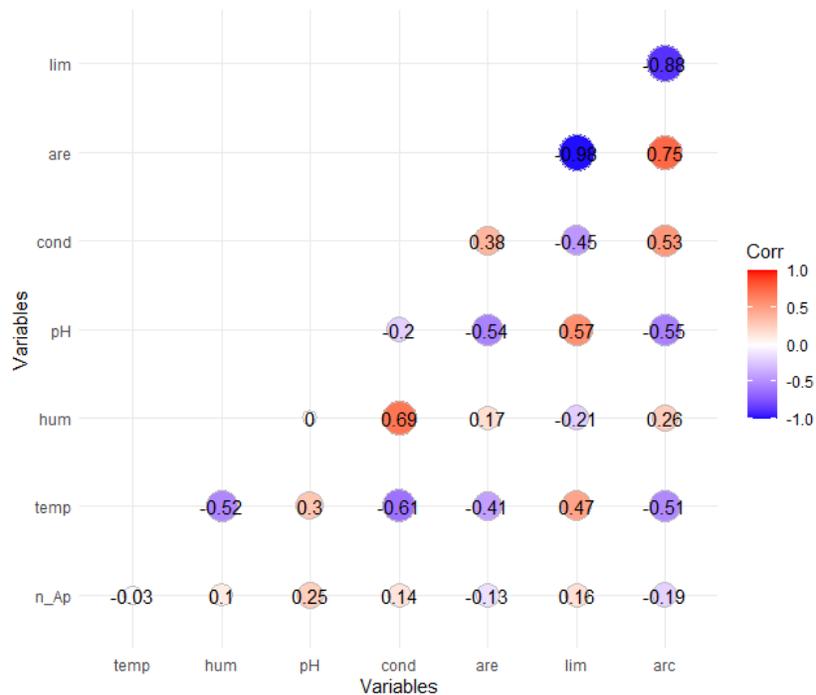
La correlación lineal (Pearson) entre las variables de suelo y la abundancia de larvas de *Astaena* fue baja y no significativa en la mayoría de los casos. pH mostró la de mayor relación positiva con un coeficiente de correlación de 0.25 (p-valor < 0.05) y el contenido de arcilla la de

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

mayor correlación negativa -0.19 (p-valor < 0.1). Entre las variables explicativas, se encontraron fuertes correlaciones entre las mismas, donde la temperatura, el contenido de arcilla y limo mostraron las mayores correlaciones con las otras variables predictoras (**Figura 8**). Las fracciones gruesa y muy gruesa del contenido de arena en la unidad productiva B presentaron correlación negativa con la abundancia de larvas, -0.10 (P= 0.63) y -0.11 (P= 0.62) respectivamente.

### FIGURA 8

*Matriz de correlación de Pearson entre variables*



*Nota:* Matriz de correlación lineal (Pearson). Abundancia de larvas *Astaena* (n\_Ap), temperatura (temp), humedad (hum), pH, conductividad (cond), porcentaje de arena (are), limo (lim) y arcilla (arc).

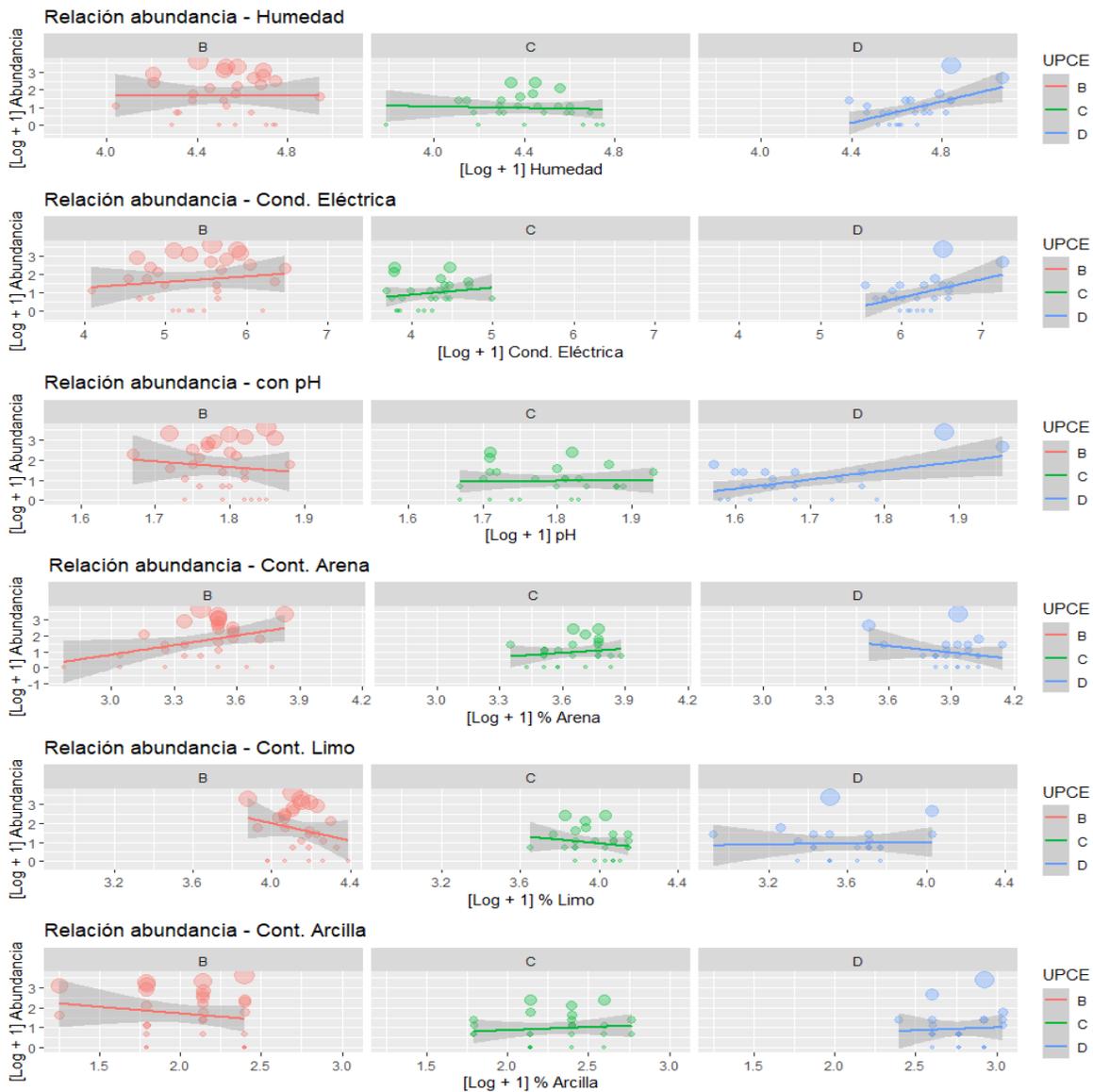
Los modelos predictivos en los cuales de manera conjunta las variables temperatura de suelo, contenido de limo y arcilla explican la incidencia de larvas en el suelo para las tres unidades productivas aguacate cv. Hass presentaron bajo poder explicativo y no fueron significativamente distintos al azar (**Tabla 3**). La humedad (P= 0.005), conductividad eléctrica (P= 0.03) y pH (P= 0.01) presentaron efecto significativo (bajo-moderado) sobre la abundancia de larvas para la

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

unidad D ubicada en San Pedro de Los Milagros (**Figura 9**), con un poder explicativo del 30%, 19% y 26% respectivamente. En la UPC B el contenido de arena en los suelos presentó significancia ( $P= 0.03$ ) con un poder explicativo bajo, solo el 14% (**Figura 9**).

### FIGURA 9

*Relación abundancia de larvas con propiedades del suelo*



*Nota:* Relación entre contenido de partículas, humedad, pH, conductividad y temperatura del suelo con la abundancia de larvas en las diferentes UPC. Recta de mejor ajuste (línea azul) con intervalo de confianza (sombreado gris) y número de larvas *A. pygidialis* ( $n_{Ap}$ ).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

A partir de un modelo múltiple de prueba, en el cual se incluyen a todas las variables explicativas como predictores de la abundancia de larvas *Astaena*, se sometió a selección del modelo con mejor ajuste (menor valor AIC) mediante la técnica *stepwise*; dando como modelo con mejor ajuste en el que las abundancias son explicadas por el pH, conductividad, contenido de arena y contenido de limo (modelo 1; AIC = 314.23;  $R^2 = 0.13$ ;  $P = 0.02$ ). Este modelo solo tiene un poder explicativo del 13% de las abundancias en el que el pH presenta el mayor efecto ( $\beta_{\text{pH}} = 2.7$ ,  $P = 0.16$ ) dado que cada unidad de pH en que aumenta o disminuye, en promedio se pueden encontrar entre 2 o 3 larvas, sin embargo, el modelo no fue significativo. La conductividad eléctrica fue la única variable con efecto significativo ( $\beta_{\text{c.e.}} = 0.009$ ,  $P = 0.018$ ) pero con una correlación muy baja. Al validar los supuestos mediante la función *gvlma* para el modelo 1, se identificó no cumplimiento en la estadística global (p-valor  $< 0.001$ ), oblicuidad ( $P = 3.57e^{-14}$ ), curtosis (p-valor  $< 0.001$ ) y homocedasticidad ( $P = 5.3e^{-03}$ ). Debido a esto, para aproximar el modelo a los supuestos, se realizó una transformación de los predictores mediante logaritmo natural más 1 ( $\log + 1$ ), dando como modelo con mejor ajuste al modelo 2 (abundancia de larvas explicado por la transformación logarítmica del pH, la conductividad y el contenido de arcilla) cuyo poder explicativo es aproximadamente del 15% (AIC = 310.38;  $R^2 = 0.15$ ;  $P = 0.004$ ). Sin embargo, luego de transformar no se cumplió con los supuestos de estadística global (p-valor  $< 0.001$ ), oblicuidad ( $P = 1.09e^{-11}$ ), curtosis ( $P = 3.3e^{-14}$ ) y homocedasticidad ( $P = 5.27e^{-03}$ ). También se sometió a prueba un tercer modelo (modelo 3; AIC = -3.58;  $R^2 = 0.11$ ;  $P = 0.01$ ) con los predictores y las abundancias (variable dependiente) transformadas, en este caso se cumplió con los supuestos de estadística global ( $P = 0.17$ ), oblicuidad ( $P = 0.12$ ), curtosis ( $P = 0.31$ ), función de enlace ( $P = 0.38$ ) y homocedasticidad ( $P = 0.12$ ); con un modelo que explica aproximadamente el 11% de la variación de las larvas (**Tabla 3**).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

**TABLA 3.**

*Poder explicativo y significancia de modelos lineales*

UPC	B		C		D	
	r <sup>2</sup>	P	r <sup>2</sup>	P	r <sup>2</sup>	P
<b>TEMPERATUR A</b>	0.006	0.6	8.15e <sup>-06</sup>	0.9	0.09	0.1
<b>HUMEDAD</b>	7.6e <sup>-06</sup>	0.9	0.004	0.7	0.30	0.005*
<b>CONDUCTIVI DAD</b>	0.02	0.4	0.03	0.3	0.19	0.03*
<b>PH</b>	0.01	0.5	0.0004	0.9	0.26	0.01*
<b>CONT. ARENA</b>	0.14	0.03*	0.02	0.4	0.05	0.2
<b>CONT. LIMO</b>	0.05	0.2	0.03	0.3	0.001	0.8
<b>CONT. ARCILLA</b>	0.03	0.3	0.01	0.5	0.003	0.7

*Nota:* Prueba de modelos lineales entre las variables explicativas y la abundancia de larvas discriminado por unidad productiva.

**Objetivo específico 2:** Hospederos alternos y su incidencia en la presencia de larvas de *A. pygidialis* Kirsch en cultivos de aguacate Hass.

### 6.2.1 Determinación de hospederos de larvas de *A. pygidialis* Kirsch en campo

A partir de las larvas recolectadas en los puntos de muestreo dentro de las UPC de aguacate y en las áreas adyacentes a los cultivos, se encontró que en general las abundancias en estos hospederos adyacentes fueron menores a las presentadas dentro de las unidades productivas, con un máximo de 50 larvas de Melolonthidos registradas en el hospedero adyacente de la UPC D del municipio de San Pedro. La abundancia de larvas *A. pygidialis* en estos hospederos fue aún menor, con un máximo de 24 larvas en el hospedero adyacente a la UPC A durante el segundo periodo de tiempo (**Tabla 4**), representando el 76.2% de las larvas encontradas en la unidad y el 12% del total de larvas encontradas en todos los hospederos adyacentes. Durante el primer periodo de tiempo las áreas adyacentes a las UPC A y C presentaron una abundancia de 9 larvas *Astaena*, representando el 18% y el 37% respectivamente del total de larvas encontradas. El hospedero de

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

la unidad B presentó abundancia de larvas del género *Astaena* de 8 individuos durante el primer muestreo, siendo el 100% de larvas encontradas. En el caso de la UPC D las larvas *Astaena* (1 ind) constituyó el 2% del total de larvas Melolontidos (47 ind) encontrados en dicho hospedero. En total para los 3 hospederos alternos se encontraron en conjunto 27 y 38 larvas *Astaena* respectivamente para cada periodo de muestreo. Para el tiempo 2 en las UPC A y D se presentó un incremento en la abundancia de larvas *Astaena* y una disminución en la unidad B (**Tabla 4**). El género *Astaena* representó el 32% de las 199 larvas de chizas encontradas en los 4 hospederos adyacentes durante los dos periodos de muestreo.

**TABLA 4.**

*Abundancias de A. pygidialis Kirsch en hospederos adyacentes*

UPC	LOCALIDAD	MATRIZ	NO. PUNTOS	ABUNDANCIA ASTAENA / TOTAL	
				TIEMPO 1	TIEMPO 2
A	La Ceja	K	10	9   50	35   46
B	La Ceja	K	12	8   8	0   14
C	El Retiro	K + V.B.	10	9   24	-
D	San Pedro	K	15	1   47	3   10

*Nota:* Abundancia promedio de larvas encontradas en los potenciales hospederos adyacentes para los dos tiempos de muestreo. (K) pasto Kikuyo. (v.b) vegetación boscosa.

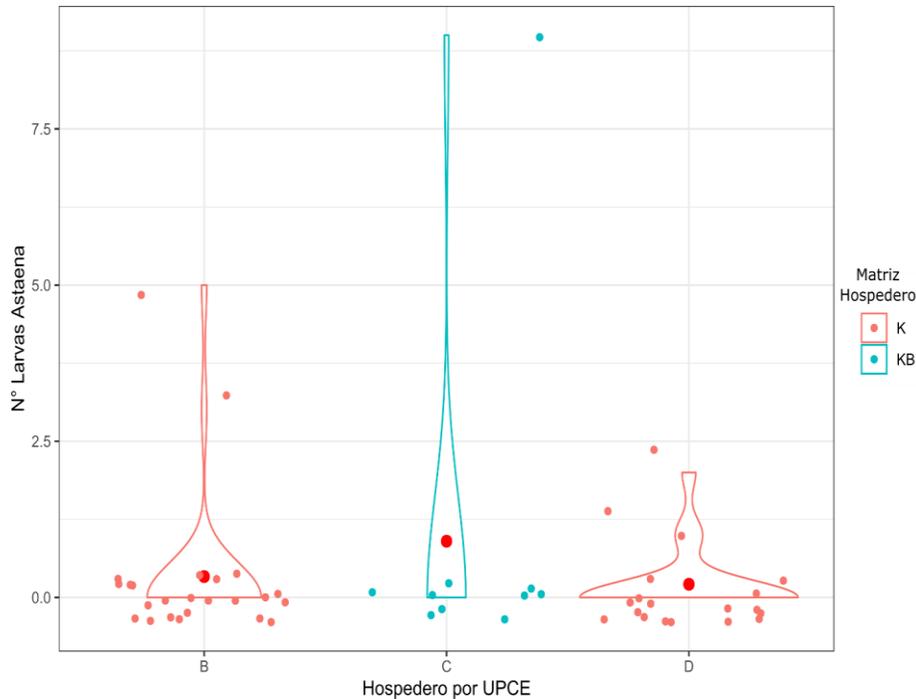
La relación entre los hospederos alternos y las abundancias no cumplió los supuestos de estadística global ( $p$ -valor  $< 0.001$ ), oblicuidad ( $p$ -valor  $< 0.001$ ), curtosis ( $p$ -valor  $< 0.001$ ) y homocedasticidad ( $P = 3.2e^{-05}$ ). Igualmente, al transformar las abundancias ( $\text{Log} + 1$ ) no se aproximaron a los supuestos de normalidad, violando estadística global ( $p$ -valor  $< 0.001$ ), oblicuidad ( $p$ -valor  $< 0.001$ ), curtosis ( $p$ -valor  $< 2.22e^{-16}$ ) y homocedasticidad ( $P = 6.94e^{-03}$ ). La varianza (Kruskal-Wallis) de la abundancia de larvas *A. pygidialis* entre los hospederos alternos (**Figura 10**) no mostró efecto ( $\eta^2 = -0.0075$ ) significativo ( $X^2_{K-W} = 0.37$ ;  $P = 0.53$ ), siendo estos 3

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

hospederos estadísticamente iguales entre sí. La presencia de larvas *Phyllophaga*, *Cyclocephala*, *Plectris* y el conjunto de éstas no presentó ningún efecto sobre la presencia o abundancia de larvas *Astaena*.

### FIGURA 10.

*Varianza de larvas Astaena respecto hospedero alterno*



*Nota:* Análisis de varianza (Kruskal-Wallis). Comparación de las abundancias de larvas *A. pygidialis* según el hospedero alterno (matriz de plantas en las áreas contiguas a los cultivos). Mediana (*punto rojo*). K (matriz de Kikuyo) y KB (matriz de Kikuyo y área boscosa).

En los puntos de muestreo dentro de las unidades productivas se identificaron 6 plantas hospederas (pastos o “malezas”) presentes en cada punto de muestreo de larvas. Las especies vegetales identificadas fueron kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), cadillo (*Bidens pilosa*), siempre viva (*Commelina diffusa*), diente de León (*Taraxacum officinale*), gramalote (afín a *Paspalum fasciculatum*) y jaragua (afín a *Hypparrhenia rufa*). En cada UPC se presentó dominancia de una de estas especies vegetales, siendo el kikuyo y el cadillo la predominantes para la unidad B, el

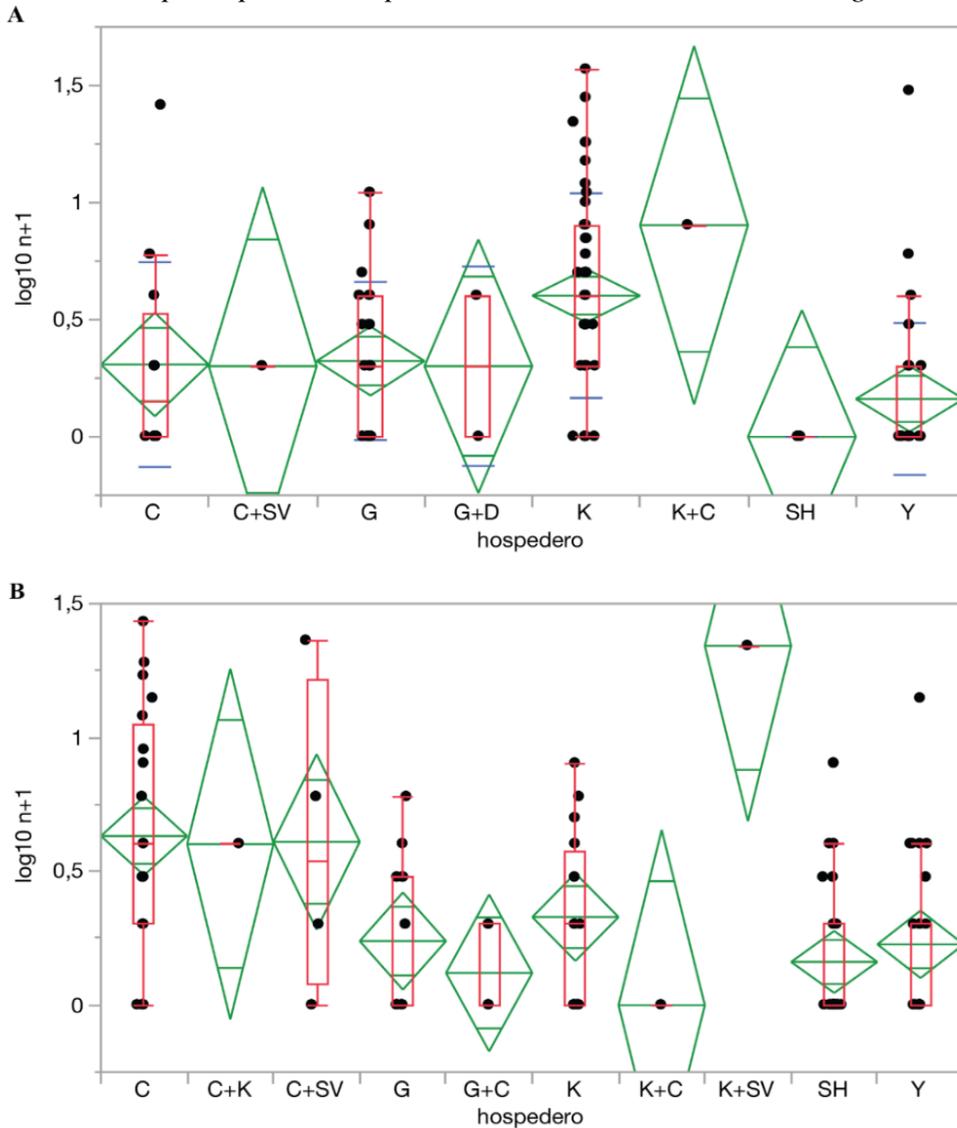
## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

pasto gramalote en El Retiro (C) y en San Pedro de Los Milagros exclusivamente hubo presencia del pasto Jaragua. No se encontraron diferencias significativas en la abundancia de larvas dependiendo del hospedero al analizar las muestras combinando los datos de tiempo 1 y 2 en un mismo análisis, por lo que los datos fueron analizados en función de cada periodo de muestreo (**Figura 11**). Se observaron diferencias significativas en la abundancia de larvas por efecto del hospedero (ANOVA,  $P < 0,0001$ ). El test post-hoc de Tukey-Kramer HSD permitió identificar a los hospederos C, C+K y C+SV como los que mostraron una mayor abundancia, aunque estos hospederos no fueron significativamente mayores a todos los demás hospederos. El test ANOVA para el tiempo 2 fue congruente con los resultados del tiempo 1, mostrando un efecto significativo del hospedero en la abundancia de larvas de *Astaena pygidialis* (ANOVA,  $P < 0,0001$ ), siendo los hospederos K+SV, C, C+SV y C+K los que mostraron mayor abundancia; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas al comparar entre todos los pares de hospederos (Tukey-Kramer HSD).

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

**FIGURA 11.**

*Varianza de larvas respecto plantas hospederas alternas en los cultivos de aguacate*



*Nota:* Comparación de las abundancias de larvas según la planta hospedero estimadas para tiempo 1 (A) y tiempo 2 (B) utilizando ANOVA de 1 vía. Rangos intercuartílicos en diagrama de caja y bigotes en color rojo. Diamantes con promedios en color verde y valores observados como puntos en color negro. K (Kikuyo), C (Cadillo), G (Gramalote), Y (Jaragua), SV (Siempre viva), SH (sin planta huésped) y D (Diente de León).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

**Objetivo específico 3:** Efectividad del código de barras de ADN en la identificación de *A. pygidialis* Kirsch en estados de desarrollo tempranos.

### 6.3.1 *Extracción y amplificación del ADN*

En total se realizó extracción de ADN a 32 larvas provenientes de los muestreos realizados en la distribución espacial dentro de los cultivos y de los hospederos adyacentes, las cuales, fueron utilizados posteriormente para la amplificación del gen COI. Estas extracciones estaban compuestas por 8 individuos para cada uno de los morfotipos identificados en las unidades productivas de estudio, además, 2 individuos de cada especie de los adultos previamente identificadas por un experto. En la mayoría de las extracciones en larvas fue posible obtener ADN de alto peso molecular (

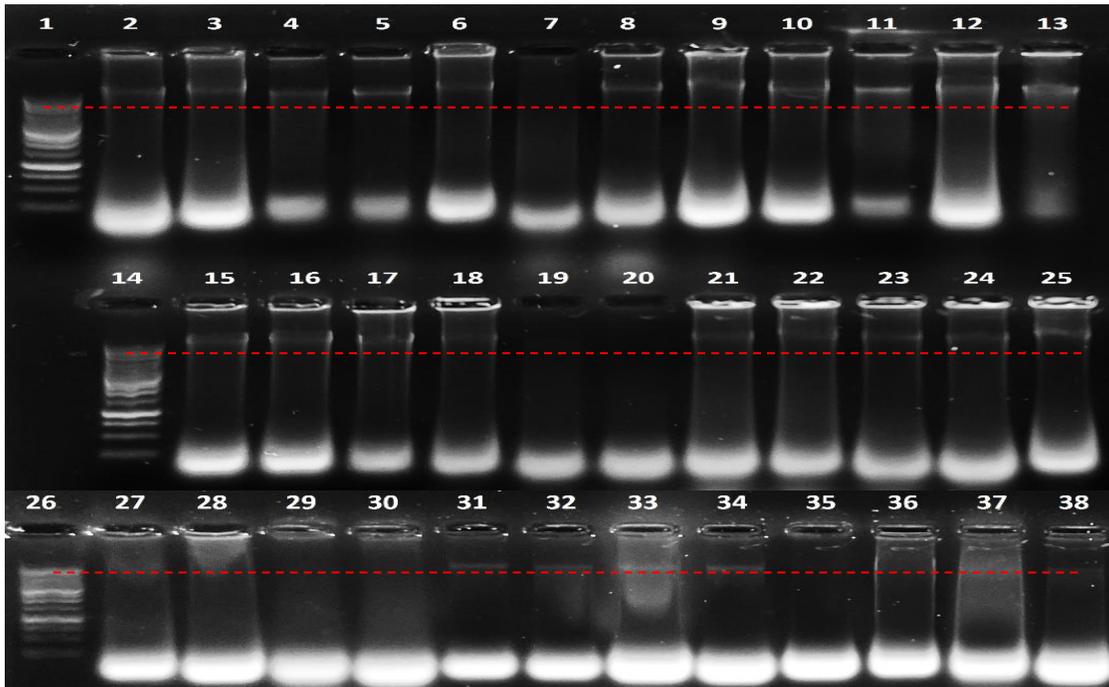
**Figura 12**, carriles 2-25), sin embargo, en los adultos la cantidad de material genético fue mucho menor y se observó alto grado de degradado (

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

**Figura 12**, carriles 27-38). Las muestras a partir de los adultos se evidenció material genético en al menos 1 individuo de cada especie (

**Figura 12**, *línea roja punteada*). Los individuos de larvas y adultos utilizados fueron posteriormente almacenados en la colección del centro de investigación La Selva de AGROSAVIA en Rionegro, Antioquia.

**Figura 12.**  
*ADN genómico de larvas y adultos*



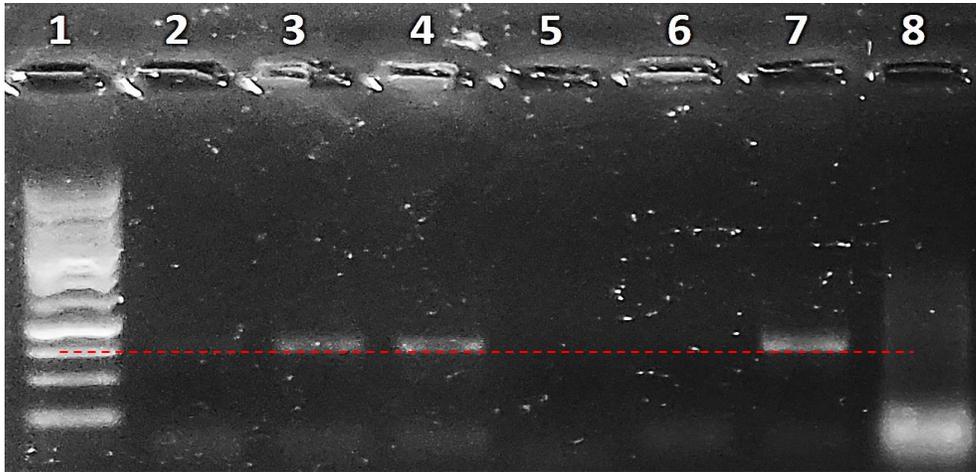
*Nota:* ADN genómico de larvas (*carriles 2-25*) y adultos (*carriles 27-38*) de Melolontidos. Escalera de peso molecular (*carriles 1 y 12*). Referencia para tamaño molecular de 1kb (*línea roja punteada*).

Todas las extracciones de ADN efectuadas fueron utilizadas para la amplificación del gen COI, incluso aquellas en las no fue posible observar bandas en las electroforesis. Los amplicones obtenidos y visualizados en gel de agarosa presentaron bandas con un peso molecular de alrededor 300 pares de bases (**Figura 13**, carriles 3, 5 y 7), estos fueron enviados al centro de investigación CORPOGEN de Bogotá para su secuenciación.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### FIGURA 13.

*Amplificones del gen mitocondrial COI*



*Nota:* Productos PCR con aproximadamente 300 pb (*línea roja punteada*) del gen COI correspondiente a las larvas de marceños 5CM2L2 (*Plectris* Aff.), 1CM3L1 (*Cyclocephala* Aff.) y 4CM4L2 (*Astaena* Aff.), en los carriles 3, 4 y 7 respectivamente, muestreados en el área de estudio.

En total, fueron secuenciadas con éxito 16 muestras, 5 de estas afines a *A. pigydialis* Kirsch, y 11 larvas correspondientes a otros marceños encontrados en los puntos de muestreos; en el caso de los adultos las secuencias obtenidas presentaron mala calidad con lo cual no fueron incluidas en los siguientes análisis. Las secuencias presentaron peso molecular de 690 pb aproximadamente. Posteriormente fueron reportadas en la base de datos GenBank del NCBI (**Tabla 5**). Al momento de realizar los análisis de las secuencias moleculares no se encontraron reportadas previamente en la literatura secuencias COI de referencia para el género *Plectris* y la especie *A. pigydialis*. La disponibilidad de secuencias de Melolontidos en Latinoamérica fue baja y enfocada a pocos géneros, con lo cual se tomaron 173 secuencias de referencia del GenBank correspondientes a 46

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

especies presentes en África de los géneros *Hydroporus*, *Anomala*, *Melolontha*, *Phyllophaga*, *Cyclocephala*, la gran mayoría de estas pertenecían a los últimos dos géneros.

Los subsecuentes análisis se desarrollaron con 189 secuencias tomando como outgroup secuencias de la especie *Hydroporus dentellus*. Las secuencias presentaron tamaños de entre 650 pb y 1517 pb, las cuales, posterior al alineamiento fueron cortadas por los extremos a 452 pb evitando de esta manera la presencia de gaps. 242 sitios fueron invariantes y 204 parsimoniosamente informativos. Las frecuencias nucleotídicas mostraron mayor abundancia de T (34%), seguida de A (27%), C (20%) y G (17%). El modelo de sustitución nucleotídica con mejor ajuste fue GTR+F+R4 por sus siglas en inglés, general time reversible (Kalyaanamoorthy et al., 2017).

**TABLA 5.**

*Número de acceso Genbank de larvas de marceños*

GENBANK	ID MUESTRA	MORFOTIPO	GÉNERO AFF.	LOCALIDAD
	14DM4L1	4	<i>Astaena</i>	San Pedro de Los Milagros
	14DM4L2			
	13BM4L1			La Ceja
	13BM4L2			
	4CM4L2			El Retiro
	1CM3L1	3	<i>Cyclocephala</i>	La Ceja
	10GM3L1			San Pedro de Los Milagros
	10GM3L2			
	20DM2L2	2	<i>Plectris</i>	San Pedro de Los Milagros
	5CM2L2			El Retiro
	19DM1L2	1	<i>Phyllophaga</i>	San Pedro de Los Milagros
	3CM1L2			El Retiro
	3CM1L2-2			
	7GM1L1			La Ceja
	7GM1L1-2			
	7GM1L2			

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

*Nota:* Número de acceso GenBank del gen mitocondrial COI de marceños encontrados en cultivos de Aguacate del oriente antioqueño, Colombia.

### 6.3.2 *Identificación molecular de especies*

En promedio la distancia genética entre todas las secuencias analizadas fue del 24% ( $\pm 37\%$  - 0%). La media intraespecífica rondó el 1.5% con máxima del 12% y sin distancia (0%) como mínima. Para las secuencias de estudio, el promedio fue del 22% con un máximo de 33%. A partir de estas distancias y el agrupamiento Neighbor-Joining se identificaron 4 clados (**Tabla 7**) conformados de la siguiente manera (Tabla 6):

**Clado 1** (C1) compuesto por 2 individuos del morfo 2 (1 proveniente de San Pedro de Los Milagros y el otro de El Retiro), un individuo del morfotipo 4 (La Ceja), uno del morfo 3 (El Retiro) y uno del morfo 1 (La Ceja), afines al género *Phillophaga*. **Clado 2** (C2) constituido por dos secuencias de un individuo del morfotipo 1 y 2 individuos del morfotipo 3 de la misma localidad, La Ceja. **Clado 3** (C3) conformado por 4 individuos identificados morfológicamente como morfo 4 (afines al género *Anomala*), 2 individuos de San Pedro, 1 individuo de La Ceja y otro de El Retiro, junto a un individuo del morfo 1 de La Ceja. **Clado 4** (C4) formado por dos secuencias de un individuo del morfotipo 1 proveniente de El Retiro, los cuales están asociados a *Cyclocephala*.

Dentro de los clados la distancia fue baja, entre C2 y C4 no se encontró distancia intragrupal por tanto las secuencias para cada caso fueron idénticas. C1 tuvo la mayor distancia con aproximadamente el 1.2% y para C3 fue de apenas el 0.4%; dada esta baja distancia intragrupal no es adecuado considerar cada secuencia como correspondiente a una especie diferente. Entre estos clados el promedio de distancia fue del 26% y la mayor diferencia se encontró entre C4 y C2 con

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

32%, en tanto que la menor distancia hallada fue entre C4-C1 y C3-C2 del 20% en cada caso (Tabla 6).

**TABLA 6.**

*Número promedio de sustituciones por sitio entre los grupos*

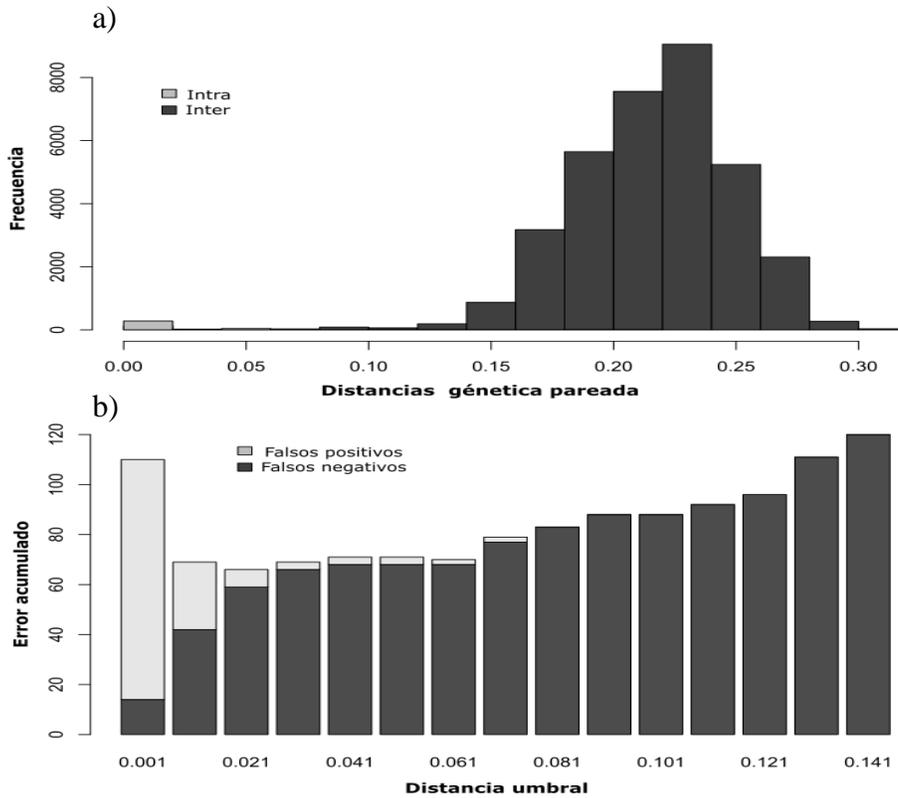
<b>Clado</b>	<b>Clado 1</b>	<b>Clado 2</b>	<b>Clado 3</b>
Clado 2	0.27		
Clado 3	0.29	0.20	
Clado 4	0.20	0.32	0.30

*Nota:* Distancia genética entre los grupos de larvas identificado

A partir de las frecuencias de las distancias intra e interespecífica se identificó un gap en el rango entre el 2% y el 5% de diferenciación genética (**Figura 14 a**), dentro del cual se registró la menor tasa de error acumulado dado por la sumatoria entre los casos de falsos positivos (sobre estimación) y los falsos negativos (subestimación) (**Figura 14 b**). El umbral de distancia genética óptimo calculado fue de 2.99%, el cual está dentro los porcentajes del rango de diferenciación genética en que se encontró el gap, además, este umbral está igualmente asociado a los valores de menor error acumulado (**Figura 14**). Partiendo de este umbral como referencia, SPIDER calculó la presencia de 50 unidades taxonómicas operativas molecularmente o MOTU's por sus siglas en inglés.

**FIGURA 14.**

*Gap de distancias genéticas intra e interespecíficas*



*Nota:* Frecuencia de distancias genéticas K2P (a) y tasas de error acumulado (b) a distintos umbrales para la identificación de la distancia genética óptima para la diferenciación de especies mediante el paquete SPIDER.

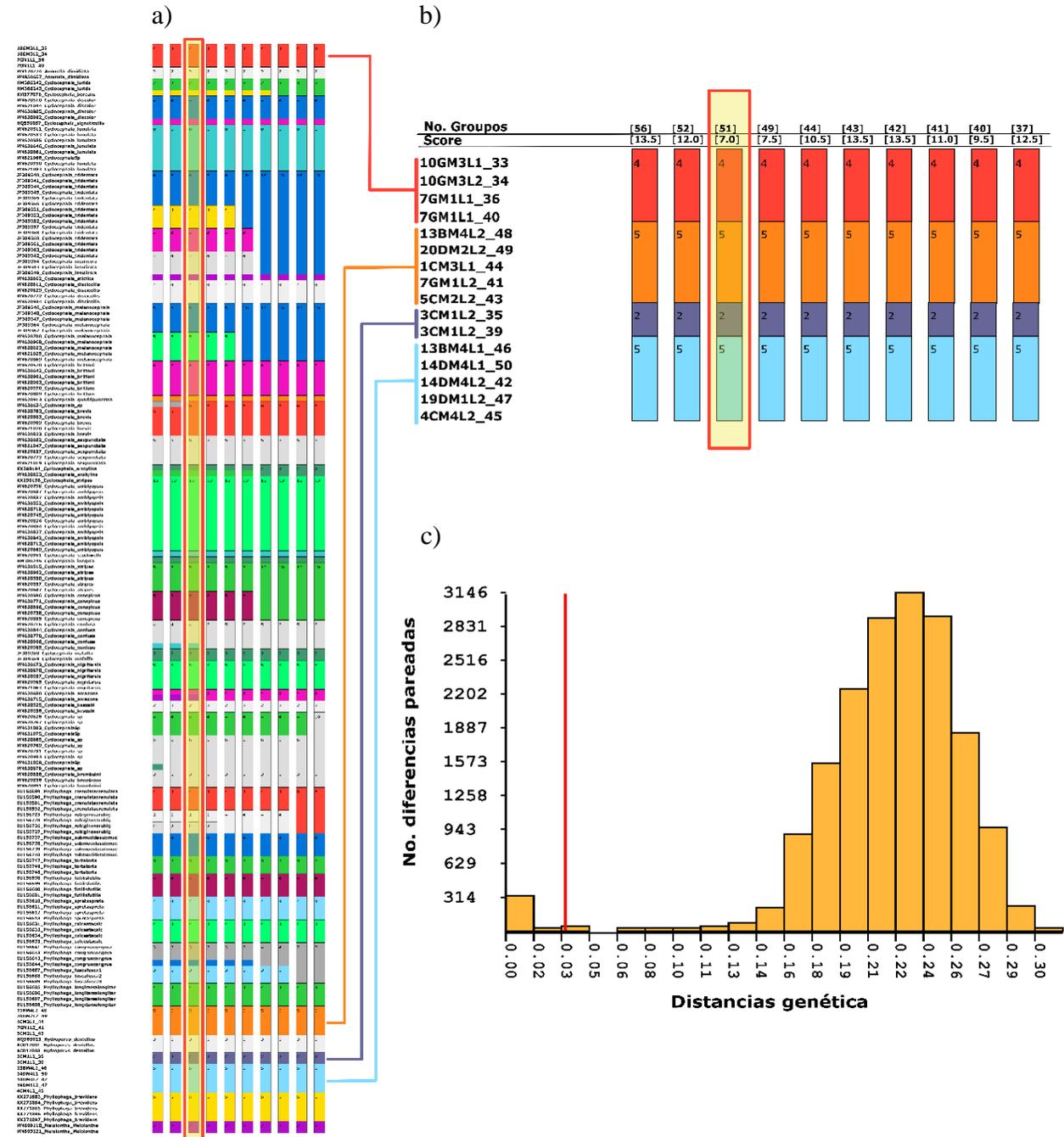
Igualmente, a partir de las distancias genéticas K2P entre todas las secuencias, ASAP (Pulliandre et al., 2021) identificó 10 posibles agrupamientos entre las secuencias analizadas con estimaciones que van desde 37 hasta 56 especies o MOTU's en total. El agrupamiento con mejor desempeño, aquel con menor valor de score ASAP, identificó la presencia de 51 especies (ASAP-score = 7.0) entre las secuencias analizadas y estimó como umbral de diferenciación genética una distancia de 3.5% (**Figura 15 c**). Dado este umbral, las secuencias de las larvas formaron 4

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

MOTU's, los cuales se corresponden igualmente a los grupos hallados con el árbol filogenético de máxima verosimilitud (**Figura 16**).

**FIGURA 15.**

*Gap y estimación de especies*



## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

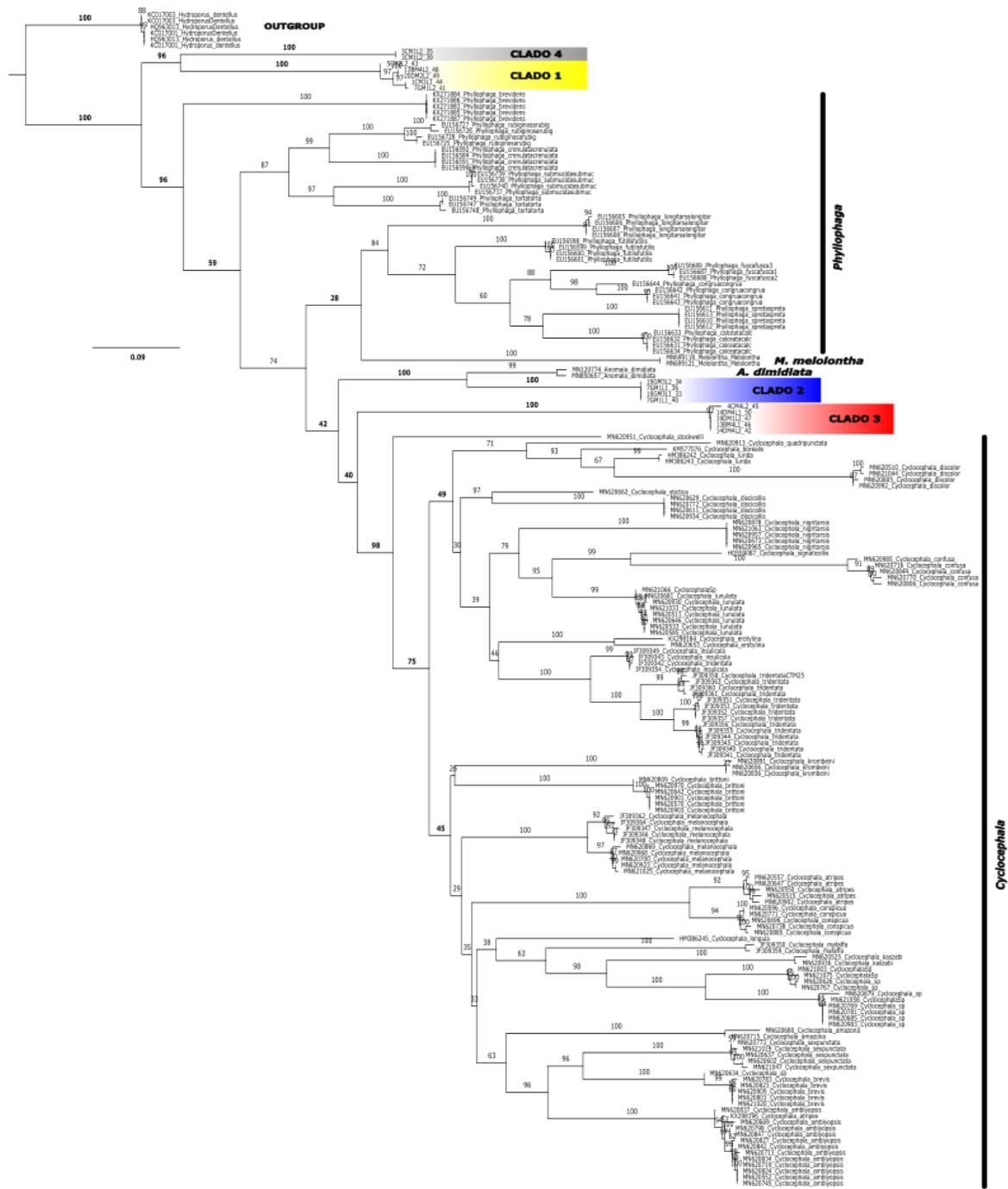
*Nota:* Especies hipotéticas representadas en cajas verticales para cada particionamiento de todas las secuencias (a), larvas *Astaena* afín y otros marceños (b) presentes en cultivos de aguacate en el oriente Antioqueño mediante particionamiento automático (ASAP). Distribución de distancia genética pareada entre las secuencias y el umbral (*línea roja*) calculado para la delimitación de especies (c). Particionamiento con mejor desempeño (*rectángulo rojo*, a-b).

El análisis filogenético mediante Máxima Verosimilitud (ML) en total mostró la presencia de 52 clados, entendidas como agrupaciones de secuencias, de las cuales, la gran mayoría de las secuencias tomadas de Genbank a nivel de especie fueron monofiléticas. A nivel genérico *Phyllophaga* fue parafilético con la presencia de 3 clados estrechamente relacionados entre sí, 1 de estos estuvo más relacionado con las secuencias de la especie *Melolontha melolontha*. El clado formado por el género *Cyclocephala* fue monofilético con alto soporte Bootstrap (BTP) de 98, siendo este el grupo más derivado entre todas las secuencias análiadas. En total, se recuperaron molecularmente las 46 especies (42 especies de referencia obtenidas de Genbank), de las cuales, las larvas de este estudio formaron 4 grupos (C1, C2, C3 y C4), cada uno con BTP de 100 donde presentaron un comportamiento parafilético respecto a la previa identificación morfológica en 4 morfotipos (**Figura 16**).

**FIGURA 16.**

*Árbol de máxima verosimilitud (ML)*

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS



Nota: Árbol ML inferido mediante el modelo evolutivo GTR+F+I+G4 (Kalyaanamoorthy et al., 2017) basado en la subunidad I del gen COI de larvas afines a la especie *A. pygidialis* y otros géneros melolontidos presentes en cultivos de aguacate del oriente antioqueño. 1000 repeticiones de Bootstrap.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

El clado 1 estuvo cercanamente emparentado con las secuencias de C4 (BTP >95), ambas a su vez estaban más relacionadas con las especies del clado en el que se agruparon las especies del género *Phyllophaga* 1 (parafilético en esta reconstrucción); lo que da indicios de que las larvas de C4 correspondan a especies de dicho género y que C1 en realidad corresponde a una sola especie posiblemente del género *Phyllophaga*. El clado 2 presentó alto soporte (BTP 100) y se relacionó en mayor medida (BTP 100) con las secuencias de la especie *Anomala dimidiata*; este grupo además presentó mayor relación con el clado formado por C3 y *Cyclocephala* (**Figura 176**). Finalmente, el clado 3, conformado por las secuencias del morfotipo asociado al género *Astaena*, presentó alto soporte BTP del 100%. Además, presentó bajo soporte (BTP 40) con el clado formado por las secuencias de las especies *Cyclocephala* (**Figura 16**).

Bajo el enfoque bayesiano las relaciones entre las secuencias fueron similares a las encontradas con máxima verosimilitud, en su mayoría con alta probabilidad posterior (**Figura 17**). Las secuencias de los géneros *Phyllophaga* (pp = 22%) y *Cyclocephala* (pp = 100%) bajo este enfoque presentaron monofila, aunque en el primer caso con bajo soporte. C4 y C1, ambos con soporte del 100%, formaron un clado hermano respecto las demás secuencias (pp = 90%), que a su vez presentaron mayor relación con el clado *Phyllophaga*. Las secuencias de *A. dimidiata*, *M. melolontha*, C2 y C3 se agruparon en 1 clado con probabilidad posterior del 84%. Además, con probabilidad posterior del 27% este se relacionó más estrechamente con el grupo formado por las secuencias del género *Cyclocephala*. El clado 2, al igual que los análisis anteriores, se relacionó cercanamente con las secuencias de la especie *A. dimidiata* (pp = 100%). En el caso de C3, con un muy alto soporte (pp = 100%), mantuvo las relaciones encontradas anteriormente con las otras aproximaciones. Además, con probabilidad posterior del 88% C3 estuvo más cercanamente emparentadas con las secuencias de la especie *M. melolontha* (**Figura 17**).

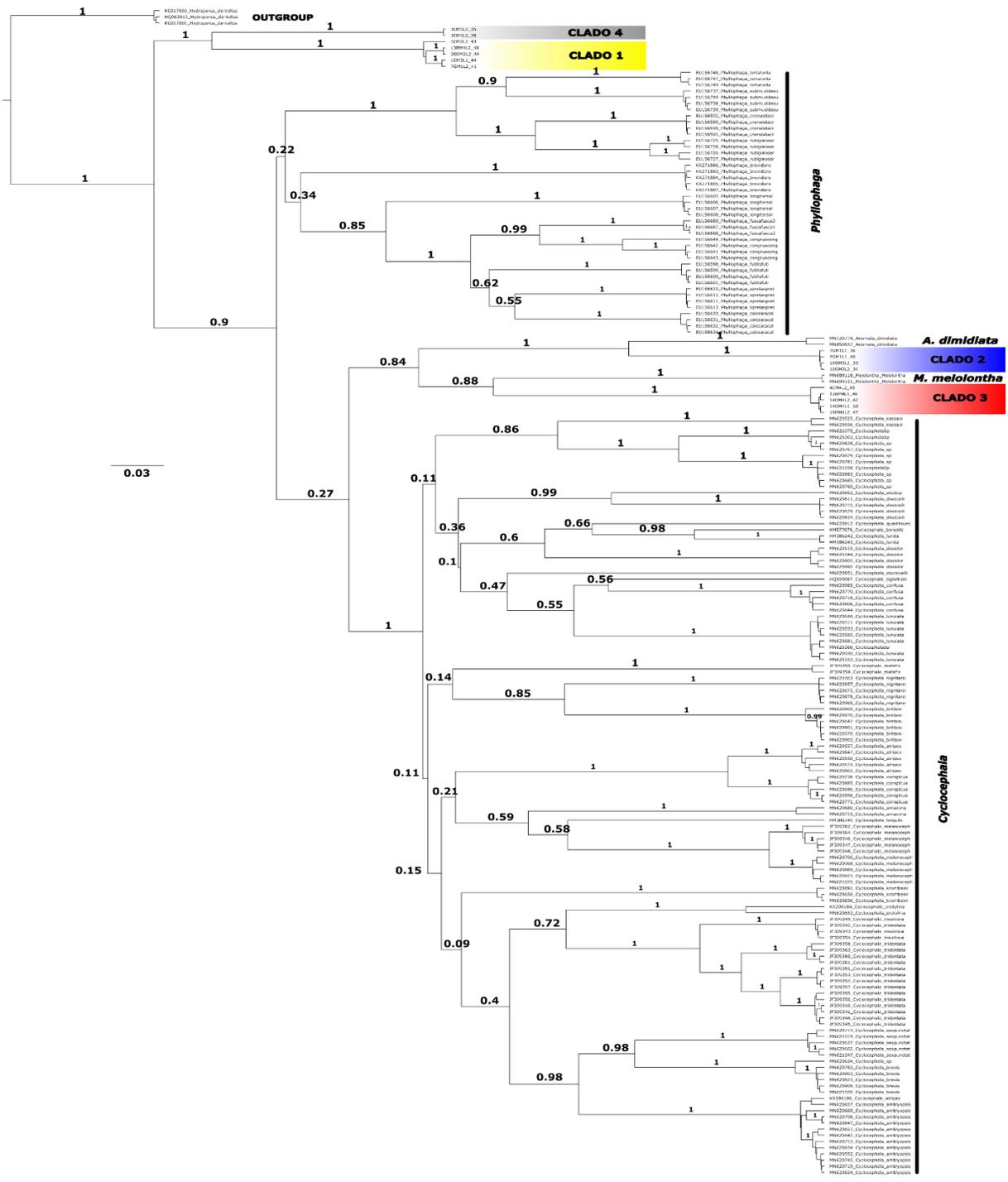
## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

Los diferentes métodos de aproximación a las relaciones filogenéticas y agrupamientos exhibidos entre las secuencias del gen COI pertenecientes a los escarabajos y larvas analizadas en este estudio fueron similares entre sí, dando un fuerte indicio de la presencia de 4 especies entre las larvas de melolontidos presentes en los cultivos de aguacate analizados. La recuperación correcta de todas las especies reportadas para las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos Genbank demostró un buen desempeño del marcado para la identificación de especies de los géneros *Phyllophaga* y *Cyclocephala*. Esta técnica de diagnóstico molecular en el caso de las larvas afines morfológicamente al género *Astaena*, con excepción de 1 individuo, las agrupó en un solo clado o grupo mediante los métodos de asignación de especies ASAP, análisis filogenético de máxima verosimilitud y la filogenia por inferencia bayesiana.

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

FIGURA 17.

Árbol de inferencia bayesiana



Nota: Árbol de clados con máxima credibilidad de inferencia bayesiana a secuencias de larvas afines a *A. pygidialis* y otros géneros de melolontidos presentes en cultivos de aguacate del oriente antioqueños.

### 7. Discusión

**Objetivo específico 1:** Caracterizar el tipo de distribución espacial de larvas de *A. pygidialis* Kirsch y su relación con factores físicos y químicos del suelo en cultivos de aguacate Hass.

#### 7.1.1 *Distribución espacial*

Los Melolontidos dentro de las distintas UPC de aguacate muestreadas durante el primer periodo de tiempo presentaron una abundancia media entre 1.47 en San Pedro y 5.53 en La Ceja (Figura 6). La abundancia media de *Astaena* respecto al total de chizas fue inferior y presentó un rango desde 0.03 en San Pedro hasta 0.3 en La Ceja y El Retiro. Durante el segundo periodo de muestreo se encontró que la media de Melolontidos decreció en La Ceja (UPC A), El Retiro y San Pedro de los Milagros salvo la unidad B donde se mantuvo (Figura 6). La media más baja de larvas *Astaena* para el tiempo 2 se encontró nuevamente en la unidad D (0.1 larvas / 0.3 m<sup>2</sup>), y la máxima en UPC A con 1.16 larvas / 0.3 m<sup>2</sup>. Esta densidad en La Ceja fue similar a lo reportado para los melolontidos *Diloboderus abdurus*, *Eutheola humilis*, *Plectris triticophaga* y *Lyogenys fusca*, considerados plaga en la pampa brasilera, hallados en densidades poblacionales promedio de 1.46 larvas / m<sup>2</sup> y de 4.48 larvas / m<sup>2</sup> en pastizales naturales (Valmorbida et al., 2018).

Se confirmó un patrón agregado (Tabla 2) para la distribución espacial de las larvas *Astaena* dentro de los cultivos de aguacate muestreados en el oriente antioqueño (Figura 7), lo que concuerda con lo exhibido por otros grupos de invertebrados presentes en el suelo (Briar et al., 2011; Johnson et al., 2013; Benefer et al., 2016) e igualmente como algunas especies de escarabajos del género *Oreina* (Ballabeni et al., 2001). Otro aspecto relevante para considerar es la máxima densidad poblacional registrada para el género *Astaena* en este estudio, hasta 36 larvas en un área de tan solo 0.3 m<sup>2</sup>, siendo esta 5 veces mayor a la reportada previamente (36 larvas /

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

m<sup>2</sup>) para *A. valida* por Pardo-Lorcano y colaboradores (2007) en frutales. Esta capacidad de *A. pygidialis* de presentar densas abundancias representa la posibilidad de un alto riesgo y gran impacto económico a los cultivos de aguacate por el potencial daño que puede generar la emergencia de muchos adultos que perjudiquen el cultivo y la imposibilidad de exportación del fruto. Estas altas abundancias pueden ser propiciadas por la casi inexistente intervención del suelo con técnicas como el arado, ya que se ha evidenciado en algunos escarabajos que las mayores abundancias de larvas presentaban alta preferencia de ovoposición en hábitats poco disturbados o intervenidos (Blubaugh y Kaplan, 2015).

### 7.1.2 *Relación del suelo en la incidencia de larvas*

En este estudio se encontró diferenciación de las variables del suelo entre las UPC, principalmente la unidad D en San Pedro de Los Milagros fue significativamente diferente de las otras unidades respecto a temperatura, pH, conductividad y contenido de partículas de arena y arcilla. Esta unidad presentó el suelo con la menor temperatura (**Figura 23**), mayor humedad (**Figura 24**), acidez (**Figura 25**), conductividad eléctrica (**Figura 26**) y porcentajes de arcilla (**Figura 29**) y arena (**Figura 27**) esto junto con la menor abundancia de larvas *Astaena*. En contraste, para el municipio de La Ceja se encontraron las mayores abundancias de inmaduros *Astaena* donde el suelo presentó mayor contenido de limo (**Figura 28**), bajos porcentajes de arcilla (**Figura 29**) y arena (**Figura 27**), por tanto, se evidenció una coincidencia entre las mayores abundancias de larvas *Astaena* con altos contenidos de limo, bajo porcentaje de arcilla y arena en el suelo de las diferentes unidades productivas analizadas. Esta asociación no se reflejó en una relación significativa entre éstas y la abundancia de inmaduros.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

La abundancia de larvas *A. pygidialis* Kirsch presentaron baja correlación negativa con el contenido de arcilla ( $r = -0.19$ ), este comportamiento es similar, pero en mucha menor proporción de covarianza, al exhibido por la abundancia de larvas en el melolontido *Lepidiota negatoria*, la cual, también presentó una correlación inversamente negativa con los contenidos de arcilla (-83%) en el suelo (Cherry y Allsopp 1992). Esta relación no es constante, el también melolontido de la India *Lepidiota albistigma*, en ecosistemas silvestre del valle Assam del bajo Brahmaputra, presentó una tendencia contraria ya que para dicho caso se evidenció alta correlación de la abundancia de sus larvas con el contenido de arcilla ( $r = 0.839$ ) (Gogoi *et al.*, 2019); también es posible que no exista ninguna correlación significativa con las partículas del suelo, como lo sucedido en la especie *Lepidiota crinita* (Cherry y Allsopp 1992).

En general el efecto de las variables físicas y químicas del suelo sobre la abundancia fue bajo (**Figura 9**) y en los casos en los que fue significativo (**Tabla 3**), fue discreta y se presentó únicamente en la unidad D; con lo cual, a pesar de evaluar múltiples parámetros del suelo de manera conjunta e individual, la presencia y abundancia de larvas pudiera estar sujeta a otros factores distintos a los evaluados en el presente trabajo. Investigaciones como las realizadas por Wang *et al.*, 2020, señalan algunos parámetros como materia orgánica, fósforo total, porcentaje de suelo con cobertura vegetal y número de plantas por metro cuadrado, como parámetros que guardan relación positiva con la presencia de los carábidos *Carabus sculptipennis*, *C. vladimirskyi*, *Poecilus gleberi*, *P. fortipes*. Por lo tanto, encontramos que pueden ser evaluados estos parámetros en *Astaena* en futuras investigaciones.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

**Objetivo específico 2:** Determinar hospederos alternos y su incidencia en la presencia de larvas de *A. pygidialis* Kirsch en cultivos de aguacate Hass.

### 7.1.3 *Determinación de hospederos de larvas de A. pygidialis Kirsch en campo*

La relación entre las abundancias de larvas *Phyllophaga*, *Cyclocephala*, *Plectris*, el total de las larvas, los hospedantes y las unidades productivas no fue significativa. El modelo múltiple con las variables abundancias, hospederos y unidades explica el 10% de la variación de *Astaena*. Este modelo, aunque tiene el mayor efecto, es limitado frente a los demás modelos por tener el mayor número de parámetros (AIC = 43.75). El modelo dado por el total de larvas y el hospedero pese a tener el mejor ajuste (AIC = 38.68) su efecto sobre abundancia de larvas fue muy bajo ( $R^2 = 0.06$ ). El segundo modelo con mejor ajuste (AIC = 38.7) dado por el total de larvas, abundancia de *Phyllophaga* y el hospedero presentó un efecto del 9%. Estas relaciones no fueron significativas y pueden obedecer a factores no contemplados en este estudio. Los puntos de muestreos en los que se encontraban los hospedantes kikuyo, cadillo y siempre viva estuvieron asociados con el mayor número de larvas *Astaena* presentes en el suelo.

Estudios asocian las mayores abundancias del género *Astaena* a pastizales, cultivos de café y yuca (Pardo-Lorcano et al., 2002), lo cual concuerda con la presencia de pastos kikuyo, gramalote y jaragua dentro de los cultivos de objeto de estudio. Pese a que no hubo un efecto significativo del tipo de planta hospedera sobre las abundancias (**Figura 11**), cabe resaltar que las temperaturas del suelo entre las unidades productivas analizadas oscilaron poco, entre los 14.9 hasta 20.9 °C, y presentaron humedades próximas al 80%, lo cual fue similar a previos registros realizado por Garcia-Atencia y colaboradores (2015). Estas condiciones ambientales muy parecidas entre sí pueden propiciar la presencia de las larvas sin que se dé una asociación con una

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

pastura en específico. La posible preferencia hacia una de las pasturas puede ser indagadas posteriormente a mayor profundidad para esclarecer la relación larva-planta hospedante.

Según información provista por trabajadores de los cultivos de aguacate, las UPC ubicadas en los municipios de La Ceja y San Pedro de los Milagros fueron anteriormente utilizados para ganadería, en esta última se continúa con actividades de ganadería, específicamente producción de leche en conjunto con cultivo de aguacate. Caso contrario de la UPC ubicada en El Retiro, la cual no presenta antecedentes de actividad ganadera. Las unidades presentes tanto en La Ceja y en San Pedro de los Milagros son cultivos establecidos sobre una matriz de pasto kikuyo, además, tienen áreas contiguas con este mismo pasto, pese a esto, en este estudio no se pudo concluir que dichas áreas efectivamente fueran el origen de diseminación de *A. pygidialis* Kirsch hacia los cultivos de aguacate ya que la abundancia de larvas eran inferiores a las encontradas dentro de los cultivos.

**Objetivo específico 3:** Evaluar la efectividad del uso de código de barras de ADN en la identificación de *A. pygidialis* Kirsch en estados de desarrollo tempranos.

### 7.2.1 *Extracción y amplificación del ADN*

La extracción de material genético se realizó con éxito para las 46 muestras (32 larvas y 14 adultos). El ADN genómico de los adultos presentó alta degradación o fragmentación (**Figura 12**) evidenciada por la electroforesis. La amplificación del gen COI presentó una efectividad de amplificación muy baja (34%) para el total de las muestras y del 50% en larvas. Estos cebadores anteriormente (LCO1490 - HCE2198) han mostrado baja efectividad (61%) de amplificación (Ma et al., 2022) y en algunos escarabajos frecuentemente se pueden obtener secuencias de baja calidad para posteriores análisis moleculares (Albo et al., 2019). Los productos de PCR con baja calidad de secuenciación y los que no amplificaron fueron excluidos para posteriores análisis; los cuales

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

se realizaron a partir de 16 secuencias, todas estas correspondientes a larvas (5 afines a *A. pygidialis*). Las secuencias obtenidas presentaron fuerte sesgo en su composición nucleotídica con dominancia de timina-adenina del 65% (T= 34%, A= 27%), de manera similar a lo encontrado en otros estudios para escarabajos (Ma et al., 2022; Magoga et al., 2018). Para facilitar los análisis sería recomendable utilizar más de 1 pareja de cebadores, de esta manera, maximizar la posibilidad de obtener secuencias de alta calidad en todas las muestras.

### 7.2.2 Identificación molecular de especies

Mediante el árbol filogenético ML se recuperaron 46 especies, dentro de las cuales, las secuencias objeto de estudio se agruparon en 4 clados formando 4 MOTU's, estos fueron correspondientes a los mismos 4 grupos identificados anteriormente mediante ASAP y distancias genéticas K2P. Dos de estos cercanamente emparentados al género *Phyllophaga* (C4 y C1), uno (C2) presentó alta relación con el género *Anomala* y con el MOTU de individuos identificados como *A. pygidialis* Kirsch (**Figura 16**). Esta relación cercana entre *Anomala* y *Cyclocephala* ya ha sido reportada anteriormente (Ahrens y Vogler 2018) pero estos mismos autores también encontraron mayor relación entre las tribus Sericini (*Astaena*) y Melolonthini (*Phyllophaga*, *Melolontha*). En este último, aunque estuvieron cercanamente relacionados, presentaron parafilia. Estas discrepancias pueden deberse a la poca representación en número de secuencias y de especies de las tribus Anomalini, Sericini y otros Melolonthini diferentes a *Phyllophaga* disponibles en las bases de datos moleculares. Para los morfotipos 1, 2 y 3 los caracteres morfológicos no fueron suficientes y por tanto estos grupos no mostraron correspondencia con las relaciones filogenéticas, ya que los clados formados presentaron mezcla entre individuos de diferentes morfotipos como en C1 y C2 donde no se encontró ninguna dominancia clara de un morfotipo específico.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

En el caso de las secuencias correspondientes a larvas identificadas para el género *Astaena* si se encontró una dominancia (4 secuencias de las 5) de estas secuencias en el clado que formaron (**Figura 16**). Aunque la asociación en estados larvales de escarabajos melolontidos desconocidos con adultos previamente identificados sustentado por análisis de secuencias del gen COI a partir de árboles filogenéticos ha sido validado anteriormente con éxito (Nyamwasa et al., 2016), en este estudio dada la ausencia de secuencias de adultos previamente identificados para los cuatro morfotipos establecidos, posiblemente debido a la degradación y fragmentación del material genético extraído, no fue posible realizar una asociación directa larvas-adultos. Pese a esto, las relaciones obtenidas para las secuencias de las larvas ofrecen fuertes indicios sobre su género y la correspondencia de los individuos a un grupo específico o una especie potencial.

La distancia promedio entre las secuencias de las larvas capturadas en este estudio y todas las secuencias fue del 22% ( $\pm 33\% - 0\%$ ) y 24% ( $\pm 37\% - 0\%$ ) respectivamente, siendo éstas muy similares entre sí y denotando además la gran variabilidad que puede existir entre especies cercanamente emparentadas con diferenciación genética de hasta el 37%. A nivel intragrupal el promedio de diferenciación fue del 1.5% ( $\pm 12\% - 0\%$ ) para el total de los grupos y para las larvas del 0.4% ( $\pm 1.2\% - 0\%$ ). El amplio rango de distancia intraespecífica no es inusual ya que en aproximadamente el 25% de insectos, como también de escarabajos, se ha encontrado variación genética intraespecífica superior al 3% (Zhang y Bu 2022), como se evidenció en algunos casos para las especies de referencia tomadas del Genbank en este estudio.

Pese a la poca diferenciación entre frecuencias de las distancias Inter e Intraespecífica menores al 10%, mediante la función threshOpt del paquete SPIDER se evidenció la presencia de un gap en el rango del 2 hasta aproximadamente el 10% de distancia genética (**Figura 14a**). Para determinar el umbral de diferenciación de especies, una de las principales dificultades para

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

establecerlo está relacionada precisamente a la variabilidad de las distancias intra e interespecíficas que en muchas ocasiones pueden sobreponerse (Ma et al., 2022) y en algunos casos han hallado que la distancia máxima media intraespecífica es mayor a la media mínima interespecífica (Zhang y Bu 2022). Lo que hace que los umbrales puedan variar notablemente entre grupos, por ejemplo, para Entiminos (Coleoptera: Curculionidae) la distancia con mejor desempeño para delimitación general de especies fue del 9%, pero se evidenció que dicho umbral variaba en un rango del 7% hasta el 13% según el género (Ma et al., 2022); y en escarabajos de las subfamilias Melolonthini (*Melolontha*, *Phyllophaga*) y Ruteline (*Anomala*) también se encontraron umbrales distintos para cada grupo (Nyamwasa et al., 2016).

Dada la variabilidad entre las frecuencias de distancias, el gap encontrado fue bastante amplio y no se asoció a una distancia en específico, por tanto, mediante la función LocalMinima de SPIDER, que identifica dentro de la matriz de distancias la transición de estas de Intra a Interespecífica, se calculó la distancia umbral en 2.99%, la cual, se encuentra dentro del gap identificado. Otro factor que soporta esta distancia es que estuvo asociada a una de las menores tasas de error acumulado en la asignación de especies encontradas (**Figura 14b**). Al implementar un análisis de agrupamiento con la función tclust del mismo paquete con una distancia del 2.99% se estimaron la presencia de 50 MOTU's entre las secuencias, conservando las unidades taxonómicamente C1, C2, C3 (afín a *A. pygidialis*) y C4. Este umbral es muy cercano al 3%, que es en promedio la distancia encontrada entre especies de lepidópteros (Hebert et al., 2003b) y que ha tenido muy buen desempeño en la identificación de diferentes grupos de insectos incluyendo a los escarabajos (Zhang y Bu 2022).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

El agrupamiento con mejor desempeño estimado por ASAP calculó un umbral del 3.5%, estimando 51 especies en total, de las cuales, *A. pygidialis* (C3) y los otros clados de larvas no variaron su composición de secuencias; manteniéndose acorde a lo reportado por los otros análisis. Se debe tener en cuenta que con un umbral del 3% se ha encontrado en insectos aproximadamente un 7% de sobrestimación en la riqueza de especies respecto a mayores umbrales, en este caso, para los melolontidos de este estudio tanto SPIDER como ASAP presentaron sobrestimación del 8.6% y 10.8% respectivamente, cercana a lo estimado en general para insectos (Zhang y Bu 2022). Está sobrestimación obedece principalmente a la separación de individuos de una especie en 2 o más MOTU's, específicamente aquellas cuya variabilidad intraespecífica es superior al umbral. Estos umbrales son similares a los registrados para otros escarabajos, como los del género *Turanium* (Cerambycidae): *T. losi* y *T. pilosum*, separados por una distancia estimada por SPIDER y ASAP del 3% aproximadamente (Karpiński et al., 2021). Estos han mostrado un desempeño del 80% de coincidencia respecto a la clasificación morfológica. Mediante SPIDER se tiende a subestimar la riqueza y con ASAP es frecuente una sobrestimación de especies. Ambos métodos tienen baja incidencia de mezcla entre individuos de especies morfológicamente (Magoga et al., 2021).

A partir del enfoque bayesiano los MOTU's se mantuvieron y en todos los casos con 100% de probabilidad posterior, confirmando de esta manera la correspondencia de las larvas *A. pygidialis* Kirsch a una misma especie. En este análisis, *Phyllophaga* presentó monofila al igual que *Cyclocephala*, pero la tribu Melolonthini no lo fue, pues *M. melolontha* presentó estrecha relación con clado 3 (88% PP), estas a su vez formaron un clado (84% PP) con las cercanamente emparentadas *Anomala dimidiata* y C2 (100% PP). Nuevamente *Anomala* estuvo relacionada con *Cyclocephala* al igual que han reportado otros autores mediante inferencia bayesiana (Ahrens y Vogler 2018; Neita et al., 2019) pero en este caso se presentó, como anteriormente se encontró, la

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

inserción C3 sumado está vez a la de *Melolontha melolontha* (**Figura 17**). Se debe tener en cuenta que estudios en 8 órdenes de Insecta, incluido coleóptera, han encontrado alta cohesión entre estos, exceptuando esté ultimo que se subdividió en 3 grandes sub-clados (Hebert et al., 2003b) aunado a la variabilidad genética, riqueza de escarabajos y el hecho de que un árbol de especies no siempre corresponde a un árbol de genes (Zhang y Bu 2022) este tipo de discordancia son frecuentes.

La sobreposición de divergencia inter e intraespecífica sumado a la parafilia por posible introgresión por hibridación del gen COI pueden representar hasta el 20% de los casos de identificación errónea (Talavera et al., 2013). En coleopteros de Europa central han encontrado que especies diferentes morfológicamente no presentaron distancia genética intergrupales (Hendrich et al., 2014) y en algunos escarabajos del grupo Curculionidae también se han encontraron entre especies totalmente distintas, pero cercanamente emparentadas, casos de secuencias COI idénticas (Astrin et al., 2012); lo que puede ser relativamente común en insectos (Whitworth at al., 2007). También se ha encontrado que un mayor número de haplotipos se relaciona a menor eficiencia en la identificación de los principales métodos de identificación molecular y que la presencia de especies de difícil identificación morfológica puede generar la mezcla entre miembros de diferentes especies (Magoga et al., 2021) como ocurre en esté estudio para las larvas de melolontidos. Con lo cual, la no correspondencia entre los morfotipos establecidos y las relaciones genéticas obtenidas pudo estar influenciada a la ya mencionada dificultad para su identificación morfológica durante los estados juveniles, sumado a la ausencia de secuencias para adultos.

Las aproximaciones integradas de metodologías como SPIDER, ASAP, inferencia bayesiana, máxima verosimilitud y caracteres morfológicos brindan fuertes indicios para la delimitación de especies a partir de secuencias del gen mitocondrial COI (Karpiński et al., 2021).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

En aquellos casos en que la identificación morfológica sea especialmente difícil como sucede en los estados larvales y además en los casos en que se requiera implementar métodos de identificación de manera rápida y oportuna, como en sistemas de producción agrícola; los enfoques a partir de distancia genéticas apoyados en análisis filogenéticos brindan grandes luces en la identificación de especies potenciales o MOTU's que puedan ser posteriormente sometidos a contrastación con aspectos ecológicos.

### 8. Conclusiones

La relación entre la temperatura, humedad, conductividad eléctrica, pH, contenido de arena, arcilla y limo en el suelo con la abundancia de larvas de *Astaena pygidialis* en cada unidad productiva fue distinta; posiblemente a causa de la variabilidad de suelo en términos de orden presentes en las unidades productivas. Por otra parte, factores como tipo de uso de la tierra presente en las unidades productivas antes del establecimiento de las plantaciones de aguacate, altitud, condicionan la presencia de ciertas especies consideradas hospederos de *Astaena*. No obstante, la baja o alta asociación con variables de suelo tales como H, C.E, Y % a permitieron el ajuste de los modelos de estimación de abundancia de larvas, es probable que al incluir nuevas variables de suelo distintas a las contempladas en este estudio puedan darse mejor ajuste a los modelos estudiados.

En los cultivos de aguacate cv. Hass con presencia cercana o dentro de la plantación de vegetaciones hospedantes como Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y Cadillo (*Bidens pilosa*) muestra que existe un efecto significativo sobre la abundancia de larvas *A. pygidialis*, por lo cual, la presencia de este tipo de hospederos puede servir de indicativo a la presencia de *A. pygidialis*. Así mismo, en el establecimiento de nuevas plantaciones de aguacate la aparición e incidencia de esta plaga pudiera estar condicionada por la presencia de dichos hospederos.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

La identificación de especies mediante marcadores moleculares es un método apropiado para el diagnóstico rápido de los estados larvales del escarabajo melolontido *A. pygidialis* Kirsch, siempre y cuando se logre obtener la relación filogenética entre secuencias de larvas y adultos plenamente identificados por un experto. Esto facilita la detección temprana de *A. pygidialis* Kirsch en los cultivos de aguacate cv. Hass y de esta manera la implementación oportuna de medidas de control que disminuyan la incidencia de *Astaena* en los cultivos de aguacate, no solo en cultivar Hass, sino en otros cultivares y otros cultivos afectados por este escarabajo.

Estos hallazgos representan un avance hacia el desarrollo de nuevas técnicas agrícolas de precisión, constituyéndose en bases fundamentales sobre las cuales se puedan diseñar medidas de manejo y control orientadas a disminuir el impacto ambiental, tanto en cultivos de aguacate como en otros cultivos afectados por escarabajos marceños. Estudios de este tipo, aportan al sector agronómico de nuevas herramientas para ser implementadas sobre otros modelos biológicos de características similares, en búsqueda de mejorar la productividad y la sostenibilidad de los sistemas productivos del país.

La diversidad en las relaciones entre las variables ambientales, como temperatura, humedad, conductividad eléctrica, pH y composición del suelo (contenido de arena, arcilla y limo), y la abundancia de larvas de *Astaena* en cada unidad productiva sugiere una compleja interacción suelo-plaga, posiblemente influida por las variaciones en los órdenes de suelo presentes en dichas unidades. Aunque estas relaciones fueron estadísticamente significativas y explicaron el 11% de la variabilidad en la abundancia de larvas, la modesta proporción resaltada subraya la presencia de factores adicionales aún no explorados que demandan una consideración más exhaustiva.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

La influencia significativa de variables como el tipo de uso de suelo previo y la presencia de vegetación hospedante, como Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y Cadillo (*Bidens pilosa*), cerca o dentro de las plantaciones de aguacate cv. Hass, resalta la necesidad de abordar aspectos más amplios del entorno agrícola en futuras investigaciones. Estos hallazgos sugieren que la presencia de hospederos específicos puede actuar como indicador predictivo de la presencia de larvas de *A. pygidialis*, subrayando la importancia de examinar las interacciones entre la vegetación circundante y la dinámica poblacional de la plaga.

La aplicación exitosa de marcadores moleculares para la identificación de especies, aunque prometedora, está condicionada por la necesidad de establecer relaciones filogenéticas precisas entre secuencias de larvas y adultos debidamente identificados por expertos. Este enfoque permite la detección temprana de *A. pygidialis* en los cultivos de aguacate cv. Hass, lo que impulsa la implementación oportuna de medidas de control. Este aspecto es crucial para reducir la incidencia de *Astaena* no solo en el cultivar Hass, sino también en otras variedades de aguacate y en cultivos afectados por este escarabajo.

Estos resultados representan un progreso significativo hacia el desarrollo de técnicas agrícolas de precisión, estableciendo cimientos sólidos para la formulación de estrategias de manejo y control. La orientación de estas estrategias hacia la reducción del impacto ambiental no solo es relevante para los cultivos de aguacate, sino que también presenta aplicaciones potenciales en otros cultivos afectados por escarabajos marceños. En este contexto, los resultados de este estudio no solo contribuyen al conocimiento científico, sino que también proporcionan herramientas prácticas para mejorar la productividad y sostenibilidad de los sistemas agrícolas, destacando la importancia de las dinámicas ecológicas entre especies plaga, suelo y cultivos.

### Referencias bibliográficas

- Acevedo, D. (2005). *Identificación de Melolonthidae fototácticos (Coleoptera: Scarabaeodae: Pleurosticti) en siete localidades del departamento de Antioquia*. Tesis (Magíster en Entomología), Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
- AGRONET. Red de información y comunicación del sector Agropecuario Colombiano. (2022). <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
- Ahrens, D., Monaghan, M. y Vogler, A. (2007). DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). *Mol Phylogenet Evol.* (44), 436-449.
- Akter, M., Siddique, S., Momotaz, R., Arifunnahar, M., Alam, K. y Mohiuddin, S. (2019). Biological control of insect pests of agricultural crops through habitat management was discussed. *Journal of agricultural chemistry and environment.* (8), 1-13.
- Allsopp, P. Klein, M. y McCoy, E. (1992). Effect of soil moisture and soil texture on oviposition by Japanese Beetle and Rose Chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). *Ecology and behavior.* 85(6), 2194-2200.
- Albo, J., Marelli, J. y Puig, A. (2019). Rapid Molecular Identification of Scolytinae (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Mol. Sci.* (20) 5944.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* (215), 403-410
- Andresen, E. (2005). Interacción entre primates, semillas y escarabajos coprófagos en bosques húmedos tropicales: un caso de diplocoria. *Universidad y Ciencia.* (2): 73-84.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Arias, C., Martínez, J., Morales, J. y Ramírez-Gil. (2020). Spatial analysis of presence, injury and economic impact of the Melolonthidae (Coleoptera: Sacarabaeoidea) complex in avocado crops. *Neotropical Entomology*. doi: 101007/s13744-019-00685-6.
- Atoche, P. (2017). Modelos de regresión con datos de conteo, aplicación a competiciones deportivas. Tesis de grado. Universidad de Sevilla. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/63085/Atoche%20Calzada%20Pablo%20TFG.pdf;jsessionid=DF2A07AA190DE2ED7A0D4FB990C8825E?seq>.
- Astrin, J., Stüben, P., Misof, B., Wägele, J., Ginnich, F., Raupach, M. y Ahrens, D. (2012). Exploring diversity in cryptorhynchine weevils (Coleoptera) using distance-, character- and tree-based species delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* (63), 1–14.
- Aragón, G., Morón, M., Tapia, A. Pérez–Torres, B. y López–Olguín, J. (2010). Gallina ciega en Puebla, pp. 337–347. In: Rodríguez del Bosque, L. y Morón, M. (Eds.). *Plagas del Suelo*. Mundi Prensa México. S.A. de C.V.
- Avise, J. (1989). A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology y Evolution*. (9) 279–281. doi:10.1016/0169-5347(89)90203-6
- Avances en la investigación de escarabajos marceños (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de aguacate en Antioquia. En: Rodríguez, J. y O. Ascuntar-Osnas. *Memorias Congreso Colombiano de Entomología*. Santiago de Cali, Colombia
- Ballabeni, P., Conconi, D., Gateff, S. y Rahier. M. (2001). Spatial proximity between two host plant species influences oviposition and larval distribution in a leaf beetle. *Oikos*, 92(2), 225–234. doi:10.1034/j.1600-0706.2001.920204.x

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Bellwood, P. (2011). Holocene population history in the Pacific region as a model for worldwide food producer dispersals. *Current Anthropology*. 52(4): 363–378.
- Benefer, C., Andrew, P., Blackshaw, R., Ellis, J. y Knight., M. (2010). The spatial distribution of phytophagous insect larvae in grassland soils. *Applied soil ecology*. 45(3) 269-274
- Benefer, C., D'Ahmed, K., Blackshaw, R., Sint, H. y Murray., P. (2016). The distribution of soil insects across three spatial scales in agricultural grassland. *Frontiers in Ecology and evolution*. 71(4) 699-704.
- Bernal, R. (2011). Estudio del complejo de chizas rizófagas (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de fresa (*fragaria sp*) y agroecosistemas asociados en el municipio de Soratá, departamento del Cauca. Tesis para optar al título de Ingeniero Agropecuario. Universidad del Cauca. Popayán, Colombia. 57p.
- Barrett, R. y Hebert., P. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zool*. (83), 481-491.
- Blubaugh, C. y Kaplan., I. (2015). Tillage compromise weed seed predatory activity across developmental stage. *Biological control*. (81), 76-82pp.
- Boyer, S. Brown, S., Malumbres-Olarte, J., Vink, C., Cruickshank, R. y Collins, R. (2012). Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Mol Ecol Resour*. 12:562–5.
- Bran, A. (2005). Aspectos básicos de los estados inmaduros del complejo chisa (Coleoptera: Melolonthidae) asociados a cultivos de papa en tres municipios de Antioquia, Colombia. (Tesis de pregrado). Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 51 p.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Bran, A. Londoño, C. y Pardo, L. (2006). Morfología de estados inmaduros de tres especies de *Cyclocephala* (Coleoptera: Melolonthidae) con una clave para larvas de tercer estado en Colombia. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 7(2) 58-66.
- Briar, S. Fonte, S., Park, I., Six, J., Scow, K. y Ferris, H. (2011). The distribution of nematodes and soil microbial communities across soil aggregate fractions and farm management systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(5), 905–914.
- Brill, N. Osborne, J. y Abney, M. (2013). A spatial ecology study on the effect of field conditions and crop rotation on the incidence of *Plectris aliena* (Coleoptera: Scarabaeidae) grub damage to sweet potato roots. *Pest management*. 5(42): 1046-1051.
- Brown, J. Scholtz, C., Janeau, J., Grellier, S. y Podwojewski, P. (2010). Dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) can improve soil hydrological properties. *Applied Soil Ecology*. 46(1) 9–16.
- Cao, D. Pimentel, D. y Hart, K. (2002). Postharvest crop losses (insects and mites). *Encyclopedia of pest management*. 648–649
- Carrillo H. y Morón, M. (2003). Fauna de Coleóptera Scarabaeoidea de Cuetzalan del Progreso, Puebla, México. *Acta Zoologica Mexicana*. (88),87-121.
- Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, E. y De Mattia, F. (2010). DNA barcoding: six question tour to improve users awareness about the method. *Brief Bioinform*. (11),440-453.
- Chagnon, M., Kreutzweiser, D., Mitchell, E., Morrissey, C., Noome, D. y Van der Sluijs, J. (2015). Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environmental science and pollution research international*. 22(1). 119–134.  
doi:10.1007/s11356-014-3277-x

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Chen, M y Dorn, S. (2010). Microsatellites reveal genetic differentiation among populations in an insect species with high genetic variability in dispersal, the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of entomological research*. 1(100), 75-85. doi:10.1017/S0007485309006786
- Cherman, M. y Morón, M. (2014). Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 30(1): 201-220.
- Cherry, R. y Allsopp, P. (1992). Soil texture and the distribution of *Antitrogus parvulus* Britton, *Lepidiota crinita* brenske and *I. negatorza* blackburn (Coleoptera: Ccarabaeidae) in south queensland sugarcane fields. *Journal Australian entomology society*. (30), 89-92p
- Collins, F. y Paskewitz, S. (1996). A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic Anopheles species. *Insect Molecular Biology*. 5(1) 1–9. doi:10.1111/j.1365-2583.1996.tb00034.x
- Curry, J. (1994). Grassland invertebrates: Ecology, influence on soil fertility and effects on plant growth. Department of environmental resource management. 1st ED. Chapman & Hall. Ireland.
- Danielson, R y P. Sutherland. (1986). Porosity. En: Klute A. (Ed). Methods of soil analysis. Physical and mineralogical methods. *American Society of Agronomy – Soil Science Society of America*, 443-460.
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R. y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*. (9), 772.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Day, P. (1965). Particle fractionation and particle-size analysis. En: Methods of soil analysis. *American Society of Agronomy- Soil Science Society of America. Madison. 545-562.*
- Drummond, A, M. Suchard, D. Xie, A. Rambaut. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* (22),1185-1192.
- Eberle, J., Fabrizi, S., Lago, P. y Ahrens, D. (2017). A historical biogeography of megadiverse Sericini – another story “out of Africa”?. *Cladistics.* (33), 183-197.
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acid research.* 32(5), 1792–1797.
- Elbrecht, V. y Leese, F. (2017). Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment. *Frontiers in environmental science.* 5(11), 1-9.
- Elbrecht, V. Braukmann, T., Ivanova, N., Prosser, S., Hajibabaei, H., Wright, M., Zakharov, E., Hebert, P. y Steinke., D. (2019). Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. *PeerJ.* 7:e7745 <https://doi.org/10.7717/peerj.7745>
- Evans, V. y A. Smith. (2007). An electronic checklist of the new world chafers (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthinae) Version 2. Updated: March 2007. Tribe SERICINI Kirby, 1837.
- Espinal, L. (1992). Geografía Ecológica de Antioquia: Zonas de vida. Ed. Lealon. Medellin. 146p
- FINAGRO. 2018. Ficha de inteligencia Aguacate. Elaborado por: Unidad de gestión de riesgos agropecuarios (UGRA).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Folmer, O., Black, M., Hoeh., W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine biology and biotechnology*. 3:294–9.
- Fennell, J., Fountain, M. y Paul, N. (2019). Direct effects of protective cladding material on insect pests in crops. *Crop Protection*. (121), 147–156. doi:10.1016/j.cropro.2019.04.003
- Forsythe, W. (1975). Física de suelos. Manual de laboratorio. Editorial. IICA. San José, Costa Rica. 212 p.
- Fuller, D. y Castillo, C. (2015). Diversification and Cultural Construction of a Crop: The Case of Glutinous Rice and Waxy Cereals in the Food Cultures of Eastern Asia. In: Lee-Thorp, J and M. Katzenberg (eds.) *The Oxford Handbook of the Archaeology of Diet*. Oxford University Press: Oxford, United Kingdom.
- Frézal, L. y Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect Genet Evol*. 8:727-736.
- García-Atencia, S. y Martínez-Hernández, N. (2015). Escarabajos fitófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) del Departamento del Atlántico, Colombia. *Acta Zoológica Mexicana*. 31(1):89-96
- García-Atencia, S., Martínez-Hernández, N. y Pardo-Locarno, L. (2015). Escarabajos fitófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) en un fragmento de bosque seco tropical del departamento del Atlántico, Colombia. *Revista Mexicana de biodiversidad*. 86 754-763.
- García-Navarrete, P., Soria-Ortiz, G. y González-Salazar, C. (2021). Interacciones potenciales parásito-hospedero entre el escarabajo *Dendroctonus* (Coleoptera: Scolytidae) y *Pinus*

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- (Pinaceae) en México. *Revista de Biología Tropical*, 69(3), 1004-1022.  
<https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v69i3.45910>
- Gogoi, D., Bhattacharyya, B., Himangshu, M., Sudhansu, B., y Bhattacharjee, S. (2019). Distribution and abundance of *Lepidiota albistigma* in relation to soil physicochemical properties in lower Brahmaputra valley of Assam. *Indian journal of entomology*. 4(81): 688-693. doi: 10.5958/0974-8172.2019.00190.1
- Granados, W. y Valencia, J. (2018). Cadena de aguacate: Indicadores e instrumentos. Ministerio de agricultura de Colombia.  
<https://sioc.minagricultura.gov.co/Aguacate/Documentos/2018-07-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
- Grimaldi, D. y Engel, M. (2005). Evolution of the insect. Cambridge University Press. Cambridge.
- Guindon, S. y Gascuel, O. (2002). A Simple, Fast, and Accurate Method to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systems Biol.* 52.
- Hann, P., Trska, C., Wechselberger, K., Eitzinger, J. y Kromp, B. (2015). Phyllopertha horticola (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae in Eastern Austria mountainous grasslands and the associated damage risk related soil. *Topography and management. SpringerPlus.* (4), 139.
- Hajibabaei, M., Janzen, D., Burns, J., Hallwachs, W. y Hebert, P. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci.* (103), 968-971.
- Hajibabaei, M., Singer, G., Hebert, P., Hickey, D. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* (23), 167-172.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Hall, T. (1999). Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium series*. (41), 95-98.
- Hammond, P. (1992). Species inventory. Living resources. Global Biodiversity. Chapman & Hall. London. 17-39p
- Harvey, M., Dadour, I. y Silvana, G. (2003). Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in Western Australia. *Forensic Sci Int*. (131), 134-139.
- Hebert, P., Ratnasingham, S. y DeWaard, J. (2003a). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. London*. (270), s96-s99.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. y Waard, J. (2003b). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society, Biological Science*. 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- Hebert, P., Stoeckle, M., Zemlak, T. y Francis, C. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *Plos Biol*. (2), 1657-1663.
- Hendrich, L., Jérôme, M., Gerhard, H., Hebert, P., Hausmann, A., Frank, K. y Michael, B. (2014). A comprehensive DNA barcode database for central European beetles with a focus on Germany: adding more than 3500 identified species to BOLD. *Mol Ecol Resour*. (15), 795-818.
- Hughes, G. (1996). Incorporating spatial patterns of harmful organisms into crop loss model. *Crop protection*. 15(5), 407-421.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Holguin, C. y Neita, J. (2018). Avances en la investigación de escarabajos marceños (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de aguacate en Antioquia. En: Rodríguez, J. y O. Ascuntar-Osnas. Memorias Congreso Colombiano de Entomología. Santiago de Cali, Colombia. Julio 11 al 13. 36 pp
- Holguin, C. y Neita, J. (2019). Variación temporal y espacial de escarabajos (Coleoptera: Melolonthidae) asociados al cultivo de aguacate en Antioquia, Colombia. World Avocado Congress. Medellín 23-27 septiembre. <https://worldavocadocongress.co/es/memorias/>. WAC 132.
- Holguin, C. y Mira, R. (2021). Report of *Astaena pygidialis* Kirsch (Coleoptera: Scarabaeidae), the main chafer beetle causing damage to avocado fruit and young leaves in Antioquia Department, Colombia. *Florida Entomologist*.
- Johnson, S., Mitchell, C., McNicol, J., Thompson, J. y Karley, A. (2013). Downstairs drivers - root herbivores shape communities of above-ground herbivores and natural enemies via changes in plant nutrients. *Journal of Animal Ecology*. 82(5) 1021-1030.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B., Wong, T., Von Haeseler, A. y Jerni, L. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. (14), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Karimzadeh, R., Hejazi, M., Helali, H., Iranipour, S. y Mohammadi, S. (2011). Analysis of the spatio-temporal distribution of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) by using spatial analysis by distance indices and geostatistics. *Environmental Entomology*. 40(5) 1253-1265.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Karpiński, L., Szczepański, W., Plewa, R., Kruszelnicki, L., Koszela, K. y Hilszczanski, J. (2021). The first molecular insight into the genus *Turanium* Baeckmann, 1922 (Coleoptera: Cerambycidae: Callidiini) with a description of a new species from Middle Asia. *Arthropod Systematics & Phylogeny*. (79), 465-484.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. (16), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kowalska, Z., Pniewski, F. y Latała, A. (2019). DNA barcoding – A new device in phycologist's toolbox. *Ecology & Hydrobiology*. 3(19), 417-427.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 6(35), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Krishnamurthy, K. y Francis, R. (2012). A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation*. 21(8), 1901–1919.
- Lee, R., Elnitsky, M., Rinehart, J., Hayward, S., Sandro, L. y Denlinger, D. (2006). Rapid cold-hardening increases the freezing tolerance of the Antarctic midge *Belgica antarctica*. *Journal of Experimental Biology*. 209(3). 399-406.
- Lefort, M., Boyers, S., Vereijssen, J., Sprague, R., Glare, T. y Worner, S. (2015). Preference of a native beetle for "exoticism," characteristics that contribute to invasive success of *Costelytra zealandica* (Scarabaeidae: Melolonthinae). *PeerJ*. (3), e1454. doi: 10.7717/peerj.1454

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Lefort, M., Boyer, S., De Romans, S., Glare, T., Armstrong, K. y Worner, S. (2014). Invasion success of a scarab beetle within its native range: host range expansion versus host-shift. *PeerJ*. 2. e262. doi:10.7717/peerj.262
- Levine, E. y H. Oloumi-Sadeghi. (1996). Western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larval injury to corn grown for seed production following soybeans grown for seed production. *Journal of Economic Entomology*. 89 1010–1016
- Leyton-Flor, S., Gordillo, M., González, P., OSPINA, J. y G. Vargas. (2018). Distribución espaciotemporal de *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) en el valle del río Cauca, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 44(2), 177-186
- Li, H., Syvertsen, J., Stuart, R., McCoy, C., Schumann, A. y Castle, W. (2004). Soil and *Diaprepes abbreviatus* root weevil spatial variability in poorly drained citrus grove. *Soil science*. 169(9) 650-662.
- Londoño, M. (2014). Cucarrones marceños. En: Actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas (BPA) del cultivo del aguacate. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*. 245-247.
- Ma, Z., Ren, J. y Zhang, R. (2022). Identifying the Genetic Distance Threshold for Entiminae (Coleoptera: Curculionidae) Species Delimitation via COI Barcodes. *Insects*. (13), 261. <https://doi.org/10.3390/insects13030261>
- McColloch, J. y Hayes, W. (1922). The Reciprocal Relation of Soil and Insects. *Ecology*. 3(4), 288-301.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Martínez-Hernández, N., Gracia, S., Guitiérrez, M., Sanjuán, S. y Contreras, C. (2010). Composición y estructura de la fauna de escarabajos (Insecta: Coleoptera) atraídos por trampas de luz en la reserva ecológica de Luriza, Atlántico, Colombia. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*. (47), 373-381.
- Martín, E., Moreno, M., Silenzi, G. y Bonano, M. (2017). Comparación de métodos de extracción de ADN para el género *Astylus* (Coleoptera: Melyridae). *Acta zoológica lilloana*. 61(1): 55–64
- Magoga, G., Fontaneto, D. y Montagna, M. (2018). Barcoding of Chrysomelidae of Euro-Mediterranean area: efficiency and problematic species. *Scientific reports*. (8), 13398.
- Magoga, G., Fontaneto, D. y Montagna, M. (2021). Factors affecting the efficiency of molecular species delimitation in a species-rich insect family. *Molecular ecology resources*.
- Mejía, A. (2015). Perspectivas del aguacate Hass en Colombia. Actas proceedings. VIII Congreso mundial de la Palta. Lima, Perú. 477-479.
- Mgocheki, N., Conlong, D., Ganeshan, S. y Addison, P. (2012). Using morphological and molecular techniques for the identification of white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proc S Afr Sug Technol Ass.* (85), 108-113.
- Midgarden, D., Fleisher, R., Weisz, R. y Smilowitz, Z. (1997). Impact of site-specific IPM on the development of esfenvalerate resistance in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) and on densities of natural enemies. *Journal Economic Entomology*. (90), 855–867.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Miller, K., Yves, A., Wolfe, G. y Whiting, M. (2005). Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* (Motschulsky) (Coleoptera: Dytiscidae). *Syst Entomol.* (30), 499-509.
- Moradi-Vajargah, M., Golizadeh, A., Rafiee-Dastjerdi, H., Zalucki, M., Hassanpour, M. y Naseri, B. (2011). Population density and spatial distribution pattern of *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae) in Ardabil, Iran. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici.* 39(2), 42-48.
- Morisita, M. (1959). Measuring of the dispersion and analysis of distribution patterns. Memoires of the Faculty of Sciences, Kyushu University. *Series E. Biology.* (2), 215-235.
- Morón, M. (2001). Larvas de escarabajos del suelo en México (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta zoológica mexicana.* (1), 111-130.
- Morón, M. (2006). Revisión de las especies de *Phyllophaga* (Phytalus) grupos *obsoleta* y *pallida* (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae). *Folia Entomol. Mex.* 45(Supl. 1), 1-104.
- Morón, M. (1994). Aspectos biológicos sobre Scarabaeidae (sensu lato) (Insecta: Coleoptera). En: Memorias XXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín, Colombia. P. 151-158.
- Neita, J. y Gaigl, A. (2008). Escarabajos de importancia Agrícola en Colombia (Scarabaeoidea: Pleurosticti). Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá D.C., 160 pp

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Nguyen, L., Schmidt, H., Von Haeseler, A. y Minh, B. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*. 32(1), 268-274.
- Nyamwasa, I., Li, K., Yin, J., Zhang, S., Kajuga, J., Hategekimana, A., Waweru, B. y Li, H. (2016). Occurrence of soil insect pests: insight from classical identification supplemented with DNA barcoding. *International Journal of Pest Management*. 1(63) 18-29. doi:10.1080/09670874.2016.1211771
- Oberemok, V., Laikova, Y., Zaitsev, A., Nyadar, P. y Adeyemi, T. (2015). A short history of insecticides. *Journal of Plant Protection Research*. 55(3), 221–226.
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M., Lahti, L., McGlenn, D., Ouellette, M., Ribeiro, E., Smith, T., Stier, A., Ter-Braak, C. y Weedon, J. (2022). Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Oliveira, C., Auad, A., Mendes, S. y Frizzas, M. (2014). Crop Losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection*. (56), 50-54. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.022>
- Palacio, M. (2010). Determinación de las especies de *Astaena* (Coleoptera: Melolonthidae) asociadas a cultivos en dos altiplanos colombianos. Tesis maestría. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. 74p.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Pardo-Locarno, L., Gonzáles, J., Perez, C., Yepes, F. y Fernández, C. (2012). Escarabajos de importancia agrícola (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) en la región caribe colombiana: registros y propuestas de manejo. *Boletín del museo entomológico*. 4(4): 7-23
- Pardo-Locarno, L., Morón, M. y Montoya-Lerma, J. (2007). Descripción de los estados inmaduros de *Astaena valida* (Coleoptera: Melolonthidae: Sericini). *Acta zoológica mexicana*. 23(2) 129-141.
- Pardo-Locarno, L., Montoya-Lerma, J. y Schoonhoven, A. (2002<sup>a</sup>). Abundancia de chisas rizófagas (Coleóptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de Caldono y Buenos Aires, Cauca, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 29(2), 177-183
- Pardo-Locarno, L., Morón, M., Gaigl, A. y Bellotti, A. (2002<sup>b</sup>). Los complejos regionales de Melolonthidae (Coleoptera) Rizófagas en Colombia. En: Estudios sobre Coleópteros del suelo en América. Aragón, G. M. Morón, J. Marín (Eds.) 2003. Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 45-63p.
- Pardo-Lorcano, L. (2000). Avances en el estudio de chisas rizófagas (Coleoptera: Melolonthidae) en Colombia, observaciones sobre los complejos regionales y nuevos patrones morfológicos de larvas. En: Memorias del XXVII congreso sociedad colombiana de entomología\_SOCOLEN. Medellín, Colombia. 306 p.
- Pardo-Locarno, L., Victoria, J. y Angel, D. (1999). Estudio de las chisas rizófagas (Coleoptera Melolonthidae) en tres municipios del departamento del Cauca, Colombia. En: Resúmenes XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá Julio 28, 29 y 30. p 40.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Pardo-Locarno, L. (1994). Escarabajos (Coleoptera: Melolonthidae) de importancia agrícola en Colombia. En: Memorias XXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín, Colombia. P. 159-176.
- Pena, E. y Slate, E. (2006). Global validation of linear model assumptions. *Journal of the American Statistical Association*. 101(473), 341-354. <https://doi.org/10.1198/016214505000000637>
- Peterson, P., Romaschenko, K. y Soreng, R. (2014). A laboratory guide for generating DNA barcodes in grasses: a case study of *Leptochloa* s.l. (Poaceae: Chloridoideae). *Journal of Plant Taxonomy and Geography*. 69(1), 1-12.
- Pinchao, E. y Muñoz, A. (2019). Mapping the Spatial Distribution of *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae): Factors Associated with the Aggregation of Damage. *Neotropical Entomology*. (48), 678-691.
- Pla, I. (1969). Metodología de laboratorio recomendada para el diagnóstico de Salinidad y alcalinidad en suelos, aguas y plantas. UCV-FAGRO. *Instituto de Edafología*. 117.
- Plant, R. (2001). Site-specific management: the application of information technology to crop production. *Computers and Electronics in Agriculture*. (30), 9-29.
- Pompanon, F., Deagle, B., Symondson, W., Brown, D., Jarman, S. y Taberlet, P. (2012). Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular ecology*. 21: 1931-1950.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. y Achaz, G. (2012). ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol*. (21), 1864-77.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rambaut, A., Drummond, A., Xie, D., Baele, G. y Suchard, M. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic biology*. (67), 10.1093/sysbio/syy032.
- Ramírez, N., Mejía, R. y Minera, M. (2007). Variación nictemeral de la calidad de agua en las lagunas de estabilización del municipio de La Ceja, Antioquia. *Revista facultad de Ingeniería*. 40: 22-40.
- Restrepo-Giraldo, H., Morón, M., Vallejo, F., Pardo-Lorcano, L. y López-Avila, A. (2003). Catálogo de Coleopteran Melolonthidae (Scarabaedae: Pleurosticti) de Colombia. *Folia entomológica Mexicana*. 42(2) 239-263.
- Ritcher, P. (1966). Subfamily Dynastinae. pp. 128-160. En: White grubs and their allies. *Oregon State University Press*, Corvallis, USA. 76 p.
- Rui, C., Li-Yun, J., Lin, L., Qing-Hua, L., Juan, W., Rui-Ling, Z., Xing-Yi, L., Yuan, W., Fu-Min, L. y Ge-Xia, Q. (2013). The gnd ene of Buchnera as a new, effective DNA barcode for aphid identification. *Syst Entomol*. (38), 615-625.
- Schowalter, T. (2016). Biogeography. *Insect ecology*. 4th Ed. Academic press. 211-245p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803033-2.00007-8>.
- Sciarretta A. y Trematerra, P. (2014). Geostatistical tools for the study of insect spatial distribution: practical implications in the integrated management of orchard and vineyard pests. *Plant Protect. Sci.* (50), 97–110.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Seastedt, T. y Crossley, D. (1981). Microarthropod response following cable logging and clear-cutting in the southern Appalachians. *Ecology*. 62(1), 126-135.
- Sierra, O. y Ramírez, J. (2000). Variación espacio-temporal de biopelículas en la represa La Fe, El Retiro, Antioquia (Colombia). *Actualidades biológicas*. 22(73), 153-168.
- Sípek, P. y Dirk, A. (2011). Inferring larval taxonomy and morphology in *Maladera* species (Coleoptera: Scarabaeidae: Sericini) using DNA taxonomy tools. *Syst Entomol*. (36), 628-643.
- Stork, N. (2009). Biodiversity. *Encyclopedia of Insects*. 2nd Ed. Academic Press. 75-80p.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00021-7>.
- Swamy, M., Ramasamy, A., Kalleshwaraswamy, M. y Adarsh, S. (2019). Arecanut white grubs *Leucopholis* species (Melolonthinae: Scarabaeidae: Coleoptera) morphological, molecular identification and phylogenetic analysis. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 3(22), 880-888.
- Talavera, G., Dincă, V. y Vila, R. (2013). Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods in ecology and evolution*. (4), 1101-1110.  
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12107>
- Taylor, L. (1961). Aggregation, variance and the mean. *Nature*. (189), 732 – 735.
- Taylor L. y Woiwod, I. (1982). Comparative synoptic dynamics I. Relationships between inter and intra-specific spatial and temporal variance/mean populations parameters. *Journal of Animal Ecology*. (51), 879-906.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Trifinopoulos T., Nguyen, N., von Haeseler, A. y Quang, B. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*. 44(w1): w232-235.
- Valentini, A., Pompanon, F. y Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*. 24(2), 110–117. doi:10.1016/j.tree.2008.09.011
- Vallejo, F. y Orduz, S. (1996). Contribución al conocimiento de las plagas subterráneas (Coleoptera: Scarabaeoidea, Melolonthidae) del Oriente Antioqueño. En: Resúmenes XXIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. 125 p.
- Valmorbida, I., Cherman, M., Perini, C., Cavallin, L. y Guedes, J. (2018). Population analysis of white grubs (Coleoptera: Melolonthidae) throughout the Brazilian Pampa biome. *Revista Brasileira De Entomologia*. 62(4), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2018.08.002>
- Vega, J. (2012). El aguacate en Colombia: Estudio de caso de los Montes de María, en el Caribe colombiano. *Centro de estudios económicos regionales*. Cartagena. 17. ISSN 16923715
- Vivas, L. y Notz, A. (2011). Distribución espacial en poblaciones de *Oebalus insularis* (Hemiptera: Pentatomidae) en el cultivo de arroz en Calabazo, estado Guárico, Venezuela. *Revista científica UDO Agrícola*. 11(1): 109-125.
- Wallman, J. y Donnellan, S. (2001). The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Southeastern Australia. *Forensic Sci Int*. (120), 60-67.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

- Walter, H. (1986). Water Content En: Klute A. (Ed). Methods of soil analysis. Physical and mineralogical methods. *American Society of Agronomy: Soil Science Society of America*. 493-541.
- Wang, H. Zhao, Y. y Wang, X. (2020). Diversity of carabid beetles (Coleoptera: Carabidae) under three grassland management regimes in northwestern China. *Pakistan journal of zoology*. 1-10pp.
- Whitworth, T.; Dawson, R.; Magalon, H. y Baudry, E. (2007). DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proc. R. Soc.* (274), 1731–1739.
- Zhang, H y Bu, W. (2022). Exploring Large-Scale Patterns of Genetic Variation in the COI Gene among Insecta: Implications for DNA Barcoding and Threshold-Based Species Delimitation Studies. *Insects*. (13), 425. <https://doi.org/10.3390/insects13050425>

## Apéndices

### Apéndice A. Línea base del área de estudio

La textura del suelo encontrada en las dos profundidades (0 a 5 cm y de 10 a 15 cm) fue predominantemente franco-limosa, con alto porcentaje de contenido de limo (superior al 70%), sin superar en ningún caso el 30% de contenido de arenas ni el 10% de arcillas (Tabla 4). La porosidad total en las unidades C y D fue en general aproximada al 70% en promedio; en el caso de la UPC B en promedio fue del 65% y presentó la porosidad total más baja (49%). La porosidad total no mostró diferencias significativas entre las unidades de estudio ( $p = 0.19$ ), entre las dos profundidades de muestreo ( $p = 0.25$ ) o la interacción entre estas ( $p = 0.64$ ). El porcentaje de microporos tampoco presentó diferencias significativas entre las unidades ( $p = 0.4$ ), las profundidades ( $p = 0.7$ ) y la interacción entre estas ( $p = 0.059$ ); cabe mencionar que el efecto de este último caso fue bajo ( $\eta^2=0.16$  CI [0.00, 0.30],  $\omega^2=0.10$  CI [0.00, 0.27]).

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

**TABLA 7.**

*Caracterización física y química de suelos*

LOCALIDAD		LA CEJA		EL RETIRO		SAN PEDRO	
UNIDAD PRODUCTIVA		B		C		D	
PROFUNDIDAD (cm)		0-5	10-15	0-5	10-15	0-5	10 15
TEXTURA (%)	Arena	18,8	20,0	23,8	25,0	18,8	17,5
	Limo	78,8	77,5	73,8	71,3	78,8	80,0
	Arcila	2,5	2,5	2,5	3,8	2,5	2,5
CLASE TEXTURAL (USDA)		F-L	F-L	F-L	F-L	F-L	L
POROSIDAD TOTAL (%)		67,31 ± 4,78	63,68 ± 9,53	69,21 ± 3,20	69,57 ± 2,26	71,83 ± 2,83	67,84 ± 9,99
MACROPOROS (%)		40,45 ± 1,69	26,48 ± 3,76	33,56 ± 2,50	30,37 ± 2,40	32,20 ± 1,14	38,07 ± 1,79
MICROPOROS (%)		59,54 ± 3,37	73,51 ± 12,26	66,43 ± 2,44	69,62 ± 1,32	67,79 ± 2,77	61,92 ± 9,78
DENSIDAD APARENTE (g cm <sup>-3</sup> )		0,43 ± 0,05	0,47 ± 0,07	0,38 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,47 ± 0,05	0,55 ± 0,07
PH (H <sub>2</sub> O)		5,25 ± 0,05	5,04 ± 0,09	4,80 ± 0,16	4,72 ± 0,07	4,57 ± 0,05	4,56 ± 0,02
CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (μS/CM)		172,16 ± 60,45	162,16 ± 13,29	106 ± 20,71	59,5 ± 5,58	136,33 ± 38,45	82,33 ± 19,69
K-SATURADO (cm H <sup>-1</sup> )		0,22 ± 0,10	0,21 ± 0,15	0,35 ± 0,10	0,34 ± 0,14	0,11 ± 0,10	0,30 ± 0,26
HUMEDAD (%)		87,94 ± 12,48	79,50 ± 15,86	99,67 ± 11,96	115,75 ± 12,26	75,32 ± 14,24	65,10 ± 6,93
CA (cmolc KG-1)		6,80 ± 2,69	4,90 ± 0,14	1,60 ± 0,71	0,60 ± 0,50	2,40 ± 0,99	1,04 ± 0,37
MG (cmolc KG-1)		2,10 ± 1,13	1,12 ± 0,40	0,55 ± 0,14	0,25 ± 0,12	0,78 ± 0,32	0,40 ± 0,10
K (cmolc KG-1)		0,98 ± 0,17	0,64 ± 0,05	0,40 ± 0,08	0,27 ± 0,01	0,51 ± 0,07	0,45 ± 0,07
NA (cmolc KG-1)		0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00
CICE		9,90 ± 3,96	6,65 ± 0,49	2,60 ± 0,71	1,65 ± 0,07	3,75 ± 1,34	1,95 ± 0,35
N (%)		1,21 ± 0,10	0,84 ± 0,33	1,02 ± 0,09	0,96 ± 0,02	1,09 ± 0,23	0,81 ± 0,10
MATERIA ORGANICA (%)		21,25 ± 1,34	14,25 ± 4,88	22,75 ± 0,21	19,70 ± 1,56	17,90 ± 3,25	17,10 ± 0,71

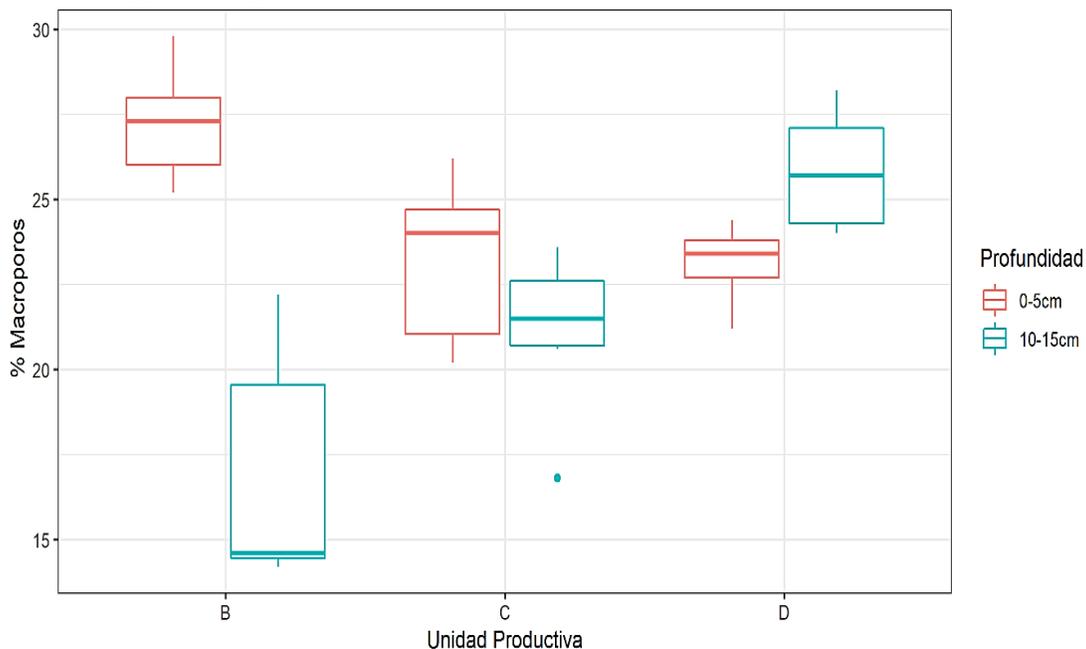
*Nota:* Caracterización general de algunas propiedades físicas y químicas de los suelos en dos rangos de profundidades para cada unidad productiva de estudio. F-L (Franco-Limoso).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

El porcentaje de macroporos presentó diferencias significativas (**Figura 18**) según las UPC ( $P= 0.028$ ), la profundidad ( $p = 0.0002$ ) y la interacción entre ambas ( $p = 7.26e^{-07}$ ). La diferencia entre unidades la presentaron B y D ( $p = 0.044$ ). Dentro de las unidades, solo las dos profundidades de la unidad B presentaron diferencias significativas ( $p = 2.5e^{-07}$ ). Entre las profundidades, de B:0-5cm fue significativamente distinta de C:10-15cm ( $p = 0.001$ ) y D:10-15cm fue diferente de C:10-15cm ( $p = 0.01$ ). La profundidad como mayor diferencia fue B:10-15cm respecto C:0-5cm ( $p = 0.0007$ ), D:0-5cm ( $p = 0.0009$ ), C:10-15cm ( $p = 0.04$ ) y D:10-15cm ( $p = 4.0e^{-06}$ ). El efecto de las unidades fue moderado ( $\eta^2=0.07$  CI [0.05, 0.44],  $\omega^2=0.14$  CI [0.00, 0.32]), el de la profundidad ( $\eta^2=0.16$  CI [0.46, 0.75],  $\omega^2=0.31$  CI [0.10, 0.50]) y de la interacción entre la profundidad y las unidades productivas ( $\eta^2=0.46$  CI [0.38, 0.71],  $\omega^2=0.56$  CI [0.33, 0.69]) fueron en ambos casos un efecto grande con un poder explicativo del 31% para la profundidad y del 56% para la interacción.

**FIGURA 18.**

*Porcentaje de macroporos*



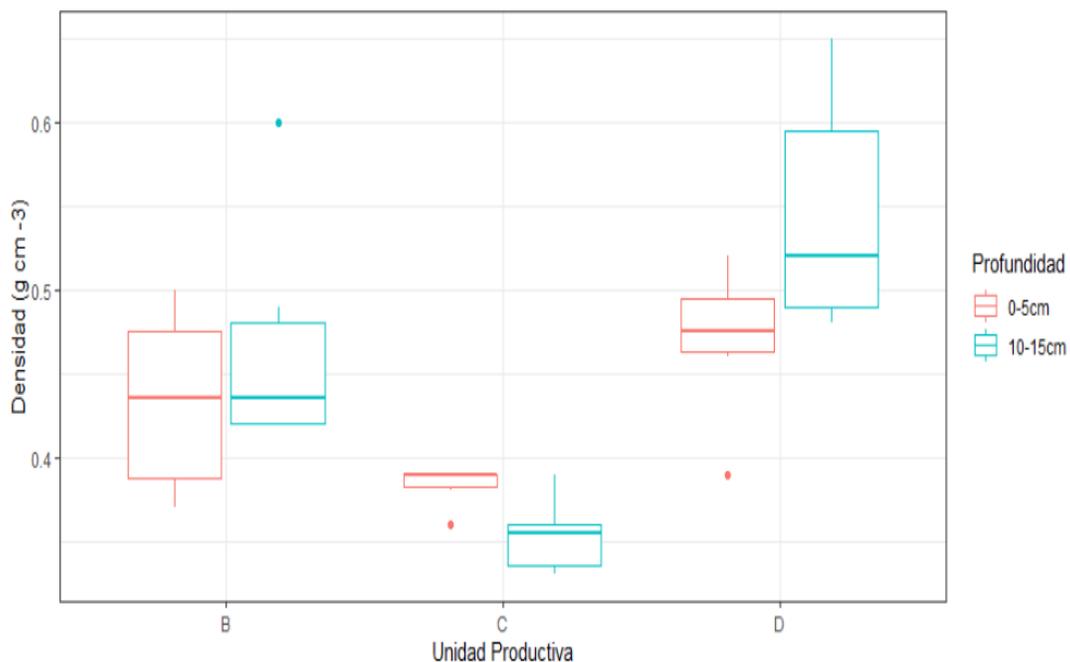
*Nota:* Diagrama de cajas y bigotes del porcentaje de macroporos del suelo a la profundidad de 0 a 5cm y de 10 a 15cm para cada una de las unidades productivas de aguacate.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

La densidad aparente osciló entre  $0.38-0.47 \text{ g cm}^{-3}$  y  $0.35-0.55 \text{ g cm}^{-3}$  en las profundidades 0-5 cm y 10-15 cm respectivamente; siendo la UPC C con el registro de la menor densidad y la UPC D la de mayor (Tabla 4). Al comparar la densidad entre las dos profundidades dentro de cada unidad, no se encontró diferenciación en la unidad B ( $p = 0.37$ ), pero sí se evidenció diferenciación en las unidades C ( $p = 0.01$ ) y D ( $p = 0.04$ ) (**Figura 19**). En las unidades B y D la densidad fue mayor en el rango de profundidad 10-15 cm, mientras que en la unidad C ocurrió lo contrario, la profundidad 0-5 cm registró mayor densidad respecto al rango 10-15 cm (**Tabla 7**).

### FIGURA 19

#### *Densidad aparente*



*Nota:* Diagrama de cajas y bigotes de la densidad aparente del suelo a la profundidad de 0 a 5 cm y de 10 a 15 cm para cada una de las unidades productivas de aguacate.

El pH en las unidades fue ácido (**Tabla 7**).

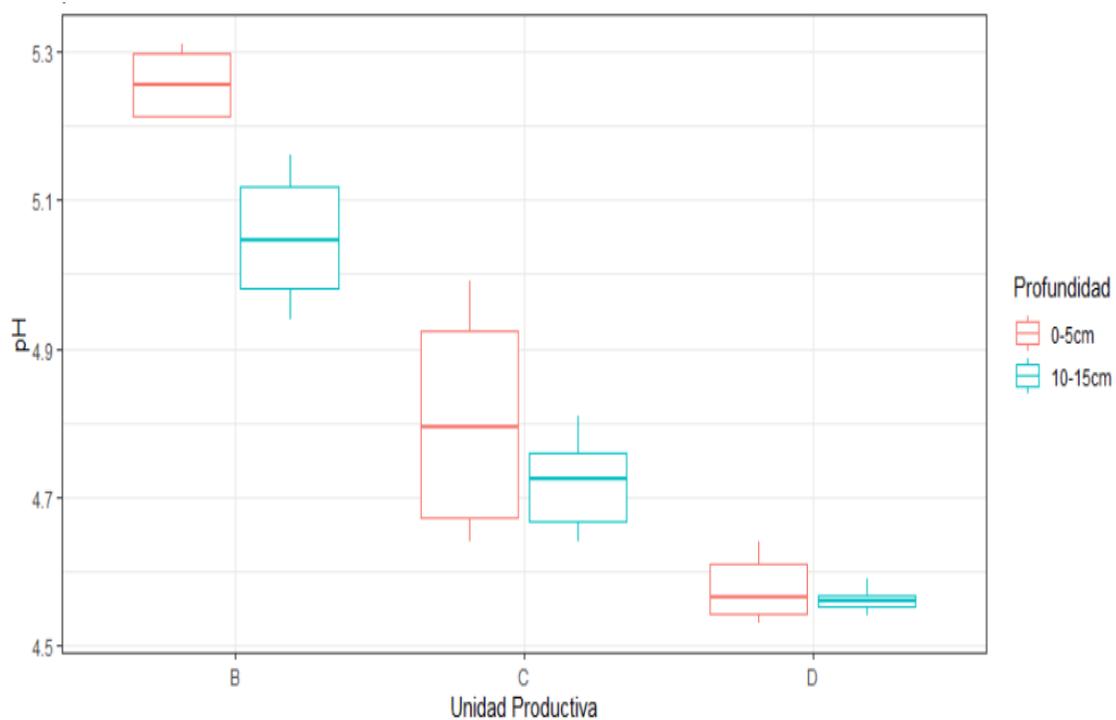
Caracterización física y química de *SUELOS*), siendo los terrenos de San Pedro de los Milagros los de mayor acidez ( $\square_{0-5 \text{ cm}} = 4.58 \text{ pH} \pm 0.02$ ;  $\square_{10-15 \text{ cm}} = 4.56 \text{ pH} \pm 0.01$ ) en ambas profundidades, seguido por el suelo en El Retiro ( $\square_{0-5 \text{ cm}} = 4.80 \text{ pH} \pm 0.06$ ;  $\square_{10-15 \text{ cm}} = 4.72 \text{ pH} \pm$

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

0.03) y por ultimo La Ceja ( $\square_{0-5 \text{ cm}} = 5.26 \text{ pH} \pm 0.02$ ;  $\square_{10-15 \text{ cm}} = 5.05 \text{ pH} \pm 0.04$ ); con lo cual, las unidades D y C pueden ser considerados como muy fuertemente ácido, y la unidad B como fuertemente ácido (USDA 1999). Se encontraron diferencias significativas (**Figura 20**) entre las unidades ( $p = 2e^{-16}$ ), la profundidad ( $p = 0.0008$ ) y la interacción entre unidad-profundidad ( $p = 0.024$ ). La principal diferenciación se dio entre las unidades B-C ( $p = 4.5e^{-16}$ ), B-D ( $p = 4.6e^{-16}$ ) y C-D ( $p = 9.9e^{-06}$ ). Solo la unidad B presentó diferencias en el pH entre sus profundidades ( $p = 0.0018$ ). El mayor efecto de las unidades fue muy grande ( $\eta^2=0.87$  CI [0.78, 0.91],  $\omega^2=0.89$  CI [0.83, 0.93]), seguido del efecto grande de la profundidad ( $\eta^2=0.38$  CI [0.16, 0.55],  $\omega^2=0.26$  CI [0.06, 0.46]) y un efecto moderado el ocasionado por la interacción entre la profundidad y las unidades productivas ( $\eta^2=0.22$  CI [0.02, 0.38],  $\omega^2=0.15$  CI [0.00, 0.33]).

**FIGURA 20**

*Potencial de hidrogeno (ph)*



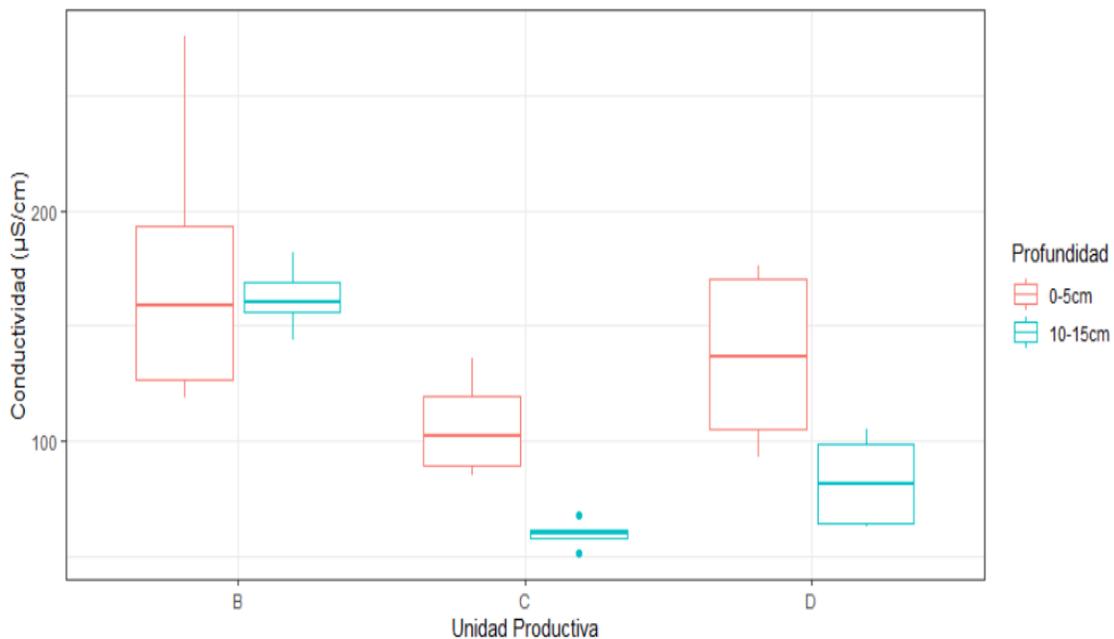
*Nota:* Diagrama de cajas y bigotes de pH en suelo a una profundidad de 0 a 5 cm y de 10 a 15 cm para cada una de las unidades productivas de aguacate.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

Los suelos no superaron conductividad eléctrica de 980  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , con lo cual, se pueden considerar como no salinos (USDA 1999). La unidad B presentó la mayor conductividad en ambas profundidades (0-5cm = 172.17  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; 10-15cm = 162.17  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), seguido del UPC D (0-5cm = 136.33  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; 10-15cm = 82.33  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), finalmente la unidad C presentó la menor conductividad en las dos profundidades (0-5cm = 106  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; 10-15cm = 59.5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Las unidades presentaron diferencias significativas (**Figura 21**) entre si ( $p = 1.4e^{06}$ ) y las profundidades ( $p = 0.001$ ). Las diferencias fueron entre las UPC B-C ( $1.2e^{-06}$ ) y B-D ( $p = 0.0003$ ). La profundidad B:0-5cm fue distinta respecto C:05cm ( $p = 0.01$ ), C:10-15cm ( $p = 1.5e^{-05}$ ) y D:10-15cm ( $p = 0.0004$ ); seguida por D:0-5cm respecto C:10-15cm ( $p = 0.003$ ) y B:10-15cm respecto D:10-15cm ( $p = 0.002$ ). El mayor efecto lo presentó las UPC ( $\eta^2=0.30$  CI [0.06, 0.46],  $\omega^2=0.54$  CI [0.31, 0.67]) y las profundidades ( $\eta^2=0.01$  CI [0.00, 0.13],  $\omega^2=0.23$  CI [0.05, 0.43]).

**FIGURA 21**

*Conductividad eléctrica*



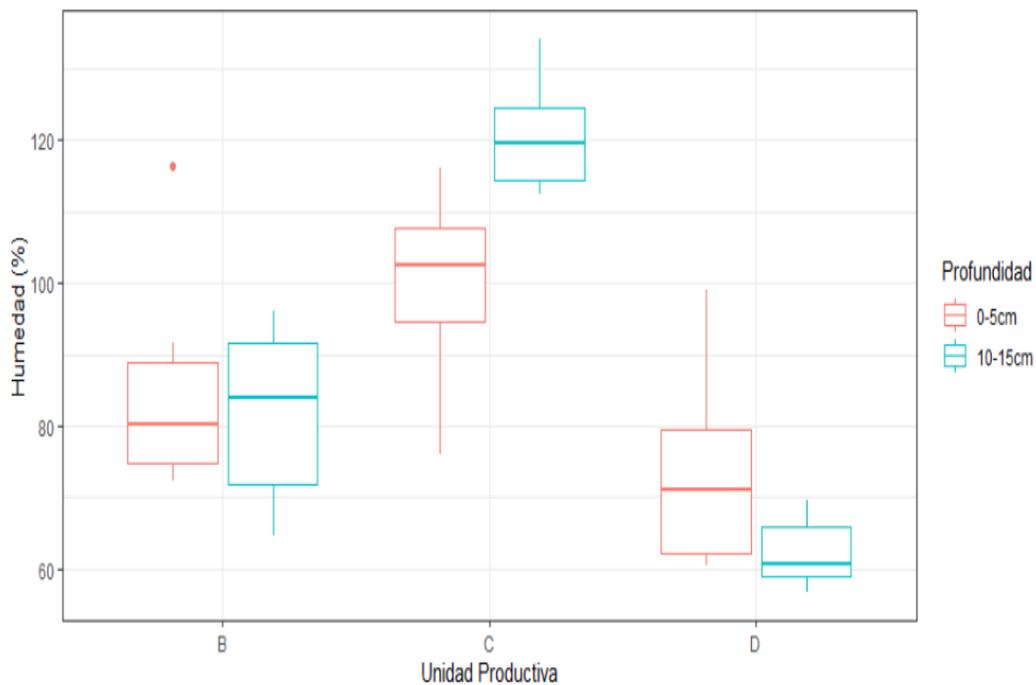
*Nota:* Diagrama de cajas y bigotes de conductividad eléctrica del suelo a una profundidad de 0 a 5cm y de 10 a 15cm para cada una de las unidades productivas de aguacate.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

En las 3 UPC los suelos presentaron altos porcentajes de humedad (**Tabla 7**) en un rango que va desde 65% en la profundidad 10-15cm en la unidad D, siendo está la menor, hasta 115% en la unidad C a la profundidad de 10-15cm. Estos altos porcentajes de humedad concuerdan con la gran proporción de limo y microporos en los suelos, esto reforzado por la baja densidad aparente reportada (Tabla 4) que contribuyen a una mayor capacidad de retención de agua por parte del suelo. El efecto de las unidades ( $p = 1.77e^{-08}$ ) y la interacción entre las unidades y la profundidad ( $p = 0.009$ ) presentaron diferencias significativas (**Figura 22**).

### FIGURA 22

#### *Contenido de humedad*



*Nota:* Diagrama de cajas y bigotes del contenido de humedad del suelo a la profundidad de 0 a 5cm y de 10 a 15cm para cada una de las unidades productivas de aguacate.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

Respecto la humedad, las unidades productivas fueron diferentes significativamente entre sí, B-C ( $p = 4.4e^{-05}$ ), B-D (0.013) y D-C ( $1.1e^{-08}$ ). La interacción entre UPC y profundidad fue significativamente distinta entre C:10-15cm con B:0-5cm ( $p = 0.0005$ ), C:0-5cm con D:0-5cm ( $p = 0.014$ ), C:0-5cm con D:10-15cm ( $p = 0.0002$ ), D:0-5cm con C:10-15cm ( $p = 5.8e^{-06}$ ), B:10-15cm con C:10-15cm ( $p = 0.0001$ ) y D:10-15cm con C:10-15cm ( $p = 8.2e^{-08}$ ). El mayor efecto fue por parte de las UPC ( $\eta^2=0.30$  CI [0.06, 0.45],  $\omega^2=0.65$  CI [0.46, 0.76]) seguido de la interacción UPC-Profundidad ( $\eta^2=0.27$  CI [0.04, 0.43],  $\omega^2=0.20$  CI [0.01, 0.38]).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

### Apéndice B. Físicas y químicas de los puntos de muestreo

La menor temperatura de suelo en los puntos de muestreos de larvas fue de 14.9° C y la máxima de 20.9° C, estas fueron registradas en la unidad D y B respectivamente. En promedio en la UPC con el suelo que registró la de mayor temperatura fue C en el municipio El Retiro con 18.2° C, mientras que el suelo más frío con la temperatura más baja fue en San Pedro de los Milagros (D) con 15.7° C. (**Tabla 8**). Todas las unidades productivas presentaron en promedio un porcentaje de humedad en suelo superior al 80%, indicando una alta capacidad de retención de agua, siendo D la de mayor humedad promedio con 106% y C la unidad con suelos menos húmedos con un promedio de 83%; el menor contenido de agua (43.4%) se registró igualmente en la UPC C y porcentaje de humedad más alto fue 158% en la unidad D (**Figura 24**). Los porcentajes de humedad encontrados son típicos de los suelos del Orden Andisol (Referencia) el cual es el orden predominante que se encuentra presente en las unidades productivas estudiadas exceptuando la UP de San Pedro.

Los suelos presentaron un pH entre los rangos catalogados como extremadamente a fuertemente ácidos oscilando entre 3.8 a 6.1, ambos registrados en San Pedro de Los Milagros, que en promedio con un pH de 4.4 presentó el suelo más ácido, mientras que las unidades B y C presentaron un pH promedio cercano a 5 (**Figura 25**). La conductividad eléctrica por su parte fue la condición del suelo con el mayor rango y variación debido principalmente al valor máximo de 1421 ( $\mu\text{S}/\text{Cm}$ ) registrado en la unidad D, este valor no es limitante para el desarrollo del cultivo, en comparación con las otras unidades también fue la de mayor conductividad promedio con 535.4  $\mu\text{S}/\text{Cm}$ . En la UPC C se obtuvo la menor conductividad con 38.67  $\mu\text{S}/\text{Cm}$  (**Figura 26**). Excepto el valor máximo registrado, los suelos al no superar los 980  $\mu\text{S}/\text{cm}$  se consideran suelos no salinos (USDA 1999).

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

**TABLA 8.**

*TEMPERATURA, HUMEDAD, POTENCIAL DE HIDROGENO (PH) Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DEL SUELO DE LAS UNIDAD PRODUCTIVA. MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR*

	UNIDAD PRODUCTIVA		
	B	C	D
<b>TEMPERATURA (°C)</b>	17,69 ± 0,94	18,23 ± 0,96	15,76 ± 1,08
<b>% HUMEDAD</b>	92,81 ± 18,12	83,14 ± 17,46	106,66 ± 17,08
<b>PH</b>	4,99 ± 0,28	5 ± 0,45	4,4 ± 0,56
<b>COND. ELÉCTRICA (μS/CM)</b>	247,57 ± 44,46	70,11 ± 25,71	535,41 ± 37,33
<b>% ARENA</b>	30,77 ± 6,43	37,88 ± 5,37	48,75 ± 6,43
<b>% LIMO</b>	62,06 ± 7,41	52,88 ± 6,84	35,93 ± 8,62
<b>% ARCILLA</b>	7,15 ± 2,38	9,23 ± 2,9	15,31 ± 2,79
<b>TEXTURA</b>	Franco-Limoso	Franco-Limoso	Limoso

Los suelos en las unidades de muestreo presentaron una textura media, la cual, de acuerdo con los porcentajes de arena, limo y arcilla las unidades B y C compartieron la clase textural Franco Limoso, la cual fue la predominante en la mayoría de las muestras, en tanto que la UPC D presentó suelos Limosos (USDA 1999). El menor contenido de arena se registró en B con un 15% y el mayor fue en D con 62%, igualmente estas unidades presentaron en promedio el menor (30.7%) y mayor (48.75%) contenido de arenas respectivamente. Este comportamiento se invierte respecto los contenidos de limo (62%) y arcilla (7.15%) en los que en promedio B presentó las mayores concentraciones de estas partículas y la UPC D las menores con 35.9% de limo y 15.3% de arcilla.

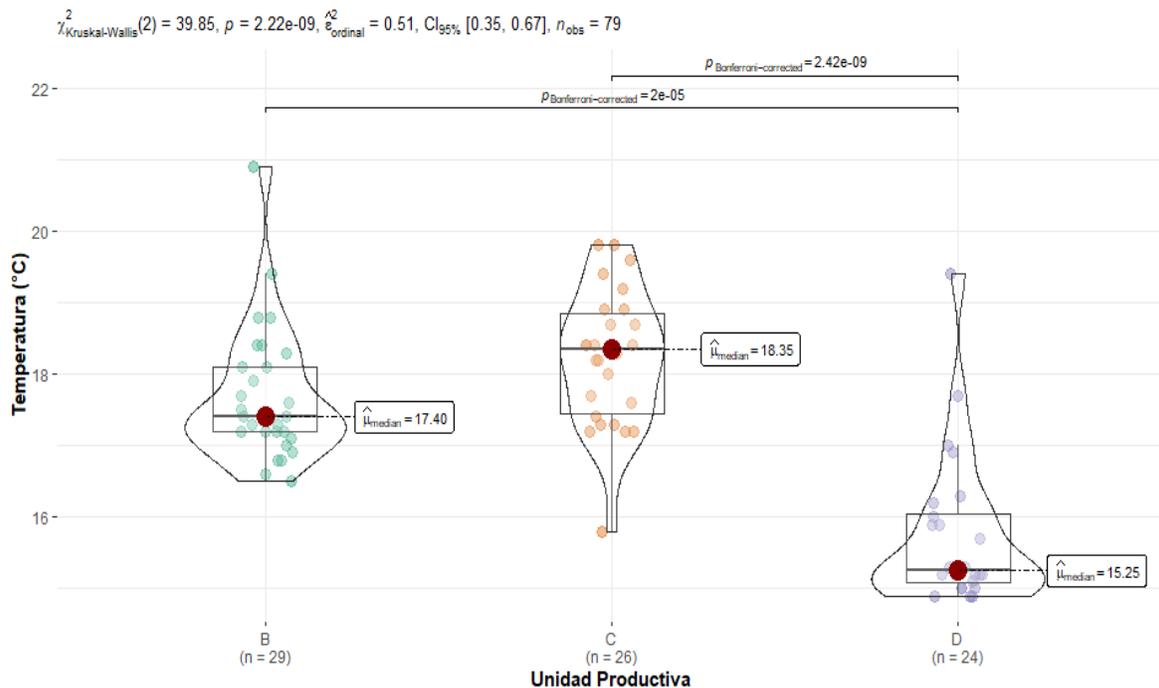
La violación de los supuestos de estadística global ( $P= 1.38e^{-07}$ ), skewness ( $P= 3.04e^{-05}$ ) y Kurtosis ( $P= 1.13e^{-05}$ ) en los residuales del modelo lineal de prueba en el que se explora la existencia de diferencias en el comportamiento de la temperatura del suelo entre las unidades productivas, imposibilita el uso de pruebas estadísticas de comparación paramétricas (ANOVA). Seguidamente se procedió a la comparación mediante su equivalente no paramétrico (Kruskal-Wallis) en el cual, se identifica que al menos la temperatura de una de las unidades es significativamente diferente respecto las demás ( $X^2_{K-W} = 39.8$ ; p-valor =  $2.22e^{-09}$ ). El tamaño del

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

efecto producido por las unidades productivas sobre la temperatura es grande de acuerdo con el cálculo de eta cuadrado ( $\eta^2 = 0.49$ ) y épsilon cuadrada ( $\varepsilon^2 = 0.51$ ), explicando aproximadamente el 50% de la variación. La prueba post hoc indica que la UPC D presentó temperatura significativamente diferente respecto B (p-valor =  $2e^{-05}$ ) y C (p-valor =  $2.4e^{09}$ ) (**Figura 23**).

**FIGURA 23**

*Varianza de temperatura*



*Nota:* Análisis de varianza (Kruskal-Wallis). Comparación de la temperatura de suelo entre las unidades productivas. Mediana (*punto rojo*), Significancia (*corchete superior*).

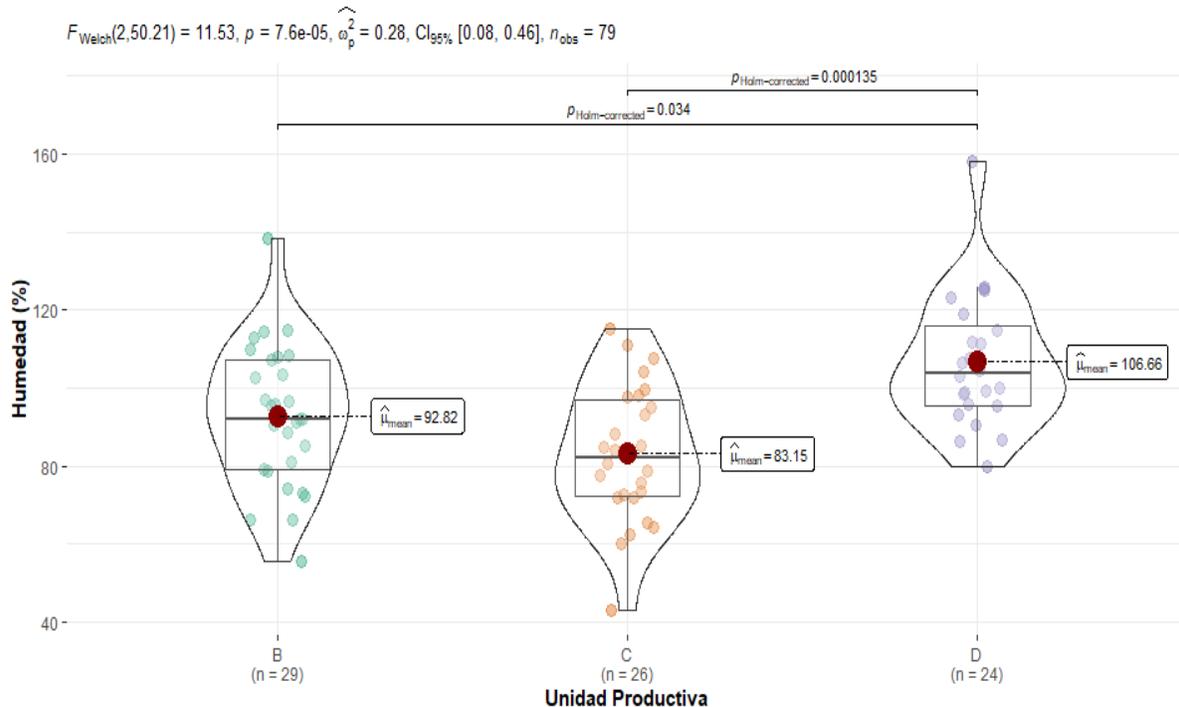
La prueba de los supuestos estadística global ( $P = 0.55$ ), oblicuidad ( $P = 0.25$ ), curtosis ( $P = 0.65$ ), función de enlace ( $P = 1.00$ ) y heterocedasticidad ( $P = 0.21$ ) fueron cumplidos. El análisis comparativo de medias (ANOVA) indica que hay diferencias significativas ( $F = 11.22$ ;  $P = 5.37e^{-05}$ ) entre la humedad de las unidades productivas. Con un intervalo de confianza del 95% la prueba de comparación múltiple Tukey mediante el método HSD (Honestly significant difference) señala

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

diferencias significativas de la UPC D (**Figura 24**) frente la unidad B ( $P= 0.01$ ) y C ( $P= 3.1e^{-05}$ ), con un efecto moderado ( $\eta^2 = 0.22$ ;  $\omega^2 = 0.21$ ) en el que las unidades productivas explican cerca del 21% de la variación de la humedad en el suelo.

### FIGURA 24.

#### Varianza de humedad

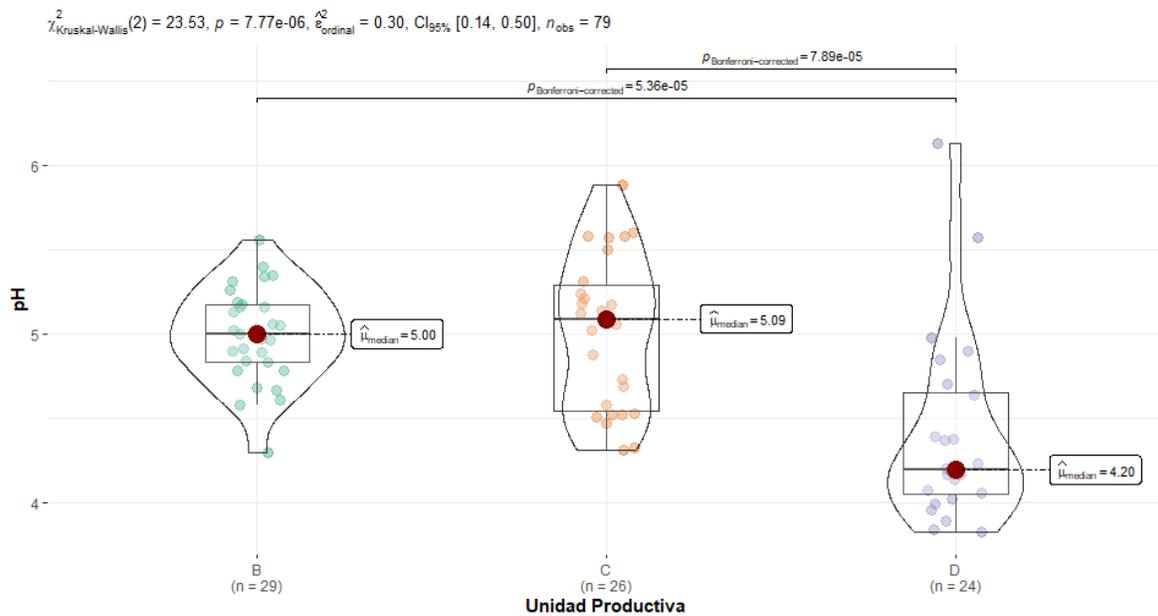


*Nota:* Análisis de varianza (ANOVA). Comparación de humedad de suelo entre las unidades productivas. Media (*punto rojo*), Significancia (*corchete superior*).

El pH en el suelo viola los supuestos de estadística global ( $P= 6.83e^{-06}$ ), curtosis ( $P= 1.411e^{-04}$ ) y oblicuidad ( $P= 2.41e^{-04}$ ). Al comparar el pH de las unidades se encontraron diferencias significativas ( $X^2_{K-W} = 23.53$ ;  $P= 7.7e^{-06}$ ) en al menos una de las UPC (**Figura 25**), siendo D distinta de B ( $P= 5.3e^{-05}$ ) y C ( $P= 7.8e^{-05}$ ). El efecto de las unidades es grande ( $\eta^2 = 0.28$ ;  $\varepsilon^2 = 0.30$ ) y explica aproximadamente el 30% de la variación presente en el pH (**Figura 25**).

**FIGURA 25**

*Varianza potencial de hidrógeno (ph)*

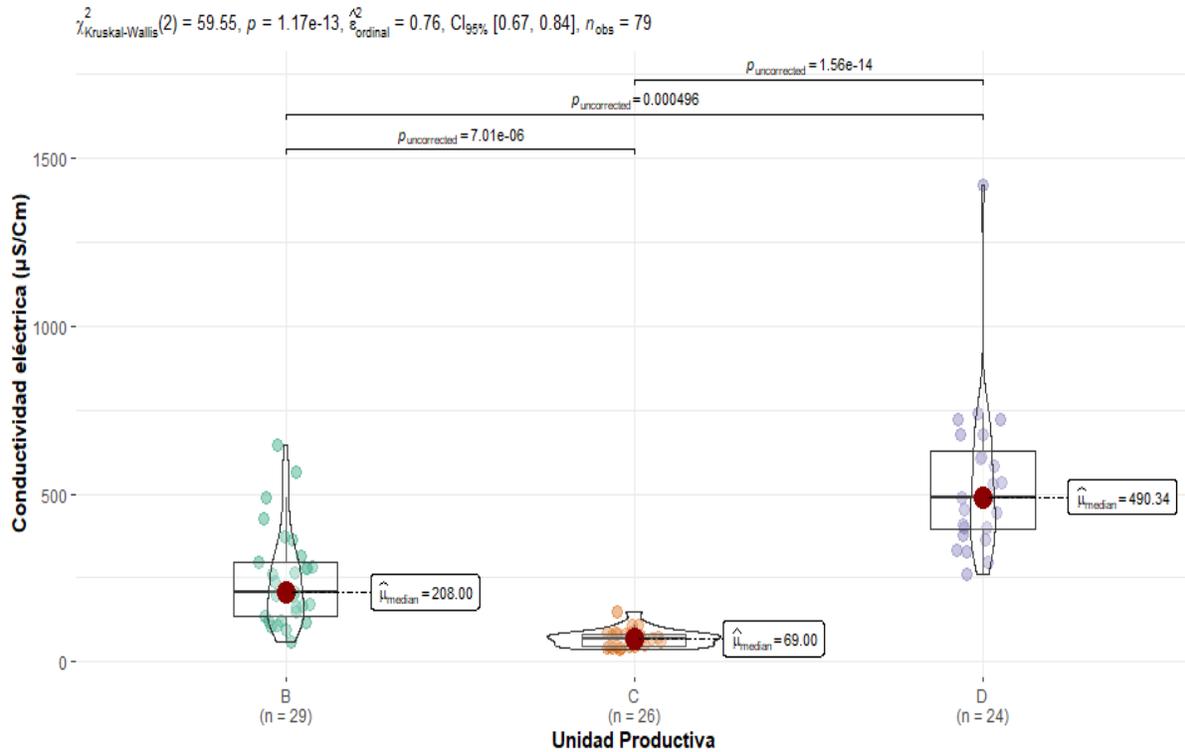


*Nota:* Análisis de varianza (Kruskal-Wallis). Comparación de pH de suelo entre las unidades productivas. Mediana (*punto rojo*), Significancia (*corchete superior*).

Los supuestos de estadística global ( $p$ -valor  $< 0.001$ ), oblicuidad ( $p$ -valor  $< 0.001$ ), curtosis ( $p$ -valor  $< 0.001$ ) y heterocedasticidad ( $P = 0.008$ ) no se cumplen satisfactoriamente. El análisis Kruskal-Wallis indica diferencias entre las UPC ( $X^2_{K-W} = 59.54; P = 1.17e^{-13}$ ). Esta diferenciación obedece principalmente a la alta conductividad en San Pedro de Los Milagros y la baja conductividad en la unidad C de El Retiro, siendo esta última significativamente diferente de B ( $P = 7.01e^{-06}$ ) y D ( $P = 1.56e^{-14}$ ). Las unidades productivas B y D también presentaron diferenciación significativa ( $P = 4.96e^{-04}$ ). Las UPC (**Figura 26**) explicaron cerca del 75% de la variabilidad de la conductividad eléctrica, presentando un efecto grande ( $\eta^2 = 0.75; \varepsilon^2 = 0.76$ ).

**FIGURA 26**

*Varianza conductividad eléctrica*

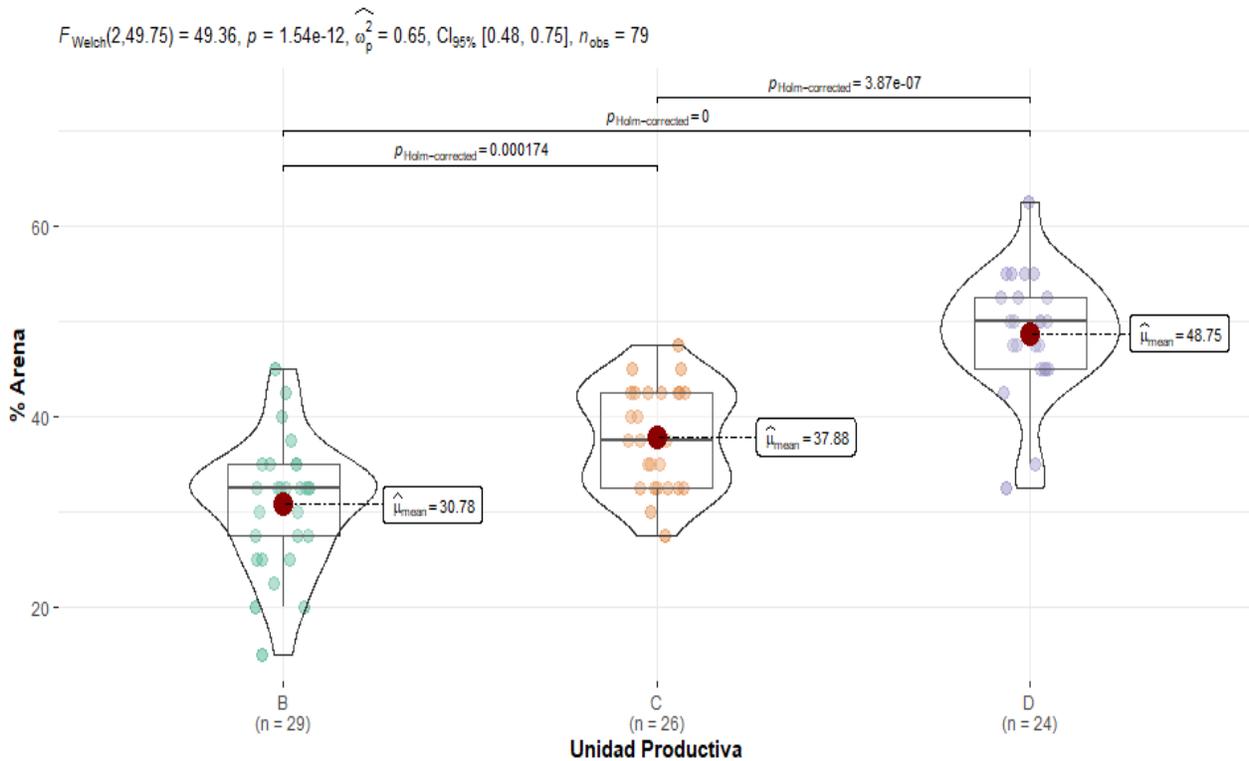


*Nota:* Análisis de varianza (Kruskal-Wallis). Comparación de la conductividad eléctrica del suelo. Mediana (*punto rojo*), Significancia (*corchete superior*).

El análisis de varianza indica diferenciación significativa en el contenido de arena entre las unidades ( $F = 55.41; P = 1.44e^{-15}$ ). Con un intervalo de confianza del 95% la prueba de comparación múltiple Tukey HSD señala diferencias significativas de la UPC C (**Figura 27**) frente la unidad B ( $P = 1.8e^{-04}$ ) y D ( $P = 8.4e^{-08}$ ), también diferenciación entre las unidades D y B ( $p\text{-valor} < 2e^{-16}$ ). Los valores  $\eta^2$  ( $\eta^2 = 0.59$ ) y  $\omega^2$  ( $\omega^2 = 0.58$ ) indican un efecto en las unidades sobre el contenido de arena en el suelo, explicando alrededor del 58% de la variación de los porcentajes.

**FIGURA 27**

*Varianza contenido de arenas*



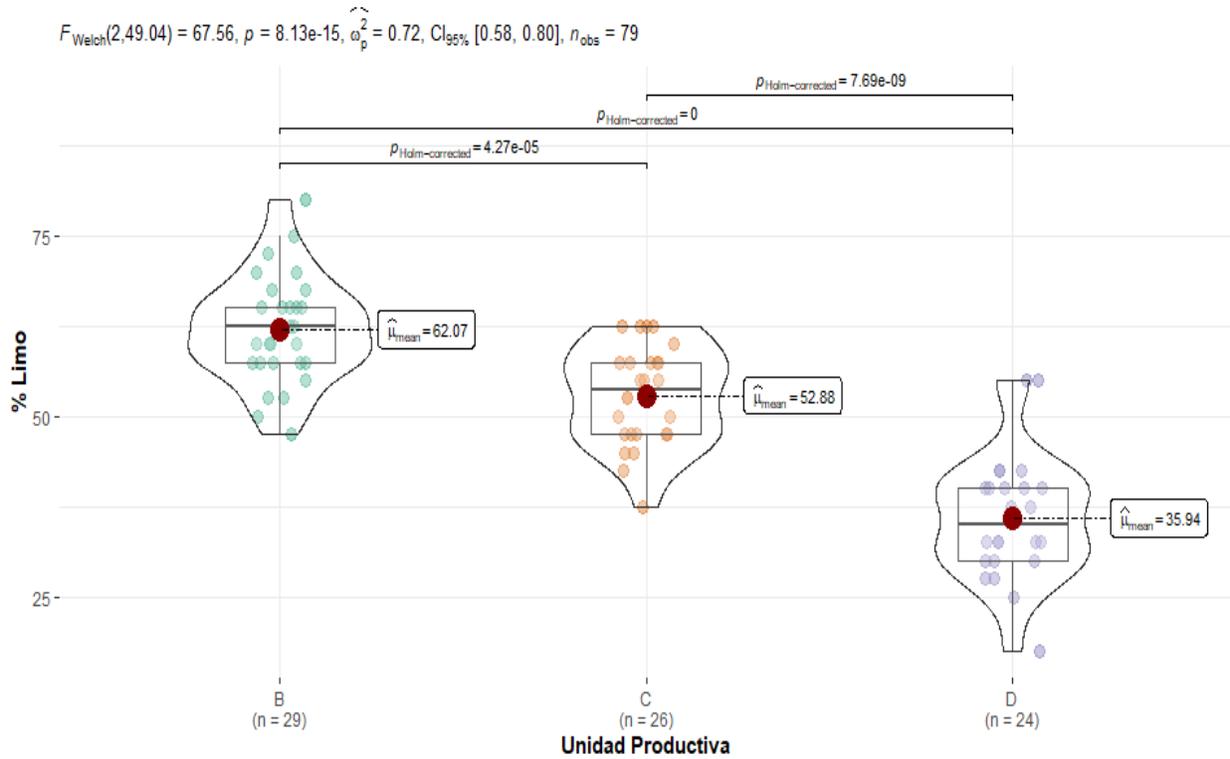
*Nota:* Análisis de varianza (ANOVA). Comparación del contenido de arena en suelo entre las unidades productivas. Media (*punto rojo*), Significancia (*corchete superior*).

La prueba de varianza de medias ( $F = 78.15$ ;  $p\text{-valor} < 2e^{-16}$ ) indica diferenciación significativa entre las unidades productivas respecto a sus contenidos de limo en suelo (**Figura 28**). La comparación múltiple (Tukey HSD) entre las unidades señala diferenciación de la UPC B con C ( $P = 8.2e^{-05}$ ) y D ( $p\text{-valor} < 2e^{-16}$ ), como también entre D y C ( $p\text{-valor} < 2e^{-16}$ ). La magnitud del efecto fue grande ( $\eta^2 = 0.67$ ;  $\omega^2 = 0.66$ ) explicando al menos el 66% de la variación del contenido de limo en suelos según las unidades de producción.

## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

**FIGURA 28.**

*Varianza contenido de limo*



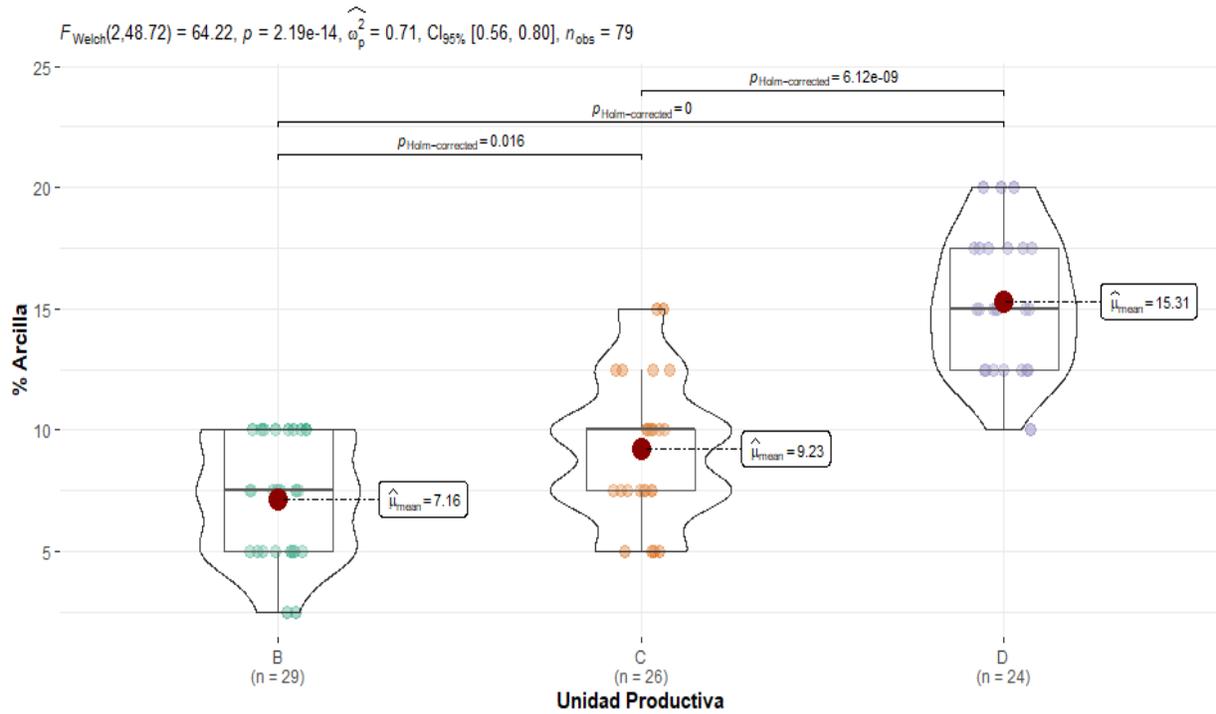
*Nota:* Análisis de varianza (ANOVA). Comparación del contenido de limo en suelo entre las unidades productivas. Media (*punto rojo*), Significancia (*corchete superior*).

La varianza del contenido de arcilla en el suelo de las UPC presentó diferencias significativas ( $F = 63.81$ ;  $p\text{-valor} < 2e^{-16}$ ); entre las unidades la diferenciación de arcilla en el suelo, siendo D distinta de C ( $p\text{-valor} < 2e^{-16}$ ) y B ( $p\text{-valor} < 2e^{-16}$ ), y B distinta de C ( $P = 0.01$ ). El efecto de las unidades es grande ( $\eta^2 = 0.62$ ;  $\omega^2 = 0.61$ ), explicando por lo menos el 61% del contenido de arcilla en las muestras de suelo (**Figura 29**).

# IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LARVAS

**FIGURA 29.**

*Varianza contenido de arcilla*



*Nota:* Análisis de varianza (ANOVA). Comparación del contenido de arcilla en suelo entre las unidades productivas. Media (*punto rojo*), Significancia (*corchete superior*).