

Tesis Doctoral

Desarrollo de la técnica del insecto estéril y su integración con el control biológico mediante entomófagos parasitoides para el control de la pollila del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

Cagnotti, Cynthia Lorena

2014-12-17

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cagnotti, Cynthia Lorena. (2014-12-17). Desarrollo de la técnica del insecto estéril y su integración con el control biológico mediante entomófagos parasitoides para el control de la pollila del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Cagnotti, Cynthia Lorena. "Desarrollo de la técnica del insecto estéril y su integración con el control biológico mediante entomófagos parasitoides para el control de la pollila del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-12-17.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Desarrollo de la técnica del insecto estéril y su integración con el control biológico mediante entomófagos parasitoides para el control de la pollila del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Cynthia Lorena Cagnotti

Director de tesis: Dr. Eduardo N. Botto

Consejero de estudios: Dra. Graciela Cohen

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Lucha Biológica, Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CICVyA INTA Castelar.

Fecha de defensa: 17 de Diciembre de 2014

ÍNDICE

Resumen	05
Abstract	06
Agradecimientos	08
Capítulo I. Introducción general	10
1.1. La plaga, <i>Tuta absoluta</i>	13
1.2. Genética y Esterilidad Heredada en el orden Lepidoptera	24
1.3. Integración de la Esterilidad Heredada con el Control Biológico de plagas	33
1.4. Hipótesis	34
1.5. Objetivos	35
1.6. Finalidad del trabajo	36
Capítulo II. Esterilidad Heredada en <i>Tuta absoluta</i>	37
2.1. Introducción	38
2.2. Materiales y métodos	40
2.2.1. Cría y manejo del material biológico	40
2.2.2. Aparato de rayos X	42
2.2.3. Evaluación del efecto de los rayos X sobre la emergencia de los adultos	43
2.2.4. Evaluación del efecto de los rayos X sobre machos irradiados y Esterilidad Heredada (EH)	45
2.2.5. Evaluación del efecto de los rayos X sobre hembras irradiadas	50
2.3. Resultados	51
2.3.1. Evaluación del efecto de los rayos X sobre la emergencia de los adultos	51
2.3.2. Evaluación del efecto de los rayos X sobre machos irradiados y Esterilidad Heredada (EH)	54
2.3.3. Evaluación del efecto de los rayos X sobre hembras irradiadas	61
2.4. Discusión	63
2.4.1. Evaluación del efecto de los rayos X sobre la emergencia de los adultos	63

2.4.2. Evaluación del efecto de los rayos X sobre machos irradiados	64
2.4.3. Evaluación del efecto de los rayos X sobre hembras irradiadas	68
2.5. Conclusión	68
Capítulo III. Supresión de poblaciones silvestres de <i>Tuta absoluta</i> mediante el uso de la Esterilidad Heredada	70
3.1. Introducción	71
3.2. Materiales y métodos	73
3.2.1. Aparato de rayos X	73
3.2.2. Evaluación del efecto de la radiación sobre la capacidad de dispersión de los machos de <i>T. absoluta</i>	73
3.2.3. Evaluación de la supresión de la población plaga por polillas irradiadas y su progenie	75
3.3. Resultados	77
3.3.1. Evaluación del efecto de la radiación sobre la capacidad de dispersión de los machos de <i>T. absoluta</i>	78
3.3.2. Evaluación de la supresión de la población plaga por polillas irradiadas y su progenie	78
3.4. Discusión	83
3.5. Conclusión	86
Capítulo IV. Integración de la Esterilidad Heredada con el uso de <i>Trichograma</i> spp. para controlar <i>Tuta absoluta</i>	87
4.1. Introducción	88
4.2. Materiales y métodos	89
4.2.1. Colonias de insectos	89
4.2.2. Aparato de rayos X	90
4.2.3. Experimentos de no elección	91
4.2.4. Experimentos de elección	96
4.3. Resultados	97
4.3.1. Experimentos de no elección	97
4.3.2. Experimentos de elección	100
4.4. Discusion	101
4.5. Conclusión	106
Capítulo V. Integración de la Esterilidad Heredada con un	

predador para controlar <i>Tuta absoluta</i>	107
5.1. Introducción	108
5.2. Materiales y métodos	110
5.2.1. Colonias de insectos	110
5.2.2. Aparato de rayos X	110
5.2.3. Estudios con <i>T. cucurbitaceus</i>	111
5.2.3.1. Experimento de no elección	111
5.2.3.2. Experimento de elección	113
5.3. Resultados	114
5.3.1. Estudios con <i>T. cucurbitaceus</i>	114
5.3.1.1. Experimento de no elección	114
5.3.1.2. Experimento de elección	115
5.4. Discusión	117
5.5. Conclusión	119
CONSIDERACIONES GENERALES Y CONCLUSIONES	120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
APÉNDICE: publicación de los datos presentados en el capítulo II en una revista internacional	150

Desarrollo de la técnica del insecto estéril y su integración con el control biológico mediante entomófagos parasitoides para el control de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

RESUMEN

La polilla del tomate, *Tuta absoluta*, es una de las plagas más devastadoras del cultivo de tomate en Sudamérica, donde es originaria, y en Europa y África, donde ha ingresado recientemente. El control de *T. absoluta* se basa principalmente en el empleo de plaguicidas. El objetivo de esta tesis fue establecer las bases para el desarrollo de la Técnica del Insecto Estéril, mediante el empleo de la Esterilidad Heredada (EH) en *T. absoluta*, y evaluar su integración con el Control Biológico (CB) con entomófagos.

Los principales aportes de esta tesis son:

- ✓ Conocimiento del efecto de los rayos X sobre la biología de *T. absoluta*.
- ✓ Determinación de la dosis óptima de radiación X para aplicar la EH en el control de *T. absoluta*.
- ✓ Estudio del efecto de la radiación sobre la dispersión de machos irradiados.
- ✓ Evaluación de la supresión de poblaciones silvestres de *T. absoluta* mediante la liberación de individuos irradiados en invernáculo.
- ✓ Determinación del número mínimo de individuos irradiados a liberar para reducir poblaciones de *T. absoluta*.
- ✓ Evaluación de la integración de la EH y el CB mediante el empleo de los entomófagos *Trichogramma* spp. y *Tupiocoris cucurbitaceus*.

Palabras clave: *Tuta absoluta*, Técnica del Insecto Estéril, Esterilidad Heredada, Control Biológico, *Trichogramma nerudai*, *Trichogramma pretiosum*.

Development of the sterile Insect technique and its integration with biological control with entomophagous parasitoids for the control of the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

ABSTRACT

The tomato leafminer, *Tuta absoluta*, is one of the most devastating pests of tomato crops. This species is native to South America, but it has been invading Europe, Africa and Asia recently. The main method of control of *T. absoluta* relies on the application of chemical insecticides. The objective of the thesis was to establish the basis for the development of the Sterile Insect Technique in this species through the Inherited Sterility (IS), and to evaluate its integration with Biological Control (BC) by entomophagous.

The main contributions of this thesis are:

- ✓ Knowledge of the effect of X rays on the *T. absoluta* biology.
- ✓ Determination of the optimal dose of X radiation to be used in the IS against *T. absoluta*
- ✓ Study of the effect of the radiation on the dispersion of irradiated males
- ✓ Assessment of the suppression of wild populations of *T. absoluta* through the release of irradiated individuals under greenhouse conditions.
- ✓ Determination of the minimum number of irradiated individuals that should be released to reduce wild *T. absoluta* populations
- ✓ Evaluation of the integration of both IS and BC techniques using the entomophagous *Trichogramma* spp. and *Tupiocoris cucurbitaceus*

Key words: *Tuta absoluta*, Sterile Insect Technique, Inherited Sterility, Biological Control, *Trichogramma nerudai*, *Trichogramma pretiosum*.

**Esta tesis está dedicada a mi hermoso hijo Bruno
quien ilumina mi vida**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvia López, quien fue mi directora de tesis aunque no se pueda dejar constancia de ello en los papeles, por brindarme la posibilidad de ingresar al laboratorio, por trabajar siempre conmigo codo a codo y dirigirme en todas mis actividades de investigación. Gracias por todo el tiempo que me has dedicado, por estar presente cada vez que he necesitado ayuda y por leer mi tesis con tanta dedicación. Estoy muy orgullosa de haber tenido tan excelente profesional como directora pero sobre todas las cosas tan buena persona.

Al Dr. Eduardo Botto por aceptar ser mi director de tesis, por brindarme su ayuda cada vez que lo he necesitado y por leer la tesis con entusiasmo haciéndole aportes muy valiosos.

A la Dra. Mariana Viscarret (por hacerme reír), la Dra. Andrea Andorno y la Lic. Carmen Hernández, a todas gracias por tanta ayuda con los ensayos y por poder contar siempre con ustedes.

A Diana Arias por ayudarme en los ensayos y a todos mis compañeros del I.I.L.B.

Al Dr. Diego Segura y la Dra. Alicia Martínez por realizar las irradiaciones del material de estudio de la tesis.

A Leonela Carabajal por sus valiosas correcciones a la sección Genética del orden Lepidóptera.

A la ANPCyT, el CONICET, al INTA y la IAEA por financiar económicamente el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Daniela Tosto por otorgarme una beca que me permitió continuar en el I.I.L.B. y escribir la tesis.

A aquellas personas que no están directamente relacionadas con el trabajo de la tesis pero que son muy importantes en mi vida y de alguna manera u otra han tenido alguna vinculación con la realización de la misma.

A mi mamá y mi papá, a quienes quiero con todo mi corazón por ser tan maravillosos y por incentivarme siempre a crecer profesionalmente.

A Ariel, el amor de mi vida, por acompañarme con amor incondicional durante todo el proceso de la tesis. Gracias por ayudarme siempre!! Por acompañarme los fines de semana al laboratorio y por cuidar a Bruno días enteros para que yo pueda escribir la tesis. Perdón por robarles tanto tiempo para trabajar.

A mi hermano Ariel, a Vir y a mis hermosos sobrinitos, Santi y Sofi por estar siempre presentes.

A mi tan especial y adorable abuela Matilde, quien ahora vive y vivirá para siempre en mi corazón.

A mis suegros Omar y Gladys, y a Vale por estar siempre presentes y ayudarnos en todo.

A mis mejores amigos Paula Dorado, Cecilia Daniel, Luciana Pizzorno, Adriana Burgueño, Virginia González Polo y Diego Rivas.

Capítulo I

Introducción general

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza más cultivada en invernadero en la Argentina (Fernández Lozano 2006). Si bien el cultivo de tomate bajo cubierta se desarrolla en todo el país (excepto en la provincia de Santa Cruz), existe una fuerte concentración de esta actividad en las provincias de Corrientes y Buenos Aires (Rothman y Tonelli 2010). En cuanto a la producción de tomate a campo, Mendoza es la principal provincia productora, le siguen en orden de importancia, las provincias de Salta, Jujuy, Río Negro, San Juan y Buenos Aires (Rothman y Tonelli 2010).

Las plagas¹ constituyen uno de los factores limitantes de la producción de tomate, tanto bajo cubierta como a campo. Así, *Tuta absoluta* (Meyrick) es la plaga clave de este cultivo en gran parte de la zona productiva de nuestro país, por lo que ha sido declarada “Plaga Nacional de la Agricultura” (disposición N°285/69 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). *T. absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) es un insecto de distribución Neotropical (Centro y Sudamérica). Comúnmente conocida como la polilla del tomate, es considerada una de las plagas más devastadoras del cultivo de tomate en esas regiones (Barrientos *et al.* 1998, Miranda *et al.* 1998, Desneux *et al.* 2010). *T. absoluta* ataca al cultivo desde la etapa de almácigo hasta la cosecha. La larva es la que produce el daño directo sobre las plantas, ya que se alimenta del mesófilo foliar, barrenos brotes o perfora frutos. Esto genera pérdidas en calidad y rendimiento del cultivo, y como consecuencia enormes pérdidas económicas a los productores.

El principal método de control de la polilla del tomate consiste en el uso de plaguicidas (Desneux *et al.* 2010, Haddi *et al.* 2012). Ante la presencia de elevadas infestaciones, los productores han intensificado el uso de productos químicos, aumentando las dosis y el número de aplicaciones recomendadas (García y Espul 1982). El uso intensivo de plaguicidas ha generado la aparición de poblaciones de *T. absoluta* resistentes a varios principios activos de productos recomendados tanto en la Argentina (Lietti *et al.* 2005), como en

¹ DEFINICIÓN DE PLAGA: Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales (FAO 1995).

Brasil (Siqueira *et al.* 2000) y Chile (Salazar y Araya 1997). Además, el empleo de plaguicidas afecta negativamente a las poblaciones de insectos benéficos (parasitoides y predadores) a través de efectos letales y subletales (Croft 1990, Desneux *et al.* 2007).

Dada las actuales exigencias de los mercados locales y regionales de una producción con bajo nivel de contaminantes, es necesario encontrar alternativas de control para la polilla que se enmarquen dentro del desarrollo de una agricultura sustentable, sin generar impactos negativos sobre el ambiente. El uso de genotipos de plantas de tomate resistentes a la polilla y el trampeo masivo mediante el empleo de trampas de feromona han sido métodos alternativos utilizados para reemplazar el control químico (Castro Antonio *et al.* 2011, Oliveira *et al.* 2009, 2012, de Oliveira *et al.* 2008, Desneux *et al.* 2010). Otro de los métodos de bajo impacto ambiental que ha sido usado contra *T. absoluta*, es el Control Biológico (CB). Esta es una táctica que utiliza a los enemigos naturales de la plaga (entomopatógenos, parasitoides y predadores) con el propósito de reducir su abundancia por debajo del nivel en que causan perjuicios económicos (De Bach 1977, Van Driesche y Bellows 1996). Existen tres modos para implementar el control biológico:

- 1) Clásico: consiste en la importación e introducción de enemigos naturales exóticos contra plagas también exóticas, aunque en algunos casos se los emplea contra plagas nativas.
- 2) Aumentativo: se refiere a la cría y liberación periódica de enemigos naturales nativos o exóticos, en grandes cantidades (inundativo) o de unos pocos individuos que sobrevivirán por varias generaciones (inoculativo).
- 3) Por conservación: consiste en el aumento de los enemigos naturales presentes en el agroecosistema, manipulando el ambiente de modo de hacerlo más favorable para ellos. En este aspecto se pueden mencionar técnicas tales como la utilización de hospederas alternativas, los corredores biológicos, el uso de cultivos trampa, la incorporación de plantas con flores, la introducción de refugios potenciales, etc. (Altieri *et al.* 1996, Landis *et al.* 2000).

Entre las opciones para el control de plagas que no generan resistencia ni producen impactos negativos sobre el ambiente se encuentra también la Técnica del Insecto Estéril (TIE). Esta técnica se basa en la cría de la plaga, su

esterilización total con radiación ionizante y la liberación de un número suficiente de adultos esterilizados, para que se apareen con la población silvestre sin dejar descendencia (Knipling 1979).

A fines de la década del 60, surgió la idea del Manejo Integrado de Plagas (MIP), la cual se refiere a la aplicación de estrategias de control basadas en la combinación armoniosa de dos o más tácticas o métodos, seleccionados bajo criterios ecológicos y socioeconómicos (Walter 2003). Según los creadores del concepto MIP, Stern *et al.* (1959), las principales tácticas en las que se ha basado el MIP son el Control Químico y el CB. El MIP ha sido definido por la FAO (1977) como " el sistema de manejo de plagas, que en el contexto de la asociación del medio y la dinámica poblacional de las plagas, utiliza todas las técnicas y métodos adecuados de forma compatible, manteniendo las poblaciones nocivas a niveles por debajo de aquellos causantes de daño económico". En un MIP para el control de la polilla del tomate se podrían utilizar las técnicas y métodos mencionados anteriormente entre otros.

1.1. La plaga, *Tuta absoluta*

La polilla del tomate fue originalmente descrita en 1917 por Meyrick como *Phthorimaea absoluta*, sobre la base de individuos colectados en Perú. Luego, esta especie fue transferida de género varias veces, pasando a *Gnorimoschema* (1962), luego a *Scrobipalpula* (1964), *Scrobipalpuloides* (1987), y por último al género *Tuta* donde fue colocado por Povolny en 1994 (Povolny 1987, Barrientos *et al.* 1998).

Posición sistemática

Orden: Lepidoptera

Superfamilia: Gelechoidea

Familia: Gelechiidae

Tribu: Gnorimoschemnii

Género: *Tuta*

Especie: *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917)

Caracterización de los estados de desarrollo

El ciclo de vida de *T. absoluta* comprende cuatro estados de desarrollo: huevo, larva (cuatro estadios), pupa y adulto.

Huevo: es de forma elíptica, mide entre 0,30 y 0,45 mm de largo y entre 0,20 y 0,25 de ancho (Fig. 1) (García y Espul 1982). En su superficie tiene estrías microscópicas en forma de red. Cuando es depositado por la hembra es de color blanco, luego se va tornando amarillo y a medida que se desarrolla el embrión se va oscureciendo. Previamente a la eclosión, se observa por transparencia la cápsula cefálica y el escudo protorácico de la larva (García y Espul 1982, Estay y Bruna 2002).



Figura 1. Huevo de *T. absoluta* sobre un folíolo de tomate

Larva: es del tipo eruciforme con tres pares de patas y cinco pares de espuripedios de forma cilíndrica (Fig. 2a). El estado larval se divide en cuatro estadios. Las larvas neonatas miden 0,90 mm de largo y son blancas amarillentas con la cápsula cefálica y el escudo protorácico oscuros (García y Espul 1982). La larva de IV estadio mide aproximadamente 8 mm, y hacia el final del estadio se torna verde intenso con una mancha longitudinal de color rosa en el dorso (Cardozo *et al.* 1994, Estay y Bruna 2002) (Fig. 2b). Las larvas de *T. absoluta* tienen la cabeza oscura con una mancha lateral que se extiende

desde los ocelos hasta el margen posterior. Carecen de placa dorsal en el protórax y en su lugar tienen una banda oscura oblicua que no cubre la línea media dorsal. Estas características las diferencian de otros geléquidos (Bahamondes y Mallea 1969, García y Espul 1982, Cardozo *et al.* 1994).

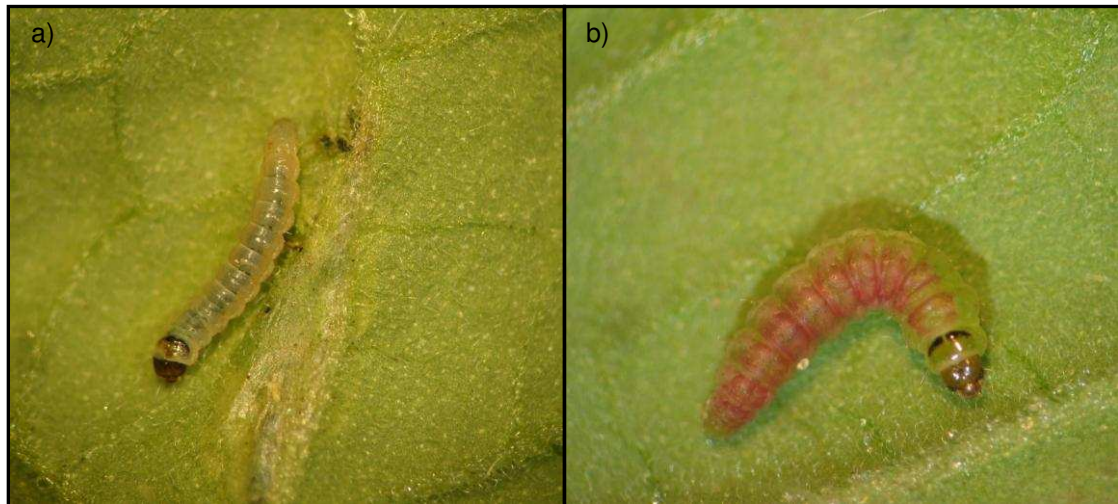


Figura 2. Larvas de *T. absoluta* sobre un folíolo de tomate. a) Larva III y b) Larva IV.

Pupa: al final del IV estadio larval, la larva disminuye su actividad y deja de alimentarse. Entonces, teje un capullo de seda blanco donde empupa, mayoritariamente sobre las hojas de la planta huésped o sobre la hojarasca. Las pupas son del tipo obtectas y su tamaño y peso varían según el sexo, siendo mayores las hembras. Cuando están recién formadas son de color verde, luego se van tornando color pardo y por último pardo oscuro (Bahamondes y Mallea 1969, García y Espul 1982, Estay y Bruna 2002) (Fig. 3).



Figura 3. Pupas de *T. absoluta* de diferente estado de desarrollo

Adulto: es una polilla pequeña de alas angostas y antenas filiformes largas, abiertas en un gran ángulo y elevadas hacia adelante cuando el insecto camina o se posa (Cardozo *et al.* 1994) (Fig. 4). La expansión alar es para los machos de 8,5 a 12,0 mm y para las hembras de 9,0 a 13,0 mm (García y Espul 1982). Ambos pares de alas son de color grisáceo, las alas anteriores son moteadas de gris oscuro, alternadas con escamas de color crema, lo que da un conjunto de pequeñas manchas dentro del tono general gris. Las alas posteriores poseen una banda de pelos finos en el borde posterior (Cardozo *et al.* 1994). El abdomen es de color blanco-crema en las hembras y gris-crema en los machos.



Figura 4. Adulto de *T. absoluta*

Ciclo de vida y comportamiento

La duración de cada uno de los estados de desarrollo y como consecuencia del ciclo completo, varía considerablemente según la temperatura, humedad y fotoperíodo. A una temperatura de 25 °C, el tiempo de desarrollo promedio de *T. absoluta* desde huevo hasta la emergencia del adulto fue de 20 días según Cardozo *et al.* (1994) y 27 días según Marcano (1995). Es una especie multivoltina (Pereyra y Sánchez 2006), las condiciones de temperatura, humedad relativa, disponibilidad de alimento, y factores bióticos de mortalidad, son las causas determinantes del número de generaciones que la plaga puede desarrollar por año.

En nuestro país para cultivos de tomate a campo en Mendoza y San Juan, se han observado desde cinco (García y Espul 1982) hasta seis generaciones por temporada (Riquelme 1993); en el cinturón hortícola platense y en la localidad de Castelar el número de generaciones es de tres a cuatro (Botto *et al.* 1995a); en el Litoral desarrolla generaciones continuas durante todo el año (Cáseres 1992). En las zonas templadas, desde Junio a Septiembre, la polilla del tomate se encuentra mayormente en estado de pupa (Torrilla de Bearzi 1979, Riquelme 1993) aunque si las temperaturas no son muy bajas puede encontrarse en estado adulto (Riquelme 1993). En el área del cinturón hortícola platense y en el litoral, la combinación de sistemas productivos a campo abierto y bajo cubierta permiten a la plaga mantenerse activa durante todo el año, de esta manera, los invernaderos constituyen “reservorios” de polillas, por su oferta continua de alimento y de un ambiente favorable.

Los adultos son más activos durante las horas nocturnas y crepusculares, durante el día permanecen escondidos en el follaje de la planta, generalmente en el envés de las hojas (Rázuri y Vargas 1975, Torrilla de Bearzi 1979). El apareamiento suele ocurrir pocas horas después de la emergencia, y por lo general, en las primeras horas de la mañana (Fernández y Montagne 1990) o en la primera noche posterior a la emergencia (Rázuri y Vargas 1975). La duración del apareamiento es variable, pudiendo requerir de dos, tres y hasta ocho horas. El período de preoviposición puede variar entre 12 a 72 horas (García y Espul 1982). Aunque las hembras pueden ovipositar en diferentes horas del día, el período de mayor actividad se produce en el crepúsculo y en las primeras horas del día (Rázuri y Vargas 1975). La fecundidad de las hembras es muy variable, García y Espul (1982) han observado valores entre 40 y 55 huevos mientras que Rázuri y Vargas (1975) y Fernández y Montagne (1990) han observado valores entre 150 y 300 huevos. El 90% de los huevos son ovipuestos durante los primeros 10 días de edad reproductiva (Fernández y Montagne 1990, Pereyra y Sánchez 2006).

Las hembras, en general, depositan sus huevos mayormente en las hojas (sobre todo en la cara abaxial), pero también lo hacen sobre los tallos, corona, pecíolos y racimos florales o frutales (Cardozo *et al.* 1994, Estay y Bruna 2002). Los huevos son dispuestos generalmente en forma aislada aunque

eventualmente en grupos de hasta cinco (Cardozo *et al.* 1994, Fernández y Montagne 1990). Según la temperatura y humedad relativa, la eclosión de los huevos demora aproximadamente entre 4 días (25 °C) y 7 días (20 °C). Después de la eclosión, las larvas recién emergidas penetran en las hojas y realizan una pequeña galería. Luego, las galerías aumentan de tamaño a medida que las larvas crecen y se alimentan del mesófilo de las hojas, destruyéndolas completamente (Fig. 5). Además, las larvas se pueden alimentar de tallos y frutos, a los cuales también les generan graves daños (García y Espul 1982). Como se mencionó previamente, al finalizar el IV estadio, la larva teje un capullo de seda blanco para empupar dentro de él. El capullo es realizado mayormente en las hojas, en ocasiones aprovechando el acartuchamiento de las mismas. También pueden empupar sobre o dentro del tallo, sobre la superficie del suelo o en la hojarasca, y en ocasiones en los frutos (Estay y Bruna 2002).



Figura 5. Galerías en hojas de tomate realizadas por larvas de *T. absoluta*.

Hospederos secundarios

Aunque el tomate es el hospedero primario de *T. absoluta*, esta también puede alimentarse, desarrollarse y reproducirse sobre otras Solanáceas cultivadas como la papa (*Solanum tuberosum* L.), la berenjena (*Solanum melongena* L.) y el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Vargas 1970, Campos 1976), así como sobre solanáceas no cultivadas (*Solanum nigrum* L., *Solanum*

eleagnifolium L., *Solanum bonariense* L., *Solanum sisymbriifolium* Lam. entre otras) (García y Espul 1982, Larraín 1986).

Distribución y dispersión

Como se mencionó anteriormente, *T. absoluta* es un insecto de distribución Neotropical nativo de Sudamérica (Barrientos *et al.* 1998). En nuestro país, Bahamondes y Mallea (1969) la citan por primera vez en Mendoza, proveniente de una partida de tomates procedentes de Chile en abril de 1964. Desde Mendoza se expandió por todo el país. A comienzos de la década de 1980, *T. absoluta* es registrada como una de las más devastadoras plagas de tomate en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (Barrientos *et al.* 1998; Botto *et al.* 2000, Estay 2000, Desneux *et al.* 2010, 2011). En Europa, la polilla del tomate fue registrada por primera vez en 2006 en España y desde allí se dispersó rápidamente por la región Mediterránea y otras partes del continente (Desneux *et al.* 2010, 2011). En 2011 fue detectada en Centroamérica (Panamá) (J. M. Poveda, comunicación personal). En 2012, fue hallada por primera vez en Senegal (Pfeiffer *et al.* 2013). Desde su detección inicial en Europa, la polilla ha causado daños graves a la producción de tomate en las áreas invadidas (Germain *et al.* 2009). Es considerada actualmente una amenaza clave para la agricultura en Europa y África del norte. En el trabajo de Bloem y Spaltenstein (2011) se muestran las áreas de Estados Unidos que potencialmente podrían ser colonizadas por *T. absoluta*.

Importancia económica

El daño producido por *T. absoluta* en las plantas de tomate es causado por las larvas. Estas, como se mencionó previamente, tienen hábito minador / barrenador y es característico en todos sus estadios. Cuando las larvas se alimentan produciendo minas en la hojas, destruyen el mesófilo foliar y se ubican entre las caras abaxial y adaxial de las mismas (García y Espul 1982). De esta forma se afecta la capacidad fotosintética de la planta y en

consecuencia, el rendimiento. Las larvas también pueden penetrar en los tallos, alterándose el desarrollo general de la planta y pudiendo llegar a causar necrosis. Los frutos pueden ser atacados por la polilla apenas formados, y las galerías generadas en su interior pueden ser invadidas por patógenos secundarios que conducen a la pudrición. Además, un problema adicional importante es que la larva se puede alimentar directamente sobre el ápice de crecimiento de la planta, deteniendo el desarrollo de la misma. Esta plaga afecta la producción de tomate, tanto la destinada al mercado de productos frescos así como al procesamiento del tomate. Las larvas causan pérdidas de hasta un 80-100% (López 1991, Apablaza 1992). Además, la actividad de alimentación de las larvas sobre los frutos afecta el aspecto visual de los productos cosechados.

Manejo

Las decisiones de manejo para el control de *T. absoluta* varían de acuerdo al sistema productivo, la época de plantación, la zona y la etapa fenológica que se considere. El muestreo en todo sistema de manejo racional es esencial para registrar la presencia y estimar la abundancia relativa de las plagas en una etapa del desarrollo del cultivo que permita al productor adoptar una estrategia de control adecuada. En el caso particular de esta plaga, el muestreo previo es fundamental desde la etapa de almácigo (Riquelme 1993, Botto 1999).

Monitoreo de adultos: consiste en la captura de los insectos adultos mediante el empleo de trampas, que indica la presencia de la plaga. Las trampas están formadas por un atractivo y un dispositivo en el cual se atrapa al insecto. Entre los atractivos más utilizados se encuentran las feromonas, sustancias secretadas por los insectos y que permiten la comunicación entre individuos de la misma especie (Gullan y Cranston 2000). En la polilla del tomate, el monitoreo de adultos con trampas de feromonas sexuales se utilizó por primera vez en Chile, y se realizó empleando hembras vírgenes como fuente emisora de la feromona sexual (Quiroz 1978). Botto *et al.* (1995) utilizando trampas de feromonas con hembras vírgenes determinaron que en el cinturón hortícola platense la polilla del tomate puede desarrollar de tres a

cuatro generaciones al año. Estas trampas también se utilizaron en invernaderos pero las altas temperaturas afectaron la supervivencia de las hembras y, por lo tanto, no se obtuvieron buenos resultados (Botto *et al.* 2000). Las feromonas sintéticas para el monitoreo de *T. absoluta* fueron posteriormente desarrolladas en Holanda (PHEROBANK®). Ensayos preliminares sobre la capacidad de estas feromonas sintéticas como herramientas para el monitoreo de la actividad de los adultos de la polilla mostraron que las trampas son eficientes en las capturas de machos, aun con bajas densidades poblacionales de la plaga y cuando se las ubica a más de 50 m de los cultivos (Botto 1999).

Monitoreo en el cultivo: Botto *et al.* (2000) sugieren el conteo de los huevos en el tercio superior de al menos el 10% de las plantas, pues es el estado previo al que ocasiona el daño y el que posibilita el empleo eficaz de los enemigos naturales. Por otro lado, Polack y Mitidieri (2002) recomiendan el registro del número de folíolos con daño fresco (con presencia de larvas) en 20 plantas cada 1000 m². En Mendoza se ha desarrollado un sistema de muestreo cualitativo de daños, en el que se distinguen las categorías de mancha o galería de menos de 2mm (la que realiza la larva neonata), galería de 2 a 5 mm, galería de más de 5mm (la que produce la larva en su último estadio) y folíolo necrosado (Riquelme 1993). El mismo autor sugiere que la hoja más representativa para realizar dicho muestreo es la hoja subyacente a la flor superior.

Nivel de daño económico: Se han sugerido diversos parámetros para el inicio del control. En cultivo bajo cubierta, Botto (1999) recomienda comenzar el control utilizando agentes de control biológico (parasitoides oófagos) al observarse los primeros adultos en las trampas de feromonas y/o ante el registro de las primeras oviposiciones en las plantas. Polack y Mitidieri (2002) proponen iniciar el control químico cuando el número promedio de folíolos con daño fresco por planta es superior a dos y volver a aplicarlo cuando el nivel es nuevamente alcanzado. En Mendoza, en cultivos a campo abierto, se recomienda empezar los tratamientos si se toman dos muestras consecutivas con un promedio de 2-3% de manchas (Riquelme 1993).

Control: En la Argentina, actualmente, el manejo de la polilla del tomate en la actualidad solo se basa en el empleo de productos químicos. Si bien existen protocolos de manejo integrado (Polack y Mitidieri 2002), estos incluyen un empleo más "racional" de los insecticidas según monitoreos previos, pero sin incorporar el CB aplicado. Sin embargo, un uso racional de los productos químicos lleva implícito una mejora en el CB natural, ya que no se estarían afectando los enemigos naturales que se encuentran en el ambiente. El control químico ha sido la táctica empleada tradicionalmente por los productores. Los insecticidas de contacto comúnmente usados hasta la década del 90 (Piretroides, Carbamatos y Fosforados) no eran lo suficientemente eficaces debido al hábito minador de las larvas, lo que conducía a un elevado número de aplicaciones en cada campaña. Estos productos fueron parcialmente reemplazados por insecticidas de acción translaminar como la Abamectina y el Clorfenapir (Mezquiriz 2001). Sin embargo, los problemas antes mencionados de resistencia a algunos principios activos (Lietti *et al.* 2005), aparición de plagas secundarias, contaminación y baja eficiencia de aplicación, generaron la búsqueda continua de otras alternativas para el control de la polilla.

El control cultural implica la destrucción total de los rastrojos de tomate, de los restos del deshojado y desbrote y de toda planta huésped potencial; eliminación de posibles reservorios en el suelo; asegurar la ausencia de la plaga en los almácigos y un correcto manejo del cultivo en general (riego, fertilización, desbrote, etc.). Además, se ha estudiado la resistencia a *T. absoluta* de ciertas variedades y especies como *Lycopersicum hirsutum* (Leite *et al.* 1999).

El CB aplicado, si bien no se utiliza en Argentina, ha sido objeto de investigaciones, en particular, en referencia al empleo de los parasitoides oófagos *Trichogramma pretiosum* Riley, *Trichogramma rojasi* Nagaraja y Nagarkatti y *Trichogrammatoidea bactrae* Nagaraja (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y el parasitoide de larvas *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae) (Ceriani *et al.* 1994, Botto *et al.* 2000, Folcia *et al.* 2003, Heit *et al.* 2006, Luna *et al.* 2007, Riquelme 2009, Sánchez *et al.* 2009, Luna *et al.* 2010, Folcia 2014). *P. dignus* junto al parasitoide larval *Dineulophus phthorimaeae* De Santis (Hymenoptera: Eulophidae) han sido

registrados como las especies más frecuentemente encontradas en cultivos comerciales de tomate (Berta y Colomo 2000), causando niveles de parasitismo de hasta un 70 % (Sánchez *et al.* 2009). Si bien el porcentaje de parasitismo no es el parámetro más útil en términos de la eficiencia del parasitoide, es el más empleado en la bibliografía. Otro parasitoide, *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae) ha sido encontrado parasitando larvas de *T. absoluta* en cultivos orgánicos de tomate a campo y en invernadero, en el norte de la provincia de Buenos Aires (Luna *et al.* 2011).

A diferencia de la Argentina, en otros países de América del Sur el manejo de la polilla del tomate está fundamentado en el control biológico. Por ejemplo, en Colombia el uso del parasitoide de larvas *Apanteles gelechiidivoris* Marsh (Hymenoptera: Braconidae), los parasitoides de huevos *T. pretiosum* y *Trichogramma exiguum* Pinto y Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae), combinado con aspersiones periódicas de *Bacillus thuringiensis* son los componentes más eficientes del control. De esta forma logran mantener a la plaga por debajo del nivel de daño económico, reduciendo el uso indiscriminado de plaguicidas (García Roa 2000). Salas (2001) ha documentado que con liberaciones inundativas de *T. exiguum* como parte de una estrategia de MIP se han alcanzado niveles de parasitismo entre 9,8- 28,6 % en la producción de tomate a campo abierto en Colombia. En Brasil, para el control de la polilla del tomate se emplea el parasitoide de huevos *T. pretiosum*, la cual es una herramienta muy eficiente, especialmente en ambientes protegidos. El parasitoide se libera tres veces por semana asociado a aplicaciones semanales del insecticida biológico *B. thuringiensis* (Medeiros *et al.* 2005). Parra y Zucchi (2004) han documentado un 87 % de parasitismo sobre huevos de *T. absoluta* por *T. pretiosum* en producciones de invernadero.

En España se han realizado numerosos ensayos de laboratorio y a campo para determinar si los huevos de la plaga invasiva, *T. absoluta*, son adecuados para el desarrollo de predadores espontáneos de estos huevos, los míridos nativos *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) y *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Urbaneja *et al.* 2009, Mollá *et al.* 2009, Bompard *et al.* 2013). Estos autores demostraron que ambos míridos son predadores activos de los huevos de la

polilla del tomate y de todos sus estadios larvales (aunque prefieren el primero). Se concluyó que ambos predadores se adaptan bien a la especie invasiva contribuyendo con el CB de la misma en cultivos de tomate. Así, tanto *M. pygmaeus* y *N. tenuis* se han estado empleando en programas de MIP contra la polilla del tomate (Zappalà *et al.* 2013). En 2011, en 3000 ha de producción de tomate en invernáculo en Murcia se realizó un MIP para controlar a *T. absoluta*, basado en la conservación/ inoculación de míridos (Urbaneja *et al.* 2012).

Francia es otro de los países europeos donde se han realizado una gran cantidad de estudios de laboratorio y a campo para estudiar el uso posible de varias especies de *Trichogramma* solas o en combinación con predadores para el control de *T. absoluta* (Bompard *et al.* 2013, Chailleux *et al.* 2012, 2013). *Trichogramma achaeae* Nagaraja y Nagarkatti y *Trichogramma euproctidis* (Girault) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) fueron de las especies estudiadas las que parasitaron un mayor número de huevos de la polilla del tomate (en promedio 20 y 10 huevos en 24 h, respectivamente). Además, encontraron que en laboratorio el uso de *T. achaeae* combinado con *M. pygmaeus* incrementó significativamente el nivel de control sobre la polilla respecto al alcanzado con el empleo de estos enemigos naturales por separado (Chailleux *et al.* 2013). En el sur de Francia, en ensayos a campo de MIP para el control de la polilla también se encontró que el control aumentaba con el empleo combinado de *T. achaeae* y *M. pygmaeus* (Trottin-Caudal *et al.* 2012).

1.2. Genética y esterilidad heredada en el orden lepidoptera

En el pasado, se ha demostrado un exitoso manejo de plagas del orden Diptera a través de la liberación de insectos esterilizados completamente mediante el uso de radiación en la TIE. Esta técnica se basa en la cría del insecto plaga, su esterilización total con radiación ionizante y la liberación de un número suficiente de adultos esterilizados, para que se apareen con la población silvestre sin dejar descendencia (Knipling 1979). Ante los exitosos ejemplos del uso de esta técnica para el control de moscas y mosquitos, y dado que en el orden Lepidoptera se encuentran las plagas más destructivas de

productos almacenados, cultivos y bosques en todo el mundo, los investigadores comenzaron a estudiar la posibilidad de aplicar la TIE para suprimir sus poblaciones (Bushland 1971). Sin embargo, el orden Lepidoptera es altamente resistente a los efectos de la radiación comparado a otros órdenes de insectos, y se requiere aplicar dosis de radiación muy altas para alcanzar la esterilización completa de los individuos (LaChance *et al.* 1967, North 1967, LaChance y Graham 1984, Bakri *et al.* 2005). Estas dosis altas reducen la habilidad de vuelo del macho irradiado y su capacidad competitiva frente a machos silvestres para aparearse con hembras silvestres. A fin de reducir estos efectos negativos de la radiación sobre los machos, se utilizan dosis subesterilizantes que esterilizan parcialmente al macho irradiado de modo que sus capacidades de vuelo y apareamiento no se vean afectadas (North 1975). Además, dado que en los lepidópteros las hembras son mucho más sensibles que los machos a la radiación (LaChance 1985), una dosis de radiación óptima para poder aplicar la TIE en Lepidoptera es aquella que es subesterilizante para el macho, pero que esteriliza completamente a la hembra. Los efectos perjudiciales generados por la radiación en el genoma del macho son heredados por su progenie, generación F1, la cual exhibe mayores niveles de esterilidad que sus padres (North 1975, LaChance 1985). Este fenómeno es llamado esterilidad heredada (EH), esterilidad parcial o esterilidad F1.

La EH fue descrita primero en el gusano de la seda, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) por Astaurov y Frolova (1935) y luego en la polilla de la cera, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) por Ostriakova-Varshaver (1937). Proverbs (1962) redescubrió la EH en *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) y propuso su uso para el control de esta plaga. Knipling (1970) utilizando modelos matemáticos demostró la ventaja potencial de utilizar la EH en lugar de la TIE como estrategia de control de plagas del orden Lepidoptera. Sugirió que en una liberación de machos parcialmente estériles, la relación insecto estéril a insecto silvestre podría ser tan baja como $\frac{1}{4}$ de la que es requerida para insectos completamente estériles. Los principios genéticos de la EH en Lepidoptera fueron revisados por LaChance (1985) y discutidos por Anisimov *et al.* (1989). LaChance (1985) mencionó las siguientes características como propias de la EH en Lepidoptera: la progenie F1 del

macho irradiado presenta mayor esterilidad que este, y la proporción sexual de la progenie F1 está sesgada hacia los machos. Además, los efectos perjudiciales inducidos por la radiación en individuos parentales pueden ser heredados por varias generaciones, aunque son mayormente expresados en la generación F1.

La EH inducida por la radiación ha sido considerada como la técnica genética más ventajosa para la supresión poblacional de lepidópteros plagas (Knipling y Klassen 1976, LaChance 1985, Mastro y Schwalbe 1988). Modelos poblacionales desarrollados por investigadores como Carpenter (1993) y Anisimov (1998), usando los datos colectados para varias especies plagas, han corroborado los modelos teóricos de Knipling. En los últimos años, la aplicación de la EH ha sido investigada en muchos lepidópteros de gran importancia económica como *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Piralididae), *Grapholita molesta* (Busck) (Olethreutidae), *Helicoverpa zea* (Boddie) (Noctuidae), *Heliothis virescens* (F.) (Noctuidae), *Lymantria dispar* (L.) (Lymantriidae), *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Crambidae), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Crambidae), *Plutella xylostella* (L.) (Plutellidae), *Teia anartoides* Walker (Lymantriidae), *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae) (Carpenter y Gross 1993, Mastro 1993, Seth y Reynolds 1993, Sutrisno *et al.* 1993, Makee y Saour 1997, 2003, Marec *et al.* 1999, Bloem y Carpenter 2001, Bloem *et al.* 1999, 2001, 2003, Carpenter *et al.* 2001, 2005, Dhouibi y Abderahmane 2001, Nguyen y Nguyen 2001, Seth y Sharma 2001, Ayvaz *et al.* 2007). La EH ha sido aplicada como estrategia de control en grandes extensiones en dos programas, contra *C. pomonella* y *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Carpenter *et al.* 2005).

Características del genoma del orden Lepidoptera

El genoma de los lepidópteros se caracteriza por ciertas peculiaridades que lo diferencian del genoma de los otros órdenes de insectos. Las especies del orden Lepidoptera se caracterizan por presentar cromosomas holocinéticos, i.e. cromosomas que carecen de constricción primaria y, por ende, de un centrómero localizado. La naturaleza holocinética de estos cromosomas implica

que la actividad cinética está distribuida a lo largo de toda su longitud, y las cromátides hermanas segregan paralelas al plano ecuatorial durante la división mitótica (Murakami e Imai 1974, Wolf *et al.* 1997). Además, los cromosomas de los lepidópteros son pequeños, numerosos y uniformes, tanto en tamaño como en morfología, lo cual dificulta la individualización de los cromosomas mediante técnicas citogenéticas convencionales (Robinson 1971, Bedo 1984). En la mayoría de las polillas y mariposas el número cromosómico haploide varía desde $n = 29$ hasta 31 (Robinson 1971, Brown *et al.* 2007), siendo el número modal $n = 31$. Dado que este número cromosómico modal está presente tanto en los clados basales como en los más avanzados, ha sido propuesto como el cariotipo ancestral para Lepidoptera (Lukhtanov 2000).

Los cromosomas sexuales son del tipo WZ, siendo la hembra heterogamética (WZ) y el macho homogamético (ZZ). También pueden presentar las variantes Z0/ZZ, W_1W_2Z/ZZ o $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$ (Suomalainen 1969, Robinson 1971, Nilsson *et al.* 1988, Traut y Marec 1997, Rishi *et al.* 1999). En los machos los cromosomas realizan una secuencia normal de los eventos meióticos. En cambio, en las hembras los cromosomas sufren una meiosis normal hasta que en el estado paquitene, cuando los cromosomas homólogos se aparean por medio del complejo sinaptonémico para formar bivalentes, este complejo se vuelve visible (Marec 1996). Luego, se desarrolla la meiosis aquiasmática sin recombinación meiótica. La meiosis aquiasmática representa la forma más simple y directa de obtener la reducción cromosómica, puesto que sin necesidad de quiasmas es capaz de mantener una sinápsis paralela de cada par de cromosomas homólogos durante la profase de la primera división meiótica (Traut 1977, Nokkala 1987). Los cromosomas W y Z de la hembra, aunque frecuentemente no son homólogos y son de diferentes tamaños, se aparean completamente durante la meiosis y forman un bivalente regular.

Los machos sufren dos tipos de espermatogénesis mediante los cuales producen dos tipos distintos de espermatozoides (Wolf 1994, Friedländer 1997). Uno de ellos, llamado esperma eupireno, es generalmente de mayor tamaño, posee núcleo y es fértil. El otro, usualmente más pequeño, llamado esperma apireno, no posee núcleo y es infértil. Además, el esperma apireno es

el más abundante, mientras que el eupireno, en general, comprende el 10-15 % del total de esperma transferido a la hembra durante la cópula (Gage y Cook 1994, Cook y Wedell 1996). La función del esperma apireno no es completamente comprendida pero se cree que está involucrado en la movilidad del esperma eupireno, que tiene una función nutricional o que estaría involucrado en la competencia espermática (Friedländer 1997, Cook y Wedell 1996).

Radioresistencia en el orden Lepidoptera

La alta radioresistencia de los lepidópteros ha sido atribuida, por un lado, a la naturaleza holocinética de sus cromosomas como sugirieron primero LaChance (1967) y luego Murakami e Imai (1974) y, por otro lado, al destino de los fragmentos cromosómicos inducidos por la radiación (Tothová y Marec 2001) (Fig. 6a). En los cromosomas de los lepidópteros, la placa cinetocórica a la cual se unen los microtúbulos del huso durante la división celular, cubre una gran parte del largo del cromosoma (Gassner y Klemetson 1974, Traut 1986, Wolf y Traut 1991, Wolf 1996, Wolf *et al.* 1997). Esto asegura que la mayoría de los fragmentos cromosómicos producidos por efecto de la radiación no se pierdan como si ocurre en especies con cromosomas monocéntricos (por ejemplo especies del orden Diptera). Al presentar actividad cinética, los fragmentos acéntricos pueden persistir durante los procesos de división celular, y además ser transmitidos a través de las células germinales a la generación siguiente (Marec y Traut 1993, Marec *et al.* 2001). También, debido a la naturaleza cinética de los cromosomas, se reduce el riesgo del efecto letal causado por cromosomas dicéntricos, fragmentos acéntricos y otras aberraciones cromosómicas inestables (Tothová y Marec 2001).

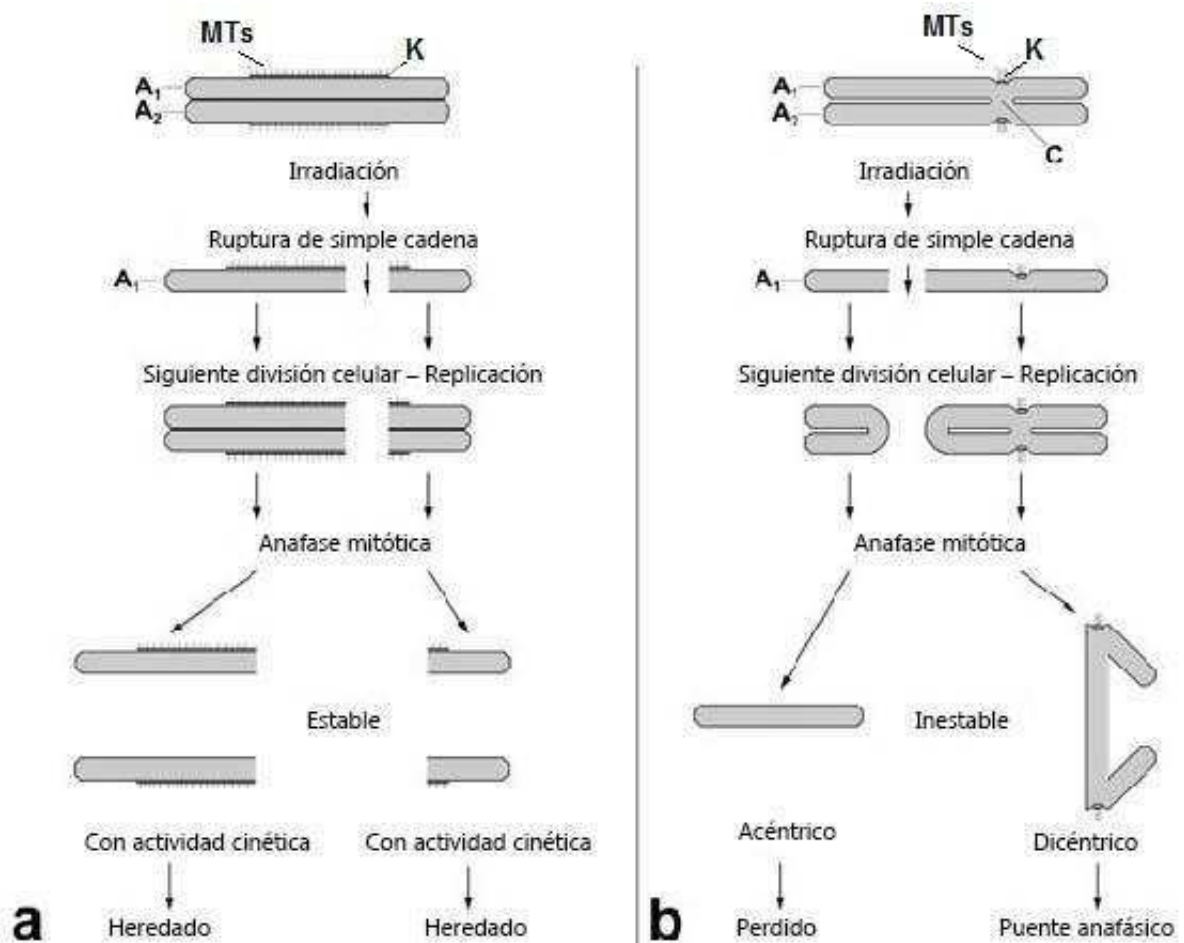


Figura 6. Estructura cinética de los cromosomas de los lepidópteros durante la metafase mitótica, y consecuencias de la rotura de los cromosomas, a) Cromosoma holocéntrico con dos cromátidas hermanas (A1 y A2), cada una con una placa cinetocórica (K) cubriendo aprox. 50 % de la superficie del cromosoma; microtúbulos del huso (MTs) unidos al cinetocoro. b) Cromosoma monocéntrico típico, las cromátidas hermanas se unen por el centrómero (C), el cinetocoro está localizado sobre la superficie del centrómero (Carpenter *et al.* 2005).

Esterilidad inducida por la radiación en la generación parental (F0)

En general, la esterilidad inducida por radiación es una consecuencia de la generación de mutaciones letales dominantes (MLD) que determinan la muerte del cigoto o embrión. Por efecto de la radiación se fragmentan los cromosomas, lo cual produce aberraciones inestables, fragmentos acéntricos y cromosomas dicéntricos. Los primeros se pierden y los últimos forman puentes anafásicos que provocan el cese de la mitosis generando MLD que matan al embrión (Fig. 6b) (LaChance 1967). En la mayoría de los insectos las MLD son expresadas durante la embriogénesis temprana (LaChance 1967). Sin embargo, en el

orden Lepidoptera las MLD son poco frecuentes y la mayoría son expresadas muy tarde en el desarrollo embrionario (LaChance 1974). Tampoco se forman puentes cromosómicos durante anafase, por lo cual no se generan cromosomas dicéntricos durante el desarrollo embrionario (LaChance y Graham 1984). Se deben inducir múltiples rearrreglos cromosómicos en los machos de Lepidoptera para que se manifiesten como MLD, por esto, es que se requieren dosis de radiación muy altas para esterilizarlos completamente (350-500 Gy) (Carpenter *et al.* 2005). La esterilidad inducida por la radiación en los lepidópteros macho podría deberse también a otras causas, como disrupciones fisiológicas durante la cópula, que incluyen tanto la incapacidad de copular como la transferencia de esperma anormal (Koudelová y Cook 2001).

Los lepidópteros hembras son mucho más radiosensibles que los machos (LaChance *et al.* 1967, North 1967). Esta diferencia en la sensibilidad a la radiación entre machos y hembras está relacionada con el estado de desarrollo de las células reproductivas al momento en que se realiza la irradiación. En general, los lepidópteros se irradian en el estado de pupa madura o como adultos recién emergidos. En ambos casos, el macho ya ha completado el desarrollo del esperma eupireno, y el núcleo en el esperma eupireno se encuentra en interfase. En la hembra, en cambio, al momento de la irradiación el núcleo de los oocitos maduros se encuentra detenido en metafase I (meiosis) y el proceso de división celular recién se reactiva cuando los huevos son depositados (Traut 1977). Debido a esto, la irradiación de hembras adultas recién emergidas o en el estado de pupa madura, podría interrumpir el curso normal de la meiosis, incluyendo la segregación de los cromosomas. Además, como los oocitos tienen una gran cantidad de citoplasma en comparación con los espermatozoides, pueden ocurrir varios efectos perjudiciales secundarios al alterar componentes citoplasmáticos involucrados en el desarrollo embrionario (Carpenter *et al.* 2005).

Esterilidad en la generación F1 inducida por radiación

Tothová y Marec (2001) demostraron que la presencia de varios tipos de translocaciones (no recíprocas, recíprocas y múltiples) en la progenie (F1) de machos irradiados, causa la generación de gametas desbalanceadas, y por lo tanto, representan los mecanismos cromosómicos principales de la EH. Otros tipos de aberraciones intra-cromosómicas, como fragmentaciones y deleciones intersticiales también incrementan la frecuencia de gametas desbalanceadas, aunque su contribución a la esterilidad total parece ser menos significativa.

Tothová y Marec (2001) observaron que en *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) la progenie F1 de machos que habían sido irradiados con dosis parcialmente esterilizantes, toleran un número muy alto de aberraciones cromosómicas en su genoma. Ellos describieron que machos que habían sido tratados con 200 Gy, presentaban aproximadamente la mitad de los cromosomas fragmentados al menos una vez. Los cromosomas fragmentados formaron aberraciones de varios tipos, desde fragmentaciones simples hasta rearrreglos cromosómicos muy complicados tales como translocaciones múltiples. Estas aberraciones no se manifestaron como MLD, así la progenie F1 sobrevivió y mantuvo cierto nivel de fertilidad.

Diferencias asociadas al sexo en la Esterilidad Heredada

Dos consecuencias de la EH en la F1 inducidas por la irradiación del macho parental (F0) están asociadas al sexo y correlacionadas positivamente con la dosis utilizada como tratamiento. Una de ellas es que la proporción sexual de la generación F1 está sesgada hacia los machos, y la otra es que el nivel de EH en las hembras de la generación F1 es menor que en los machos (Proverbs 1962, LaChance 1985, Anisimov *et al.* 1989, Bloem *et al.* 1999).

Marec *et al.* (1999) sugirieron que la distorsión sexual en la generación F1 en Lepidoptera es una consecuencia de mutaciones letales recesivas inducidas en los cromosomas sexuales (Z) de los machos parentales irradiados. Debido a que las hembras son heterogaméticas, todas las hembras de la generación F1 serán hemicingotas para el cromosoma Z y, entonces, cualquier mutación perjudicial asociada a este cromosoma provocará la muerte de la hembra F1. En cambio, los machos de la generación F1 heredarán un cromosoma Z del

padre irradiado y el otro de la madre silvestre, con lo cual serán heterocigotas para cualquier mutación letal recesiva asociada al cromosoma Z.

Tothová y Marec (2001) han propuesto tres razones posibles para explicar el mayor nivel de esterilidad observado en los hijos F1 del macho irradiado respecto de las hijas F1. Una de ellas es la capacidad de los machos F1 de sobrevivir a pesar de heredar un gran número de cromosomas fragmentados. Estos investigadores observaron en machos F1 de *E. kuehniella* que la frecuencia de cromosomas fragmentados es dosis dependiente, y está correlacionada positivamente con un incremento en la esterilidad, mientras que esto no fue observado en hembras F1. Esta diferencia se debería a una mayor mortalidad en las hembras F1 que heredan un alto número de cromosomas fragmentados, y a la presencia de mutaciones letales recesivas en el cromosoma Z. Aquellas hembras que sobreviven, son las que tienen un pequeño número de cromosomas fragmentados y, por eso, son más fértiles que los machos.

La segunda razón es la existencia de entrecruzamiento durante la espermatogénesis y su ausencia durante la oogénesis. El proceso de entrecruzamiento podría incrementar el número de gametas desbalanceadas que son producidas, pero únicamente si el punto de entrecruzamiento se da entre un cromosoma aberrante (que fue originado por dos o más fragmentos) y su homólogo estructuralmente normal. Esto podría ocurrir cuando se forman inversiones y translocaciones múltiples. Sin embargo, Tothová y Marec (2001) en su trabajo con *E. kuehniella* observaron que la ocurrencia de inversiones fue muy rara, y llegan a la conclusión de que en esta especie el entrecruzamiento contribuye a la esterilidad en los machos F1 a través de la formación de translocaciones múltiples. Debido a que en las hembras la meiosis es aquiasmática, el entrecruzamiento no contribuye al nivel de esterilidad en las hembras (Traut 1977, Marec y Traut 1993)

En tercer lugar, la radiación podría afectar la transferencia espermática. Se ha encontrado gran variabilidad en el número de espermatozoides transferidos por machos F1 de *E. kuehniella* (Koudelová y Cook 2001). En esta especie el cociente espermatozoides apireno / eupireno aumenta anormalmente ya que el número

de esperma apireno transferido a la hembra se incrementa mientras que el número de espermatozoides eupirenos disminuye.

Estudios realizados con T. absoluta.

El número cromosómico diploide de *T. absoluta* es $2n = 58$, incluyendo un par de cromosomas sexuales ZZ en machos y WZ en hembras, que constituyen los elementos de mayor tamaño en el complemento (Carabajal Paladino *et al.* 2013). La irradiación de pupas con una dosis de rayos X equivalente a 200 Gy generó diferentes rearrreglos cromosómicos, resultando en alteraciones en el número cromosómico (Carabajal Paladino, com. pers.). El análisis de los paquetes de espermatozoides de *T. absoluta* reveló un marcado polimorfismo entre los paquetes de esperma apireno y eupireno. La irradiación de pupas con rayos X con dosis equivalentes a 100, 150, 200 y 250 Gy no tuvo un efecto significativo sobre la proporción de esperma apireno: eupireno producido por los machos. Sin embargo, los machos irradiados con una dosis equivalente a 300 Gy produjeron una cantidad significativamente mayor de espermatozoides apirenos que los no irradiados. Todas las dosis de radiación influenciaron la morfología de los paquetes de esperma eupireno. Estos paquetes deformes podrían ser utilizados como bioindicadores durante el proceso de monitoreo llevado a cabo en los programas de EH (Ferrari 2011). Los espermatozoides eupirenos deformes son transferidos a la *bursa copulatrix* de las hembras durante la cópula. Los machos tratados con 200 Gy transfirieron una cantidad mayor de espermatozoides deformes que los individuos no irradiados (Lauría *et al.* 2012, 2013).

1.3. Integración de la EH con el CB de plagas

Los beneficios de combinar el uso de insectos estériles con otras técnicas de control, entre ellas las liberaciones aumentativas de parasitoides, fue planteada por diversos autores desde hace varios años (Knipling 1964, Barclay 1987, Wong *et al.* 1992). De acuerdo con modelos poblacionales desarrollados,

la combinación de liberaciones inundativas de enemigos naturales e insectos estériles puede resultar en efectos aditivos o sinérgicos (Carpenter *et al.* 2005).

Estudios realizados a campo, invernáculo y laboratorio han demostrado la compatibilidad para estas dos tácticas de control en los sistemas *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) – *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) (Carpenter *et al.* 1996), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) – *Archytas marmoratus* (Townsend) (Diptera: Tachinidae) (Proshold *et al.* 1998), *P. xylostella* – *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Braconidae) (Maung 2002), *O. furnacalis* - *Trichogramma ostriniae* (Peng y Chen) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Wang *et al.* 2001), *H. zea* – *A. marmoratus* (Bloem y Carpenter 2001). En Argentina, se han desarrollado estudios integrando la EH y la liberación de parasitoides tricogramátidos para el control de *C. pomonella* (Botto *et al.* 2005, Botto y Glaz 2010).

1.4. HIPÓTESIS

Sobre la base de los antecedentes mencionados se plantean las siguientes hipótesis:

1. Existe una dosis óptima de radiación que induce Esterilidad Heredada en machos de *T. absoluta* sin afectar los parámetros biológicos (longevidad, capacidad de dispersión) respecto de machos no irradiados.
2. Los machos irradiados de *T. absoluta* y su progenie, debido a la Esterilidad Heredada, son capaces de disminuir una población silvestre de la polilla bajo condiciones semicontroladas.
3. Los huevos de *T. absoluta* provenientes de cruzamientos entre adultos donde uno de ellos (macho o hembra) fue irradiado son aceptados y adecuados para el desarrollo de parasitoides oófagos.

4. Los huevos de *T. absoluta* provenientes de cruzamientos entre adultos donde uno de ellos (macho o hembra) fue irradiado, son presas adecuadas para el consumo de chinches predadoras generalistas de huevos de lepidópteros.

1.5. OBJETIVOS

General:

Establecer las bases biológicas para el desarrollo de la Técnica del Insecto Estéril, basada en la Esterilidad Heredada, para el control de la polilla del tomate *T. absoluta* y su integración con el control biológico a través del uso de entomófagos (parasitoides/predadores).

Específicos

Estudios de radiobiología

1. Estudiar los efectos de diferentes dosis de rayos X sobre la emergencia, fecundidad y fertilidad de *T. absoluta*.
2. Hallar la dosis de radiación óptima para inducir Esterilidad Heredada en *T. absoluta* sin perjudicar los parámetros biológicos de los individuos irradiados.
3. Evaluar el efecto de la radiación sobre la capacidad de dispersión del macho de *T. absoluta*.
4. Evaluar el potencial que tienen las liberaciones de adultos irradiados de *T. absoluta* para suprimir poblaciones silvestres en condiciones semicontroladas.

Integración de la Esterilidad Heredada con el uso de enemigos naturales en una estrategia de manejo integrado de la plaga

5. Evaluar la aceptación por parasitoides tricogramátidos de los huevos producidos por individuos irradiados de *T. absoluta* y la adecuación de estos huevos para el desarrollo de los parasitoides.
6. Evaluar si los huevos producidos por individuos irradiados de *T. absoluta* son adecuados como presas para la chinche *Tupiocoris cucurbitaceus*

1.6. FINALIDAD DEL TRABAJO

Contar con una alternativa de control de bajo impacto ambiental para ser utilizada en combinación con otras técnicas (biológicas, químicas, culturales) en un programa de manejo integrado de la plaga.

Capítulo II

Esterilidad Heredada en

Tuta absoluta

2.1. INTRODUCCIÓN

Entre los métodos de control de lepidópteros plagas que no generan resistencia en las poblaciones y que no afectan negativamente al ambiente se encuentra la Esterilidad Heredada (EH), que es la aplicación de la TIE a este orden de insectos. La EH consiste en la utilización de una dosis de radiación óptima que esterilice completamente a las hembras y parcialmente a los machos cuya calidad y competitividad de apareamiento no se ven, de esta forma, afectadas (Proverbs 1962, North 1975, LaChance 1985, Carpenter *et al.* 2001, 2005). Cuando los machos irradiados parcialmente estériles se aparean con hembras silvestres, los efectos perjudiciales inducidos por la irradiación son heredados y expresados por varias generaciones siguientes, principalmente por la generación F1 (la primera generación de descendientes de los machos parentales irradiados) (Carpenter *et al.* 2005). Como atributos principales de la EH en los lepidópteros, la progenie F1 del macho irradiado es predominantemente masculina y altamente estéril (más que los machos parentales irradiados) (Proverbs 1962, North 1975, LaChance 1985, Bloem y Carpenter 2001, Carpenter *et al.* 2001, Seth y Sharma 2001, Carpenter *et al.* 2005).

El uso de la EH o esterilidad F1 debe ser considerado como una estrategia clave en programas de manejo de lepidópteros plagas, llevados adelante en áreas extensas (“area-wide concept of integrated pest management (AW-IPM)”) (Carpenter *et al.* 2005). La EH es compatible con el uso de otras tácticas de control tales como la disrupción de la cópula, el CB y el control cultural (Carpenter *et al.* 1987; Bloem y Carpenter 2001; Carpenter *et al.* 2005). Investigaciones en las cuales se han realizado liberaciones de machos parcialmente estériles en el campo han demostrado que algunas especies de lepidópteros plagas como el gusano falso medidor *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), el gusano del maíz *H. zea*, la polilla gitana *L. dispar*, la carpocapsa *C. pomonella* y el gusano rosado *P. gossypiella* podrían ser controladas mediante el uso de la EH (North y Holt 1969, Proverbs *et al.* 1978, Carpenter *et al.* 1987, Carpenter y Gross 1993, Mastro 1993, Bloem *et al.* 1999, 2001).

Tradicionalmente, la esterilización reproductiva de los insectos para su uso en la TIE y en la EH se ha realizado mediante el uso de irradiadores de rayos gamma, los cuales emplean isótopos radiactivos como Cobalto-60 o Cesio-137 (Bakri *et al.* 2005). Sin embargo, recientemente se han incrementado las dificultades para conseguir tales irradiadores. Esto es debido a que, por un lado, la empresa Nordion INC (antes MDS INC) ha dejado de producir los irradiadores de Cobalto-60 y, por otro lado, el transporte internacional de fuentes de Cobalto y de otros isótopos radiactivos presenta cada vez mayores complicaciones (Mastrangelo *et al.* 2010, Mehta y Parker 2011). En cambio, los irradiadores de rayos X no dependen de fuentes radiactivas para su funcionamiento, por lo tanto, son más seguros y fáciles de obtener (Mehta y Parker 2011). En este contexto, la IAEA (International Atomic Energy Agency) ha estado promoviendo el reemplazo de irradiadores de rayos gamma por el uso de aparatos de rayos X en los futuros proyectos de investigación en TIE y EH.

Son pocos los trabajos publicados en relación con el efecto producido por la radiación sobre *T. absoluta*. Arthur (2004) estudió el efecto de los rayos gamma sobre diferentes estados de desarrollo de la polilla con el fin de desarrollar un tratamiento cuarentenario para los tomates envasados. Recientemente Yusef (2014) ha evaluado el efecto de la radiación gamma sobre distintos parámetros biológicos de *T. absoluta*. Dada la importancia económica de esta polilla es relevante evaluar la viabilidad del uso de la EH como una técnica posible para su control. Además, estos estudios deberían ser acordes a las actuales exigencias de uso de irradiadores de bajo impacto ambiental (aparatos de rayos X) para efectuar la esterilización de los insectos.

Los objetivos de este capítulo fueron:

- I. Estudiar los efectos de diferentes dosis de rayos X sobre la emergencia, fecundidad y fertilidad de *T. absoluta*.
- II. Hallar la dosis de radiación óptima para inducir Esterilidad Heredada en *T. absoluta* sin perjudicar los parámetros biológicos de los individuos irradiados.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Cría y manejo del material biológico

Origen de los insectos. El trabajo de investigación fue realizado en el Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica (IILB), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), CICVyA- INTA (Castelar, Buenos Aires, Argentina). Inicialmente se estableció una colonia de *T. absoluta* en el laboratorio a partir de huevos y larvas colectadas sobre plantas de tomate infestadas con la polilla, en invernáculos ubicados en los alrededores del laboratorio dentro del predio del INTA Castelar. Periódicamente nuevos insectos provenientes de invernáculos locales fueron incorporados a la cría.

Procedimiento de cría. *T. absoluta* fue criada sobre plantas de tomate aproximadamente durante 30 generaciones, en jaulas de “voile” y estructura de madera (Fig. 7), en una cámara con las condiciones ambientales controladas a 24-30° C y 60-85% HR. Las plantas fueron cultivadas a partir de semillas de tomate redondo sembradas en macetas plásticas de 1 l sobre un sustrato Dynamics N³®.

Para la obtención de huevos de la polilla, se expusieron adultos a plantas de tomate de aproximadamente 40 cm de altura durante 24 h en una jaula de oviposición (jaula oscura de 124 cm de largo, 40 cm de ancho, 80 cm de alto). Luego de este período, las plantas con los huevos fueron trasladadas a otra jaula (122 cm de largo, 37 cm de ancho, 76 cm de alto) para el desarrollo de las larvas. A medida que las larvas fueron consumiendo el follaje se fueron agregando nuevas plantas de tomate de manera que siempre hubiera alimento disponible. Transcurridas aproximadamente 2 semanas (desde octubre a marzo) y 3 semanas (desde abril a septiembre), las larvas rosadas empuparon principalmente en las hojas, aunque también en los tallos y sobre papel “tissue” colocado en la base de las macetas. Luego de aproximadamente 3-7 días, emergieron los adultos. Estos fueron recolectados con la ayuda de un aspirador entomológico con el objeto de exponerlos a nuevas plantas en la jaula de oviposición y así reiniciar el ciclo.

Obtención de pupas para los bioensayos. Para los experimentos realizados fue fundamental conseguir pupas de la misma edad ya que en todos los casos estas fueron irradiadas 48- 72 h previas a la emergencia. Como fue mencionado previamente en esta tesis, al momento de la irradiación el núcleo de los oocitos maduros se encuentra detenido en metafase I (meiosis) y el proceso de división celular recién se reactiva cuando los huevos son depositados (Traut 1977). Debido a esto la irradiación de hembras en el estado de pupas maduras podría interrumpir el curso normal de la meiosis, incluyendo la segregación de los cromosomas (Carpenter *et al.* 2005).

Para obtener las pupas se siguió un procedimiento semejante al descrito para la cría del insecto con la diferencia de que al formarse las larvas rosadas, las hojas infestadas fueron cortadas y colocadas en bandejas plásticas (40 cm de largo, 24 cm de ancho, 8 cm de alto) entre servilletas de papel "tissue". Estas bandejas se colocaron dentro de bolsas de plástico negras y se mantuvieron a 25 ° C hasta el desarrollo de las pupas.

Transcurridos 2-3 días las hojas fueron revisadas exhaustivamente con el objeto de recolectar las pupas formadas. Estas fueron colocadas en cajas de Petri (5 cm de diámetro) con papel de filtro en la base humedecido con 100 µl de agua destilada para mantener una hidratación adecuada.



Figura 7: Jaulas de cría de *T. absoluta*

2.2.2. Aparato de rayos X

Las irradiaciones en todos los experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis fueron efectuados con un aparato de rayos X (Constant Potential X-Ray System Mg 160 Philips) en el Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (CICVyA INTA, Castelar) (Fig. 8). Este aparato emite rayos a una tasa de dosis de 0,679 Grays/ segundos (Gy/s). Las características del irradiador son las siguientes: voltaje del ánodo 120 kVp, corriente 15 mA, calidad del haz Cx120 aprox. 0,07 mm de aluminio (a 160 kV). El dosímetro es un modelo PTW UNIDOS ® E y la calibración fue hecha con dosimetría secundaria estándar (CRRD) por el centro de referencia regional localizado en el Centro Atómico Ezeiza. Fue calibrado por el proveedor con el método de sustitución en términos de air kerma con 1,2 % de incertidumbre expandida en el factor de calibración. La cámara de ión es una cámara de Ionización Tipo Farmer de 0,6 cm³ de volumen (TN30010-2339 PTW-Freiburg); factor de Calibración: $N_k = 4.938 \times 10^7$ Gy/C.



Figura 8: Irradiador de rayos X. “Philips MG-160”, Constant Potential X-Ray System (Minus H: T Generator type 160 kv 4kw)

En los siguientes experimentos, los insectos fueron mantenidos en una cámara con las condiciones ambientales controladas: temperatura máxima $25,5 \pm 0,2$ °C; temperatura mínima $20,8 \pm 0,2$ °C; humedad relativa máxima $78,9 \pm 1,0\%$; humedad relativa mínima $56,2 \pm 3,1\%$ y fotoperiodo 14L: 10O. Estas condiciones ambientales fueron medidas con un termohigrómetro digital (TFA) modelo 30.5003 (Dostmann GmbH & Co.KG, Germany).

2.2.3. Evaluación del efecto de los rayos X sobre la emergencia de los adultos

Para evaluar el efecto de los rayos X sobre la emergencia de los adultos, pupas de *T. absoluta* fueron separadas por sexo y se asignaron de forma aleatoria a los tratamientos (aplicación de distintas dosis de radiación X). La posición de la apertura genital fue el carácter de diagnóstico utilizado para la determinación del sexo en las pupas de la polilla (Fig. 9). Esta se observa en una vista ventral de las pupas, en el octavo segmento abdominal de las hembras y en el noveno de los machos (Coelho y França 1987).

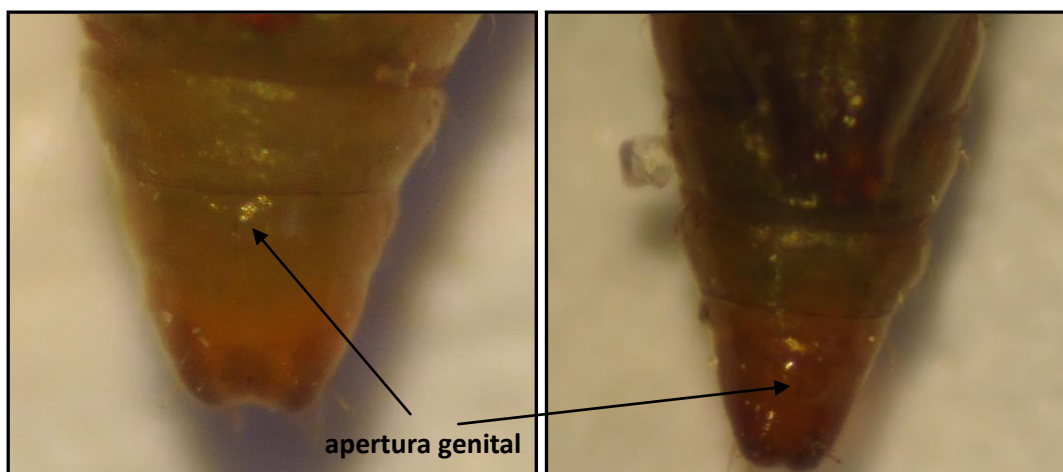


Figura 9: a) Pupa hembra (apertura genital en el 8° segmento), b) Pupa macho (apertura genital en el 9° segmento).

Se prepararon cajas de Petri (1,5 cm de altura y 5,5 cm de ancho) con pupas ♂ y otras cajas con pupas ♀. En cada caja se colocaron ocho pupas

(n=8) del mismo sexo y se irradiaron con rayos X 48-72 h antes de la emergencia del adulto. Los tratamientos fueron las dosis de radiación aplicadas a las pupas (dosis mínima-máxima)= 0 (control); 5175,17-5208,5; 10323,25-10417; 15526,54-15625,5; 20701,70 -20834; 25877,91-26042,5; 31042,66 -31251; 36228,24 -36459,5 Roentgen. Para facilitar la comparación de los resultados obtenidos con los de los trabajos publicados, durante toda la tesis las dosis de radiación X aplicadas serán referidas en sus equivalentes unidades Grays de rayos gamma (Gy). Esto es debido a que los estudios de radiobiología en lepidópteros y dípteros fueron realizados en su gran mayoría con este tipo de radiación. Entonces, en este experimento las dosis aplicadas (mínima- máxima) fueron equivalentes a: 49,68-50; 99,1-100; 149,05-150; 198,73-200; 248,42-250; 298-300 y 347,78-350 Grays.

Para cada combinación de dosis-sexo se realizaron cinco réplicas (cajas de Petri) que fueron expuestas secuencial y aleatoriamente a la radiación. Para ello, cada caja de Petri fue ubicada en el centro del aparato de rayos X respecto al campo de radiación. El efecto de la radiación X sobre la emergencia de machos y hembras de pupas irradiadas de *T. absoluta* fue evaluada considerando el parámetro siguiente:

- Emergencia completa del adulto estimada como la proporción de adultos que emergieron completamente/ total de pupas irradiadas.

La emergencia completa de los adultos hace referencia a los adultos que lograron emerger sin problemas. Esto incluyó a todos los adultos emergidos, tanto a los que tuvieron morfología normal como a aquellos que presentaron alguna deformidad en sus alas o patas pero excluyó a los adultos que no pudieron emerger completamente y quedaron retenidos dentro de la exuvia pupal.

Análisis de los datos. Debido a que la emergencia completa del adulto es una variable de respuesta binaria, la proporción de emergencia completa del adulto fue analizada por una regresión logística con dosis y sexo como variables independientes. La significancia de los parámetros del modelo fue analizada mediante el estadístico Wald y el ajuste del modelo mediante la

prueba de Máxima Verosimilitud, usando el procedimiento para modelo lineal generalizado en el programa Statistica para Windows (Agresti 1996, StatSoft Inc. 2000).

2.2.4. Evaluación del efecto de los rayos X sobre machos irradiados y Esterilidad Heredada

Pupas machos fueron irradiadas con dosis crecientes de rayos X (mínima-máxima): 99,1-100; 149,05-150; 198,73-200; 248,42-250 y 298-300 Gy 48-72 h antes de la emergencia. Los machos que emergieron completamente a partir de estas pupas fueron cruzados con hembras no tratadas (no irradiadas), estableciéndose de esta forma la generación parental (F0). Para cada nivel de dosis aplicada cuatro parejas (réplicas) fueron individualmente colocadas en una jaula de acetato cilíndrica (24,5 cm de altura y 7,5 cm de diámetro) que contenía una planta de tomate (Fig. 10). Esta planta fue renovada dos veces durante el ensayo a intervalos de cinco días. Las primeras dos plantas usadas fueron revisadas cuidadosamente y se registró la cantidad de huevos presentes en ellas. De esta forma, se obtuvo el número total de huevos colocado por hembra durante los primeros diez días de vida, para cada una de las réplicas realizadas. Siguiendo este procedimiento se registró aproximadamente el 90% de la fecundidad total de una hembra durante su vida, ya que a partir de los 10 días de edad el número de huevos que la hembra coloca por día decae a valores cercanos o iguales a cero (Pereyra y Sánchez 2006). La tercera planta fue mantenida en la jaula de acetato hasta que ambos adultos de la pareja murieron.



Figura 10: Jaulas de acetato donde se colocaron las parejas de *T. absoluta* individualmente

Las plantas de tomate con los huevos depositados por cada una de las hembras de *T. absoluta* fueron colocadas individualmente sobre papel "tissue" húmedo en cajas plásticas rectangulares (26 cm de longitud, 18 cm de ancho y 5 cm de altura) (Fig. 11). Cada caja fue identificada con los datos correspondientes a cada réplica (dosis de rayos-X utilizada y número de réplica).

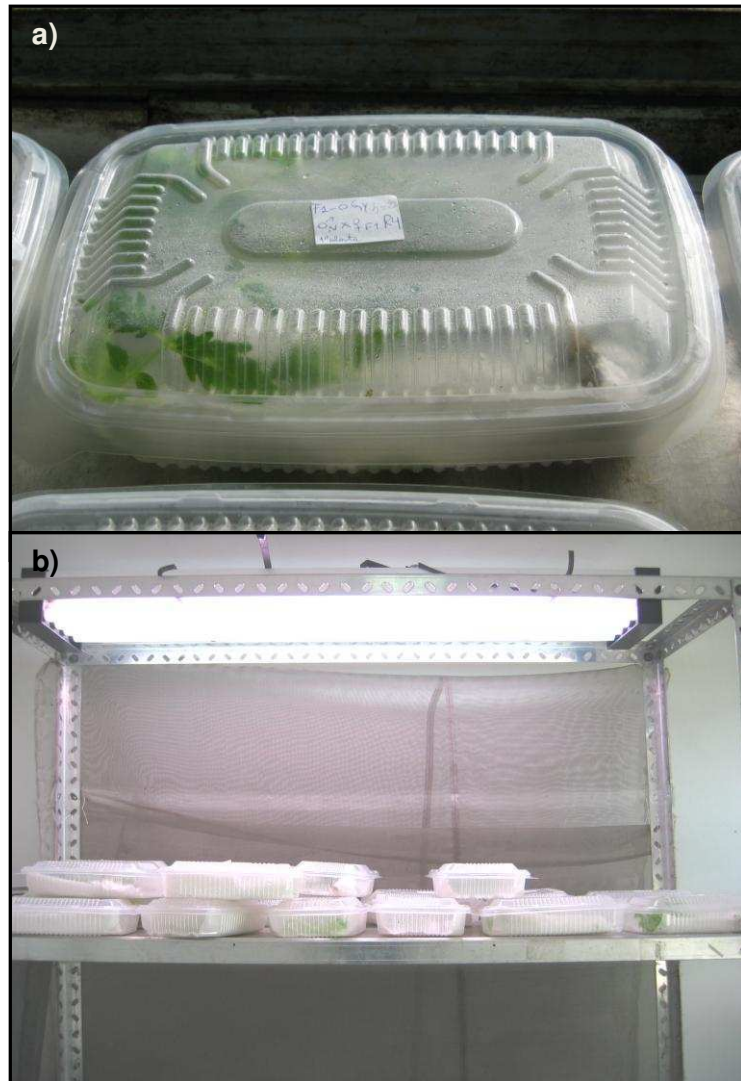


Figura 11: a) y b) Cajas de plástico donde se colocaron las plantas de tomate con los huevos de cada una de las parejas

Luego de siete días, las larvas de la generación F1 (filial 1) que se encontraban en primero y segundo estadio larval fueron contadas y colocadas sobre una nueva planta de tomate en una jaula de acetato (39 cm de altura y 22 cm de diámetro). La base de esta jaula fue una bandeja de plástico con arena y su parte superior fue cubierta con voile (Fig. 12). Las larvas fueron mantenidas allí hasta la formación de las pupas en hojas, tallos y arena. Entonces, las pupas fueron contadas y sexadas.



Figura 12: Jaulas de acetato grandes donde se colocaron las larvas de *T. absoluta* hasta que empuparon

Se registraron los siguientes parámetros por réplica para todas las dosis aplicadas (F0: generación parental, F1: filial 1):

- Fecundidad F0 estimada como la cantidad total de huevos depositados/ hembra F0.
- Longevidad de los adultos F0.
- Fertilidad F0.
- Cantidad de larvas F1/ hembra F0.
- Cantidad de pupas F1/ hembra F0.
- Proporción sexual F1 estimada como la cantidad de machos/ total de individuos

La fertilidad F0 fue estimada como la proporción de larvas I que emergió de la cantidad de huevos registrada (número de larvas F1/ número total de huevos). Esto resultó en una subestimación de la fertilidad debido a la mortalidad de larvas recién nacidas, pero el conteo exacto de huevos eclosionados fue imposible dado que el corion del huevo de *T. absoluta* es muy pequeño y tenue con lo que se daña y pierde fácilmente entre los tricomas de las hojas de tomate por el movimiento de las larvas recién emergidas.

Análisis de los datos. El efecto de la dosis de radiación utilizada sobre la fecundidad F0, la longevidad de los adultos F0 y el número de larvas y pupas

F1 fue analizado por una Regresión Binomial Negativa para datos de conteo. Se utilizó el procedimiento para modelo lineal generalizado en STATGRAPHICS Centurion XVI v16.1.17 (StatPoint Technologies, Inc. 1982-2011). La significancia de los parámetros del modelo fue analizada mediante el estadístico Wald y el ajuste del modelo por la prueba de Máxima Verosimilitud.

Debido a que fertilidad y sexo son variables de respuesta binaria, la proporción de larvas emergidas de los huevos y la proporción sexual fueron analizadas por una regresión logística con dosis de radiación utilizada como variable independiente. La significancia de los parámetros del modelo fue analizada mediante el estadístico Wald y el ajuste del modelo por la prueba de Máxima Verosimilitud usando el procedimiento para modelo lineal generalizado en el programa Statistica para Windows (StatSoft Inc. 2000).

Esterilidad heredada. Con el fin de analizar los efectos de la radiación heredados por la progenie F1 del macho irradiado, los adultos F1 emergidos fueron utilizados para formar dos tipos diferentes de cruzamientos para cada nivel de dosis de radiación estudiada. Estos cruzamientos fueron los siguientes: $\sigma_{F1} \times \varphi_N$ y $\sigma_N \times \varphi_{F1}$ (donde σ_{F1} = macho descendiente de un macho irradiado, σ_N = macho no tratado, φ_N = hembra no tratada, φ_{F1} = hembra descendiente de un macho irradiado). Se realizaron cuatro réplicas (cuatro parejas) para cada tipo de cruzamiento y para cada una de las dosis estudiadas. Luego, con estas parejas de adultos F1 se siguió el mismo procedimiento descrito previamente para las parejas F0.

Para los dos tipos de cruzamientos realizados y para todas las dosis aplicadas se registró:

- Fecundidad F1 estimada como la cantidad total de huevos/hembra (F1: filial 1).
- Longevidad de los adultos F1.
- Fertilidad F1 estimada como la cantidad de larvas emergidas/total de huevos depositados.
- Cantidad de larvas F2/ hembra (F2: filial 2)
- Cantidad de pupas F2/ hembra.

- Proporción sexual F2 estimada como la cantidad de machos/cantidad total de individuos

Análisis de los datos. El efecto de la dosis de radiación y el tipo de cruzamiento sobre la fecundidad y longevidad F1, y sobre el número de larvas y pupas F2/hembra fue analizado por una Regresión Binomial Negativa para datos de conteo. Se utilizó el procedimiento para modelo lineal generalizado en STATGRAPHICS Centurion XVI v16.1.17 (StatPoint Technologies, Inc. 1982-2011). La fertilidad F1 y la proporción sexual F2 fueron analizadas por una regresión logística con dosis de radiación y tipo de cruzamiento como variables independientes. La significancia de los parámetros del modelo fue analizada por el estadístico Wald y el ajuste del modelo por la prueba de Máxima Verosimilitud (StatSoft Inc. 2000).

2.2.5. Evaluación del efecto de los rayos X sobre hembras irradiadas

Pupas hembras fueron irradiadas a dosis crecientes de rayos X (mínima-máxima): 0; 149,05-150; 198,73-200 y 248,42-250 Gy 48 a 72 h previas a la emergencia del adulto. Aquellas que emergieron completamente fueron cruzadas con machos no tratados, estableciendo de esta forma la generación parental (F0). Tres a diez réplicas (parejas) fueron realizadas para las dosis aplicadas a las pupas. Las parejas de adultos fueron mantenidas sobre plantas de tomate en jaulas de acetato (24,5 cm de altura y 7,5 cm de diámetro), luego en bandejas y nuevamente en jaulas de acetato (39 cm de altura y 22 cm de diámetro) según el procedimiento descrito anteriormente para las parejas formadas con machos irradiados.

Para todas las dosis aplicadas se registró:

- Fecundidad F0.
- Longevidad de los adultos F0.
- Fertilidad F0.
- Cantidad de larvas F1/ hembra F0.
- Cantidad de pupas F1/ hembra F0.

- Proporción sexual F1 estimada como la cantidad de machos/ total de individuos

Análisis de los datos. El efecto de las dosis de radiación utilizadas sobre la fecundidad F0, la longevidad de los adultos F0 y el número de larvas y pupas F1 fue analizado por una Regresión Binomial Negativa para datos de conteo. Se utilizó el procedimiento para modelo lineal generalizado en STATGRAPHICS Centurion XVI v16.1.17 (StatPoint Technologies, Inc. 1982-2011). La fertilidad F0 y el proporción sexual F1 fueron analizadas por una regresión logística con dosis como variable independiente mediante el procedimiento para modelo lineal generalizado en el programa Statistica para Windows (StatSoft Inc. 2000). La significancia de los parámetros de los modelos fue analizada por el estadístico Wald y el ajuste del modelo por la prueba de Máxima Verosimilitud (StatSoft Inc. 2000).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Evaluación del efecto de los rayos X sobre la emergencia de los adultos

La proporción de emergencia completa de los adultos decreció significativamente con el incremento de la radiación X (Wald = 19,81; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 20,64$; $P < 0,05$) (Fig. 13). Para una misma dosis de radiación, el efecto dependió del sexo del individuo, siendo la emergencia de las hembras mayor que la de los machos (Wald = 5,52; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 5,54$; $P < 0,05$). Además, se observó que con 350 Gy algunos adultos que emergieron completamente presentaron deformidades tales como alas mal formadas y patas dobladas (Fig. 14).

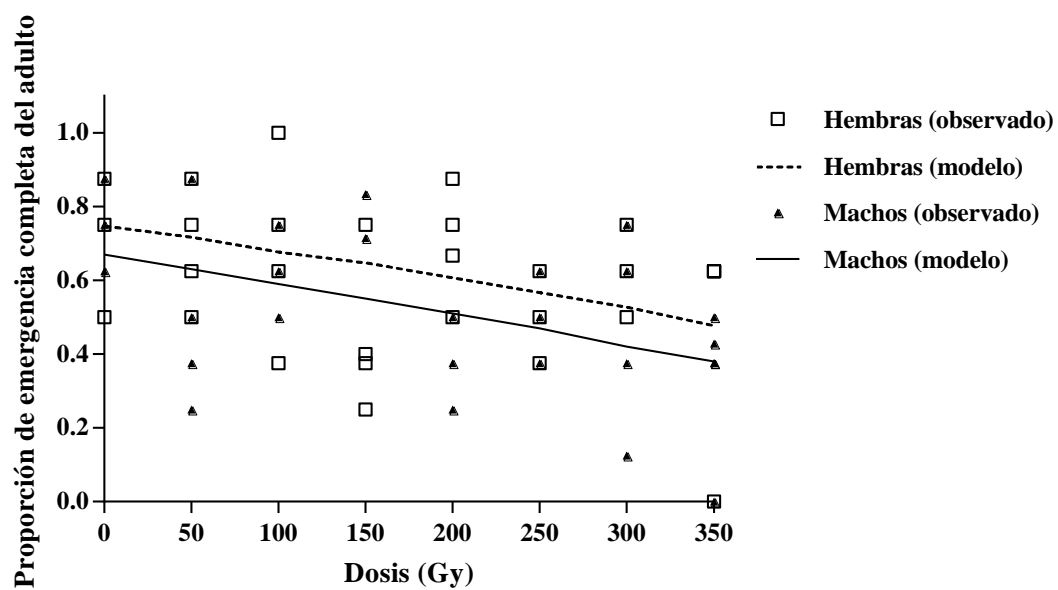


Figura 13: Efecto de la radiación sobre la proporción de emergencia completa de adultos.

Ecuaciones: prop. emerg. ♀ = $e^{(0,92089-0,000032*dosis+0,205238)} / 1 + e^{(0,92089-0,000032*dosis+0,205238)}$

prop. emerg. ♂ = $e^{(0,92089-0,000032*dosis)} / 1 + e^{(0,92089-0,000032*dosis)}$

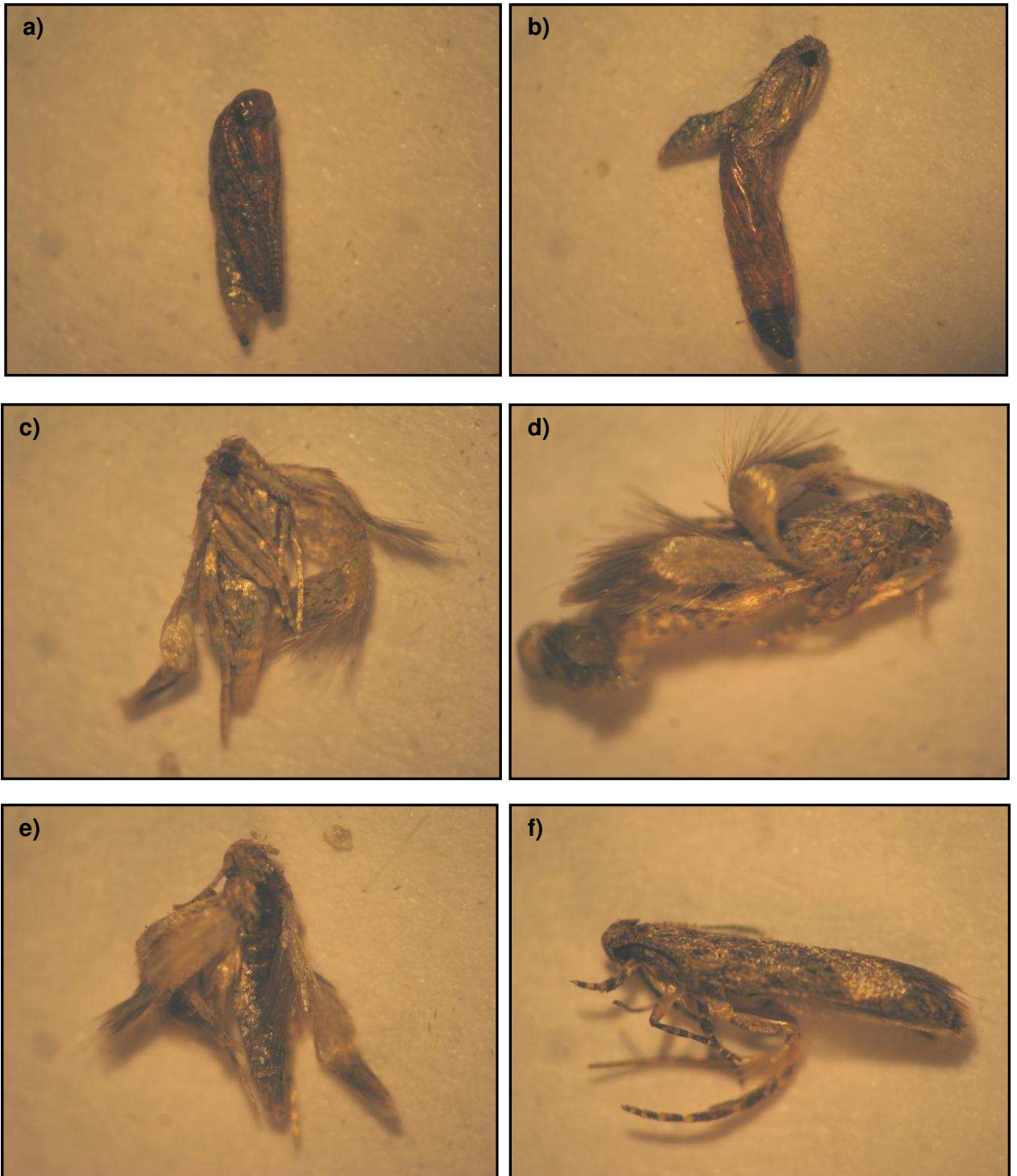


Figura 14: Efectos de los rayos X sobre las pupas irradiadas: a) pupa sin emergencia, b) emergencia incompleta, c), d) y e) adultos emergidos con las alas deformes y f) adulto emergido con las patas dobladas.

2.3.2. Evaluación del efecto de los rayos X sobre machos irradiados y Esterilidad Heredada (EH)

La fecundidad de las hembras normales de *T. absoluta* cruzadas con machos irradiados decreció significativamente con dosis de radiación crecientes (Wald = 1590,17; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 42,88$; $P < 0,05$) (Tabla 1). Sin embargo, cuando la mayor dosis de radiación estudiada (300 Gy) fue excluida del análisis, no se encontró una relación significativa entre la dosis y la fecundidad (Wald = 1,90; $P > 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = -1,95$; $P > 0,05$) (Tabla1, Fig. 15). Esto significa que las hembras no tratadas que copularon con los machos que habían sido expuestos a la dosis de radiación más alta fallaron para depositar un número normal de huevos ($8,25 \pm 2,56$). Esto estaría indicando que la dosis de 300 Gy afectó la habilidad de apareamiento de los machos tratados, entonces debido a esto, esta dosis no fue considerada útil para generar EH en *T. absoluta* y no fue tomada en cuenta en el resto de los análisis. Los demás parámetros se analizaron para las dosis (0 – 250 Gy) (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la radiación X sobre el cruzamiento hembra no tratada x macho irradiado en *T. absoluta*

Dosis (Gy)	Cruzamiento (♂F0 x ♀F0)	Fecundidad F0 (Número de huevos/ ♀) (Media±EE) ^a	Longevidad macho F0 (días) (Media±EE) ^b	Número de larvas F1/ ♀ (Media±EE) ^c	Número de pupas F1/ ♀ (Media±EE) ^d
0	N x N	64,33 ± 19,38	13,33 ± 4,63	46,67 ± 10,11	31,67 ± 11,35
100	I x N	106,25 ± 19,02	17,88 ± 3,30	69,5 ± 7,85	37,25 ± 5,59
150	I x N	67,25 ± 20,09	17,13 ± 3,11	34 ± 4,53	15,75 ± 3,2
200	I x N	61,25 ± 14,13	19,83 ± 3,77	27,25 ± 3,75	17,25 ± 2,66
250	I x N	57,75 ± 14,84	16,12 ± 2,59	16,25 ± 4,40	8,5 ± 2,99
300	I x N	8,25 ± 2,56			

I: irradiado; N: no tratado; F0: parental; F1: primera generación de descendientes del macho irradiado

^a con la dosis 300 Gy incluida: Wald = 1590,17; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 42,88; P < 0,05

sin la dosis 300 Gy incluida: Wald = 1,90; P > 0,05; Chi²₍₁₎ = -1,95; P > 0,05

^b Wald = 2,26; P > 0,05; Chi²₍₁₎ = 0,51; P > 0,05

^c Wald = 388,31; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 24,02; P < 0,05

^d Wald = 225,75; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 20,54; P < 0,05

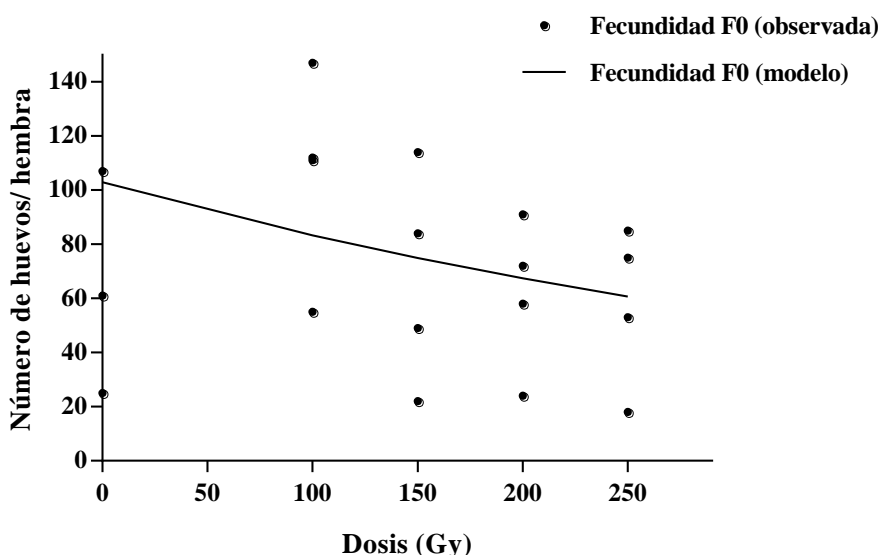


Figura 15: Efecto de la radiación sobre la fecundidad parental (número total de huevos/ hembra F0) cuando machos de *T. absoluta* fueron irradiados como pupas y cruzados con hembras no tratadas (fértil).

F0: generación parental

ecuación fecundidad= e^(5,01229-0,00004845*dosis)

La longevidad de los machos irradiados no fue afectada por la aplicación de la radiación (Wald = 2,26; $P > 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 0,51$; $P > 0,05$) (Tabla 1). La longevidad media \pm E.E. fue 17 ± 1 días. Por otra parte, la radiación afectó significativamente la fertilidad en la generación parental (F0) (Wald = 101,84; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 112,79$; $P < 0,05$) (Fig. 16).

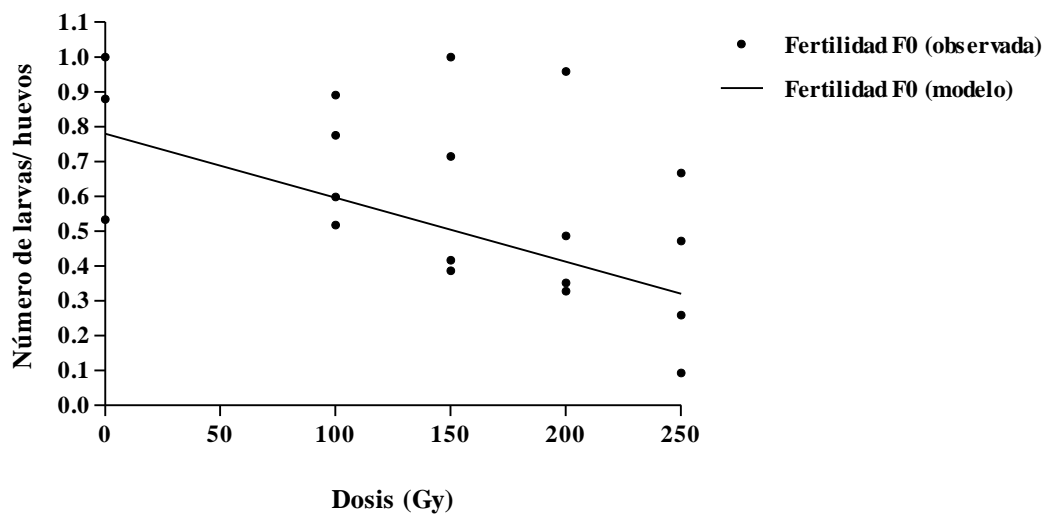


Figura 16: Efecto de la radiación sobre la fertilidad parental (número de larvas/número total de huevos depositados por hembra) cuando los machos de *T. absoluta* fueron irradiados como pupas y cruzados con hembras no tratadas (fértil). F0: generación parental.

$$\text{Ecuación fertilidad} = e^{(1,252993 - 0,000076 * \text{dosis})} / 1 + e^{(1,252993 - 0,000076 * \text{dosis})}$$

Se observó una reducción significativa en el número de larvas y pupas F1/♀ cuando las pupas de los machos parentales fueron irradiadas con dosis crecientes de rayos X (Wald = 388,31; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 24,02$; $P < 0,05$ (Fig. 17) y Wald = 225,75; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 20,54$; $P < 0,05$, (Fig. 18) respectivamente) (Tabla 1).

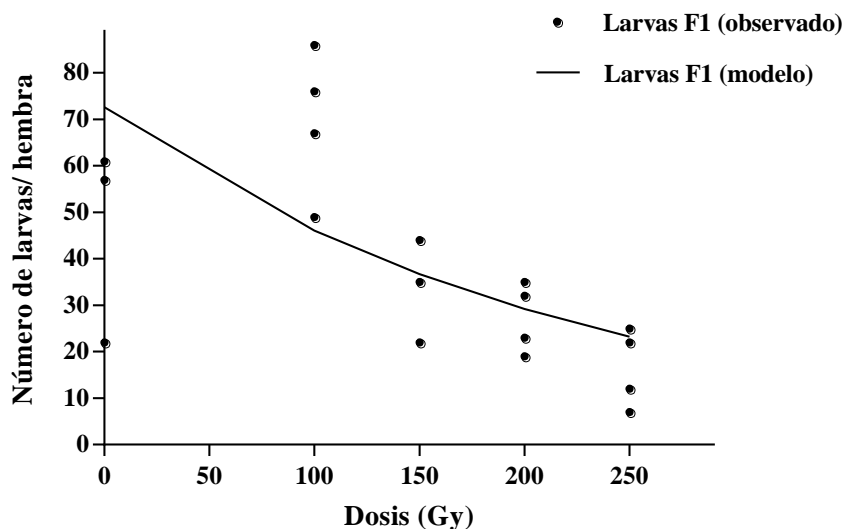


Figura 17: Efecto de la radiación sobre el número de larvas F1 cuando machos de *T. absoluta* fueron irradiados como pupas y cruzados con hembras no tratadas (fértil). F0: generación parental. F1: primera generación de descendientes de los machos irradiados.

Ecuación larvas= $e^{(4,2852-0,00004375*dosis)}$

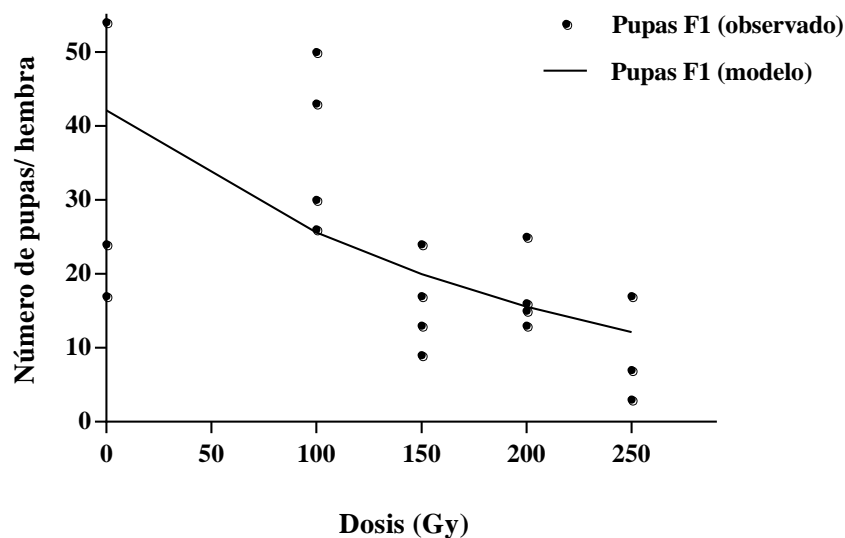


Figura 18: Efecto de la radiación sobre el número de pupas F1 cuando machos de *T. absoluta* fueron irradiados como pupas y cruzados con hembras no tratadas (fértil). F1: primera generación de descendientes de los machos irradiados.

Ecuación pupas= $e^{(3,74032-0,00004777*dosis)}$

No se encontraron diferencias significativas en la proporción sexual F1 entre las dosis utilizadas (Wald = 2,92; P > 0,05; Chi²₍₁₎ = 2,96; P > 0,05). La proporción de machos (media± EE) fue 0,66 ± 0,036.

Debido a que el número de pupas obtenido de los cruzamientos de hembras no tratadas con machos irradiados con 250 Gy fue muy bajo (8,5 ± 2,99) y no emergieron hembras de estas pupas, esta dosis fue descartada para los siguientes análisis de la progenie F2 (Tabla 2). La fecundidad de los adultos F1 cruzados con sus contrapartes no tratadas fue afectada por la dosis de radiación aplicada al macho F0 (Wald = 911,80; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 107,31; P < 0,05) y por el tipo de cruzamiento F1 (♂_{F1} × ♀_N o ♂_N × ♀_{F1}) (Wald = 141,10; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 26,01; P < 0,05) (Fig. 19), (donde ♂_{F1}= macho descendiente de un macho irradiado, ♂_N= macho normal, ♀_N= hembra normal, ♀_{F1}= hembra descendiente de un macho irradiado). La fecundidad F1 decreció con el aumento de la dosis, pero las hijas de los machos irradiados depositaron más huevos que las hembras no tratadas que fueron cruzadas con los hijos de los machos irradiados independientemente de la dosis aplicada (Fig. 19).

Tabla 2. Efecto de la radiación X sobre la progenie F1 y F2 del macho F0 irradiado como pupa

Dosis (Gy)	Fecundidad F1 (Media±EE) ^a	Longevidad F1 (días) (Media±EE) ^b	Número de larvas F2/ ♀ (Media±EE) ^c	Número de pupas F2/ ♀ (Media±EE) ^d
0	106.43 ± 25.64	11.25 ± 2.4	95.71 ± 20.67	65,00 ± 15.23
100	56.13 ± 16.11	15.75 ± 3.4	23.38 ± 6.71	12.50 ± 3.91
200	38.75 ± 10.47	17.0 ± 2.1	18.5 ± 5.34	13.13 ± 4.19

En esta tabla se muestran los datos de los 2 tipos de cruzamientos ♂_{F1} × ♀_N y ♂_N × ♀_{F1} juntos. Donde N: no tratado; F1, F2: primera y segunda generación de descendientes de machos irradiados

^aDosis (Wald = 911,80; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 107,31; P < 0,05). Tipo de cruzamiento (Wald = 141,10; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 26,01; P < 0,05)

^bDosis (Wald = 2,46; P > 0,05; Chi²₍₁₎ = 1,40; P > 0,05). Tipo de cruzamiento (Wald = 3,53; P > 0,05; Chi²₍₁₎ = 2,01; P > 0,05)

^cDosis (Wald = 930,30; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 210,29; P < 0,05). Tipo de cruzamiento (Wald = 29,79; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 4,12; P < 0,05).

^dDosis (Wald = 673,18; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 116,77; P < 0,05). Tipo de cruzamiento (Wald = 61,26; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 5,55; P < 0,05)

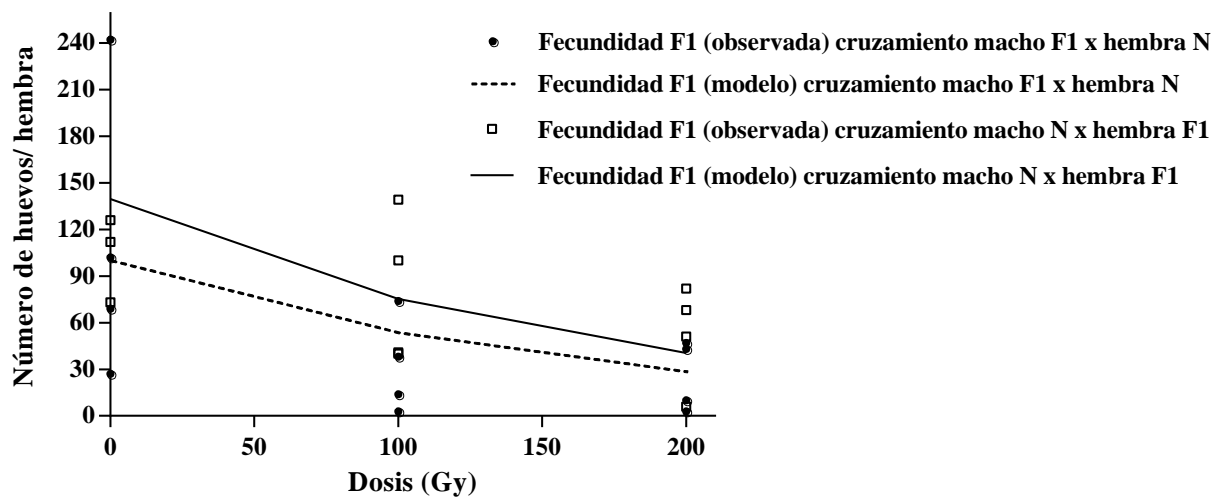


Figura 19. Efecto de la radiación sobre la fecundidad de la progenie F1 (del macho irradiado) para ambos tipos de cruzamientos ($\sigma_{F1} \times \text{hembra N}$ y $\sigma_N \times \text{hembra F1}$). F1: primera generación de descendientes de los machos irradiados.

Ecuaciones: Cruzamiento $\sigma_{F1} \times \text{hembra N}$, fecundidad = $e^{(4,93855-0,00005944 \cdot \text{dos}-0,3269)}$

Cruzamiento $\sigma_N \times \text{hembra F1}$, fecundidad = $e^{(4,93855-0,00005944 \cdot \text{dosis})}$

La fertilidad en la generación F1 fue afectada significativamente solo por el factor dosis (Wald = 217,70; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 268,35$; $P < 0,05$), mientras que el tipo de cruzamiento no tuvo un efecto significativo (Wald = 1,19; $P = 0,27$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 1,14$; $P > 0,05$) (Fig. 20).

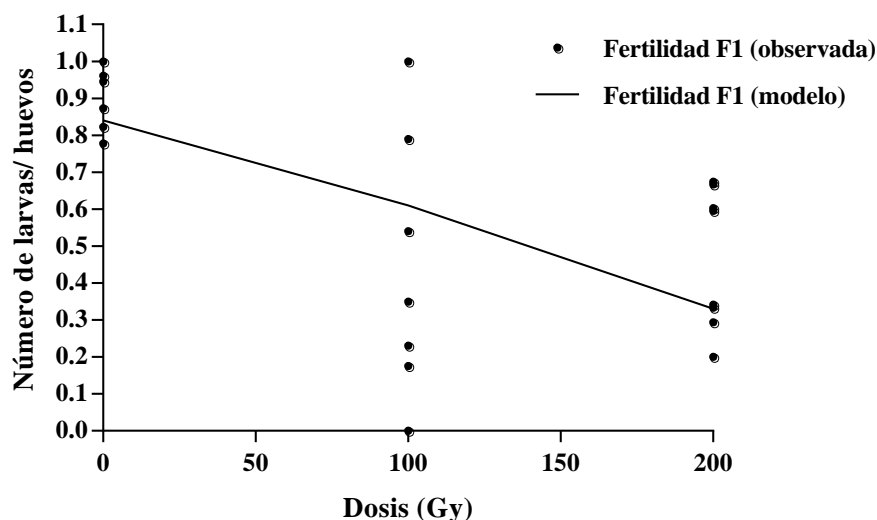


Figura 20. Efecto de la radiación sobre la fertilidad de la progenie F1 (del macho irradiado). F1: primera generación de descendientes de los machos irradiados.

Ecuación fertilidad = $e^{(1,67-0,00011 \cdot \text{dosis})} / 1 + e^{(1,67-0,00011 \cdot \text{dosis})}$

No se observaron diferencias significativas en la longevidad de los adultos F1 entre tratamientos (Wald = 2,46; $P > 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 1,40$; $P > 0,05$ para dosis) y tampoco entre tipo de cruzamiento (Wald = 3,53; $P > 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 2,01$; $P > 0,05$). La longevidad (media \pm EE) fue 14 ± 1 días (Tabla 2).

El número total de larvas F2/♀ decreció significativamente con incrementos en las dosis aplicadas a los machos F0 (Wald = 930,30; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 210,29$; $P < 0,05$) (Fig. 21). El número de larvas F2 también fue afectado por el tipo de cruzamiento F1 ($\text{♂}_{F1} \times \text{♀}_N$ o $\text{♂}_N \times \text{♀}_{F1}$) (Wald = 29,79; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 4,12$; $P < 0,05$) (Fig. 21). Además, un resultado similar fue obtenido para el número total de pupas F2/♀ (Wald = 673,18; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 116,77$; $P < 0,05$ para dosis y Wald = 61,26; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 5,55$; $P < 0,05$ para tipo de cruzamiento) (Fig. 22). La dosis de radiación no tuvo un efecto sobre la proporción sexual F2 (Wald = 1,08; $P > 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 1,71$; $P > 0,05$) y tampoco hubo diferencias significativas en esta variable entre tipo de cruzamientos (Wald = 0,53; $P > 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 0,62$; $P > 0,05$). La proporción de machos (media \pm EE) fue $0,49 \pm 0,042$.

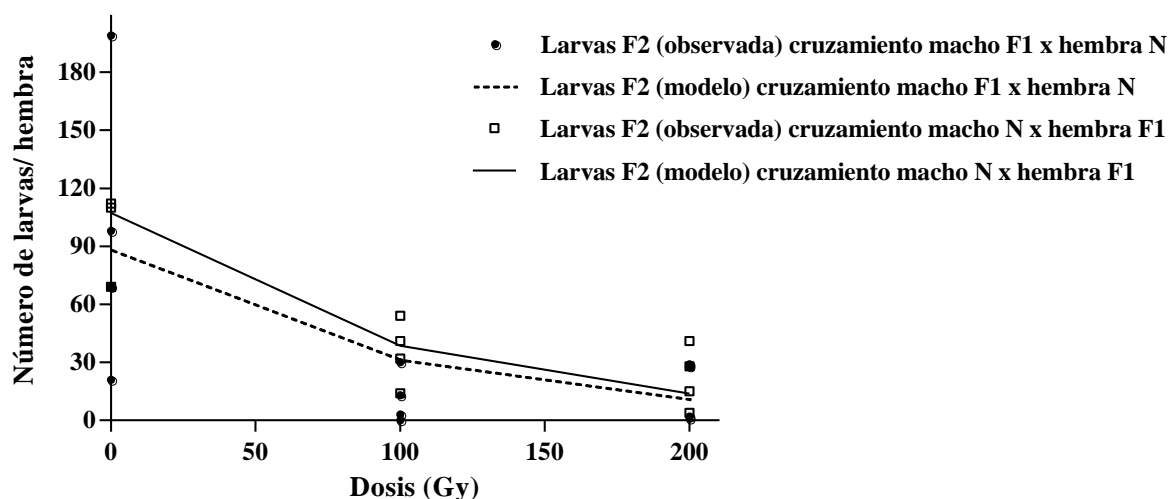


Figura 21. Efecto de la radiación sobre el número de larvas F2 para ambos tipos de cruzamientos ($\text{♂}_{F1} \times \text{♀}_N$ y $\text{♂}_N \times \text{♀}_{F1}$). F1 y F2: primera y segunda generación de descendientes de los machos irradiados

Ecuaciones: Cruzamiento $\text{♂}_{F1} \times \text{♀}_N$, larvas = $e^{(4,6751-0,00009819 \cdot \text{dosis}-0,1910)}$

Cruzamiento $\text{♂}_N \times \text{♀}_{F1}$, larvas = $e^{(4,6751-0,00009819 \cdot \text{dosis})}$

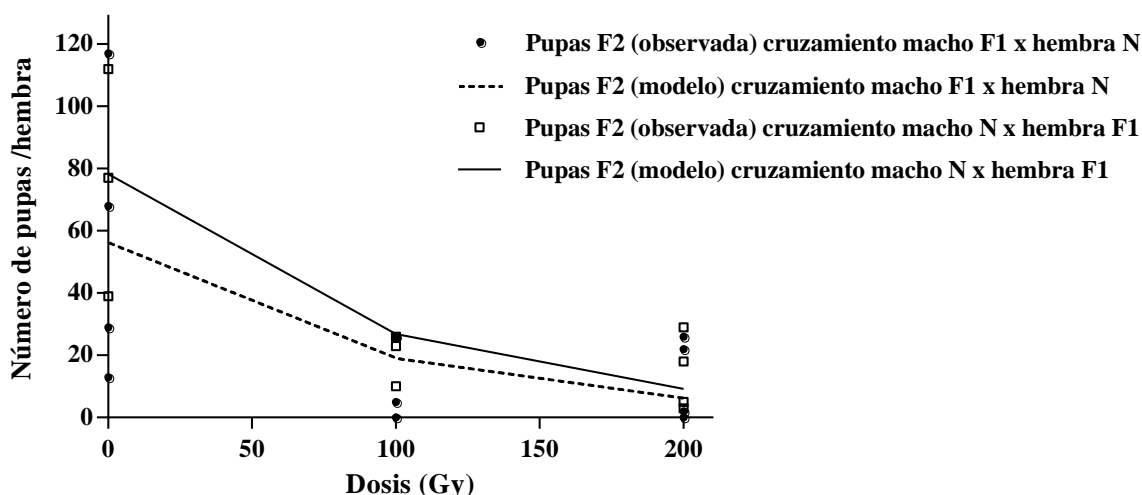


Figura 22. Efecto de la radiación sobre el número de pupas F2 para ambos tipos de cruzamientos ($\sigma_{F1} \times \text{♀}_N$ y $\sigma_N \times \text{♀}_{F1}$). F1 y F2: primera y segunda generación de descendientes de los machos irradiados

Ecuaciones: Cruzamiento $\sigma_{F1} \times \text{♀}_N$, pupas = $e^{(4,3593-0,0001027 \cdot \text{dosis}-0,3260)}$

Cruzamiento $\sigma_N \times \text{♀}_{F1}$, pupas = $e^{(4,3593-0,0001027 \cdot \text{dosis})}$

2.3.3. Evaluación del efecto de los rayos X sobre hembras irradiadas

La fecundidad de las hembras irradiadas fue significativamente afectada por las dosis de radiación aplicadas sobre las pupas (Wald = 591,86; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 465,49$; $P < 0,05$) (Fig. 23). Además, la radiación X afectó significativamente la fertilidad de las hembras irradiadas (Wald = 73,28; $P < 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 79,91$; $P < 0,05$) (Fig. 24). Los huevos depositados por las hembras que fueron irradiadas como pupas a 200 y 250 Gy no eclosionaron. Las únicas larvas F1 que se desarrollaron hasta pupas y luego hasta adultos fueron los descendientes de las hembras no tratadas (0 Gy) (Tabla 3).

Por otro lado, la longevidad de las hembras irradiadas no fue afectada por las dosis de radiación aplicadas sobre las pupas (Wald = 2,23; $P > 0,05$; $\text{Chi}^2_{(1)} = 2,52$; $P > 0,05$). La longevidad (media \pm EE) fue 12 ± 1 días (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la radiación X sobre las hembras irradiadas y sus progenies F1

Dosis (Gy) (Réplicas)	Cruzamiento (♂F0 x ♀F0)	Longevidad ♀ F0 (días) (Media±EE) ^a	Fecundidad F0 (Número de huevos/♀) (Media±EE) ^b	Número de larvas F1/ ♀ (Media±EE)	Número de pupas F1/ ♀ (Media±EE)
0 (8)	N x N	14,22 ± 2,07	62,63 ± 17,80	57,63 ± 4,39	47,63 ± 4,78
150 (8)	N x I	12,5 ± 1,8	4,88 ± 2,64	0,75 ± 0,49	0
200 (10)	N x I	10,4 ± 2,37	0,1 ± 0,1	0	0
250 (3)	N x I	8 ± 3	4,33 ± 4,33	0	0

Gy: gamma; I: irradiado; N: no tratado; F0: parental; F1: primera generación de descendientes de las hembras irradiadas

^aWald = 2.23; P > 0.05; Chi²₍₁₎ = 2.52; P > 0.05

^bWald = 591,86; P < 0,05; Chi²₍₁₎ = 465,49; P < 0,05.

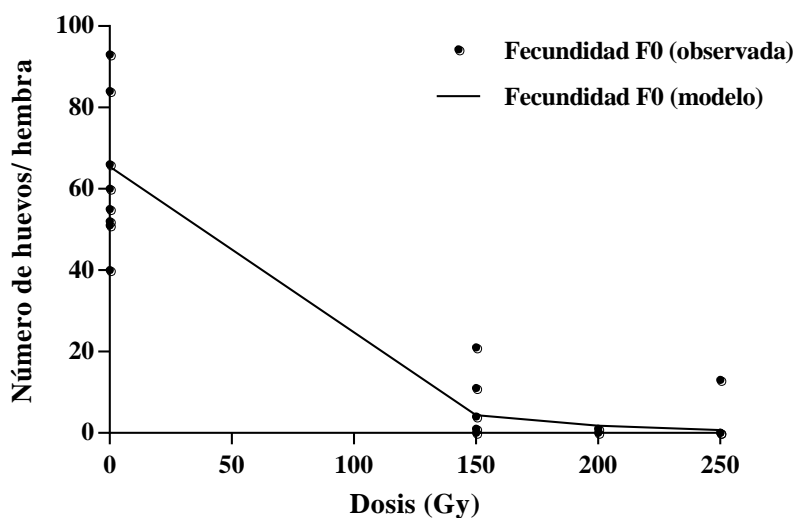


Figura 23: Efecto de la radiación sobre la fecundidad (número de huevos/hembra F0) cuando hembras de *T. absoluta* fueron irradiadas como pupas y cruzadas con machos no tratados (fértiles). F0: generación parental.

Ecuación: fecundidad= $e^{(4,1814-0,0001734*dosis)}$

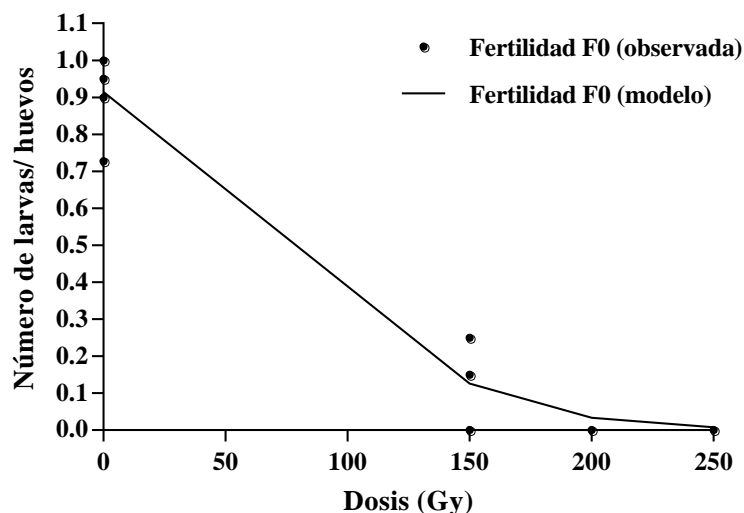


Figura 24: Efecto de la radiación sobre la fertilidad (número de larvas/número total de huevos depositados por hembra) cuando hembras de *T. absoluta* fueron irradiadas como pupas y cruzadas con machos no tratados (fértiles). F0: generación parental.

$$\text{Ecuación: fertilidad} = e^{(0,5210-0,006596 \cdot \text{dosis})} / 1 + e^{(0,5210-0,006596 \cdot \text{dosis})}$$

2.4. DISCUSIÓN

2.4.1. Evaluación del efecto de los rayos X sobre la emergencia de los adultos

La selección de la dosis de radiación óptima, es decir, la dosis de radiación apropiada para inducir EH en las polillas (totalmente esterilizante en el caso de la hembra y subesterilizante en el de los machos) es un punto crítico. Esto es debido a que esta dosis debería ser lo suficientemente alta para evitar la liberación de hembras fértiles pero no debería afectar la competitividad de apareamiento en los machos (Bloem *et al.* 2003). Además, la dosis seleccionada como óptima no debería afectar la emergencia normal de los adultos. En el ensayo realizado para estudiar el efecto de los rayos X sobre la emergencia de la polilla del tomate, se observó que la proporción de adultos de *T. absoluta* emergidos completamente decreció con el incremento de la radiación X aplicada a las pupas.

Los resultados también sugieren que la aplicación de dosis ≥ 350 Gy no solo afectaría la emergencia de los adultos sino también su morfología normal. Las dosis entre 50-300 Gy produjeron una reducción de la emergencia de los adultos comparado al control pero ninguna de las polillas emergidas tuvo alguna deformidad. Esto es consistente con otros trabajos realizados con otras especies de Lepidoptera (Nguyen Thi y Nguyen Thanh 2001, Dhouibi y Abderahmane 2001). Yusef (2014) también encontró una disminución de la emergencia de adultos de *T. absoluta* con dosis crecientes de rayos gamma aplicadas sobre pupas 72 h antes de la emergencia. Sin embargo, esta autora registró individuos con alas deformes y patas dobladas con dosis mayores a 200 Gy. A diferencia de los resultados presentados en esta tesis, Arthur (2004) halló que 300 Gy es una dosis letal al ser aplicada sobre pupas de *T. absoluta*. El tipo de radiación y la forma en que esta afecta al desarrollo del insecto puede ser un factor importante para explicar las diferencias entre los estudios mencionados (Bakri *et al.* 2005). En moscas de la fruta ha sido observado que los rayos gamma causan significativamente más anomalías durante el desarrollo larval que los rayos X (Viscarret *et al.* 2012).

2.4.2. Evaluación del efecto de los rayos X sobre machos irradiados y Esterilidad Heredada (EH)

Una vez que fue establecida la amplitud de dosis de radiación que no afecta la emergencia normal del adulto, el paso siguiente consiste en determinar cuál dentro de este rango es la dosis óptima. Un punto clave a tener en cuenta es que esta dosis debería ser aquella que no afecte la habilidad de apareamiento de los machos tratados (North y Holt 1971, Carpenter *et al.* 2001, Bloem *et al.* 2003, Ayvaz *et al.* 2007). Los resultados de fecundidad aquí presentados mostraron que la habilidad de apareamiento de los machos de *T. absoluta* tratados fue afectada por la dosis de radiación más alta aplicada (300 Gy). North y Holt (1971) encontraron que hembras silvestres de la especie *T. ni* fallaron con alta frecuencia para depositar un número normal de huevos cuando copularon con machos que habían sido irradiados con rayos gamma con una dosis de 300 Gy. Estos autores sugirieron que esto podría deberse a

una inadecuada transferencia del esperma o fluido glandular accesorio a la hembra durante la cópula, lo que implica que la habilidad de apareamiento del macho fue afectada. Por otro lado, la aplicación de dosis de radiación altas no afectó la habilidad de apareamiento en los machos de otras especies de polillas tales como *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) (dosis 100-350 Gy) (Bloem *et al.* 2003), y *P. xylostella* y *Cactoblastis cactorum* Berg (Lepidoptera: Pyralidae) (dosis 100-500 Gy) (Sutrisno *et al.* 1993, Carpenter *et al.* 2001).

La fertilidad de *T. absoluta* en la generación F0 fue afectada por la radiación. Esta relación inversa entre la fertilidad F0 y la dosis de radiación aplicada fue observada en hembras no irradiadas que copularon con machos irradiados como pupas maduras, en muchas especies de lepidópteros (Carpenter *et al.* 1986, Henneberry y Clayton 1988, Carpenter *et al.* 2001, Nguyen Thi y Nguyen Thanh 2001, Bloem *et al.* 2003, Ayvaz *et al.* 2007, Boshra 2007). Por ejemplo, Henneberry y Clayton (1988) mostraron un decrecimiento en la fertilidad de hembras silvestres (43 %) de *P. gossypiella* cruzadas con machos irradiados como pupas con 150 Gy, comparado a la dosis control (0 Gy) cuyas hembras tuvieron una fertilidad del 81 %. Esta especie al igual que *T. absoluta* pertenece a la familia Gelechiidae. Sin embargo, la fertilidad F0 en la polilla del tomate fue mayor que aquella en *P. gossypiella* con la aplicación de 150 Gy. Esto podría estar indicando una mayor resistencia a la radiación en *T. absoluta*. Las diferencias en la sensibilidad a la radiación podrían estar relacionadas a diferencias cuantitativas en el contenido de ADN y al estado de desarrollo de los individuos cuando ellos son irradiados (Tobias 1952, Ostergen *et al.* 1958, Sparrow *et al.* 1965, Mansour 2010). Por otro lado, la mencionada diferencia entre *T. absoluta* y *P. gossypiella* podría también deberse al tipo de radiación utilizada (rayos X o rayos gamma), ya que ambos tipos de rayos tienen diferentes niveles de energía, en consecuencia afectan de forma diferente a la cromatina (Bakri 2005).

En *T. absoluta*, el número de larvas y pupas F1 fue afectado por el incremento en las dosis de radiación evaluadas. Este resultado sugiere que los machos irradiados con altas dosis dejarían en la generación siguiente (F1) un número de larvas y pupas reducido comparado a una población silvestre donde

no se liberan individuos irradiados. Por lo tanto, la liberación de machos irradiados con altas dosis podría afectar el crecimiento poblacional de la plaga.

Una de las ventajas de la EH en lepidópteros machos, como se mencionó anteriormente, es la distorsión de la proporción sexual F1 a favor de los machos (Proverbs 1962, LaChance 1985, Makee y Saour 1997). Las especies de Lepidoptera tienen un sistema típico de determinación del sexo ♀WZ / ♂ZZ (Suomalainen 1969, Traut y Marec 1997, Makee *et al.* 2008). Marec *et al.* (1999) sugirió que la distorsión en la proporción sexual de la generación F1 es un resultado de mutaciones letales recesivas inducidas en el cromosoma sexual Z de los machos parentales irradiados, que son las responsables de la muerte de las hembras F1. Sin embargo, en el experimento aquí presentado no se observó en *T. absoluta* esta desviación de la proporción sexual F1 a favor de los machos. Un resultado similar a éste fue presentado por Carpenter *et al.* (2001) quienes también encontraron una carencia de esta distorsión de la proporción sexual F1 a favor de los machos en la especie *C. cactorum*. Ellos mencionaron que aunque este resultado fue atípico, otros investigadores han registrado un resultado similar. Por ejemplo, LaChance *et al.* (1973) y Ayvas *et al.* (2007) también han observado una ausencia del desvío de la proporción sexual F1 a favor de los machos.

Otro importante atributo de la EH en Lepidoptera es que la progenie F1 es más estéril que los machos F0 irradiados (Proverbs 1962, North 1975, LaChance 1985, Al-Taweel *et al.* 1990, Carpenter *et al.* 2001, 2005, Ayvas *et al.* 2007). Los resultados aquí presentados mostraron que en *T. absoluta* la fertilidad F1 fue menor que la fertilidad F0 (para una dosis de 200 Gy las fertilidades esperadas para la F0 y la F1 son aproximadamente 45 % y 35 %, respectivamente). Asimismo, Carpenter *et al.* (2001) registraron que, los machos de *C. cactorum* irradiados con 100 Gy fueron aproximadamente 45 % estériles cuando se cruzaron con hembras no tratadas mientras que sus descendientes machos (F1) fueron aproximadamente 82 % estériles y sus descendientes hembras (F1) tuvieron valores de esterilidad aproximados a 60 %. A diferencia de estos investigadores, en el ensayo realizado con la polilla del tomate no se encontró un efecto del factor sexo sobre la fertilidad F1, es decir, no se han observado diferencias en los valores de fertilidad entre los

machos y las hembras de la generación F1. Entre las especies de Lepidoptera en las cuales se observó mayor esterilidad en la generación F1 respecto del macho parental irradiado se encuentran: *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) (Al-Taweel *et al.* 1990), *C. pomonella* (Bloem *et al.* 1999), *C. cactorum* (Carpenter *et al.* 2001), *P. gossypiella* (Ahmad *et al.* 2001), *P. xylostella* (Nguyen Thi y Nguyen Thanh 2001), *C. leucotreta* (Bloem *et al.* 2003), *E. kuehniella* (Ayvaz *et al.* 2007), *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae) (Boshra 2007), entre otras.

Brower (1979) mencionó que la reducción en la fertilidad F1 sería causada por translocaciones cromosómicas. Tothová y Marec (2001) demostraron que varios tipos de translocaciones (no recíprocas, recíprocas y múltiples) generan la producción de gametas F1 desbalanceadas genéticamente como progenie de machos irradiados y, por lo tanto, representan los mecanismos cromosómicos principales de EH. Por otro lado, Koudelová y Cook (2001) encontraron que la producción del esperma apireno es mayor en machos irradiados de *E. kuehniella* y aun mucho mayor en su progenie F1. Una reducción en las cantidades de esperma eupireno (esperma fértil) causará una disminución en la fertilidad (Saour y Makee 1997). Como se mencionó anteriormente, los lepidópteros producen dos tipos de esperma: el eupireno y el apireno. El primero es el único que puede fertilizar a los oocitos, mientras que la función del segundo es desconocida, aunque se cree que el esperma apireno participa en la activación del esperma y en la competencia espermática (Silberglied *et al.* 1984, Osanai *et al.* 1987, Gage y Cook 1994, Cook y Gage 1995, Friedlander 1997). En los machos irradiados se observa una relación de esperma eupireno/ apireno anormal, con un incremento de la proporción de esperma apireno (Nguyen Thi y Nguyen Thanh 2001). Respecto a *T. absoluta*, estudios donde se analizaron machos irradiados con rayos X con dosis de 250-300 Gy han mostrado una disminución en la proporción de esperma eupireno y un incremento en la proporción de esperma apireno (Carabajal *et al.* 2013). Además, esto fue acompañado por la presencia de paquetes de esperma eupireno deformes (Ferrari 2011). Snow *et al.* (1972) encontraron que la esterilización mediante el uso de radiación afectó significativamente el tipo y calidad de esperma transferido por machos irradiados en *S. frugiperda*.

La mayor esterilidad en la generación F1 y la disminución en el número de larvas y pupas en las generaciones F1 y F2 al aumentar la dosis aplicada al macho F0, sugieren que los efectos perjudiciales inducidos por la radiación X en el macho F0 fueron heredados por sus descendientes. Teniendo en cuenta todos los parámetros estudiados, se sugiere que dosis en el rango de 200-250 Gy podrían ser utilizadas para inducir EH en los machos de la especie *T. absoluta*.

2.4.3. Evaluación del efecto de los rayos X sobre hembras irradiadas

Los resultados de este experimento demostraron que la esterilidad completa de las hembras de *T. absoluta* podría ser alcanzada a partir de los 200 Gy cuando se aplican rayos X sobre pupas maduras 48- 72 h previas a la emergencia del adulto. Además, las larvas F1 descendientes de las hembras irradiadas con 150 Gy no pudieron alcanzar el estado de pupa. Esto es consistente con lo observado en otras especies de lepidópteros tales como *C. cactorum* y *E. kuehniella* cuyas hembras fueron completamente estériles cuando se les aplicó una dosis de 200 Gy (Carpenter *et al.* 2001, Ayvaz *et al.* 2007). Con respecto a otras especies de la familia Gelechiidae, la esterilidad total de la hembra en *P. gossypiella* y *Phthorimaea operculella* (Zeller) fue alcanzada con el empleo de dosis de 150 Gy y 200 Gy, respectivamente (Henneberry y Clayton 1988, Makee y Saour 2003). Yusef (2014) observó que las hembras de *T. absoluta* fueron totalmente estériles con la aplicación de dosis de radiación gamma iguales o mayores a 100Gy

2.5. CONCLUSIÓN

Se observó una mayor radiosensibilidad en las hembras de la polilla del tomate respecto del macho, siendo estas completamente estériles a partir de los 200Gy mientras que los machos lo son parcialmente. A una dosis menor (150 Gy) los descendientes F1 de la hembra irradiada no alcanzaron el estado de pupa mientras que algunos descendientes del macho irradiado lograron desarrollarse hasta pupas y adultos.

Puede concluirse que la estrategia más apropiada para controlar poblaciones de *T. absoluta* con la EH podría ser la liberación de hembras completamente estériles y machos parcialmente estériles aplicándoles una dosis de radiación X óptima de 200 Gy. En el presente capítulo de la tesis se presenta el primer estudio en el cual se analizan los efectos de la radiación X sobre la polilla del tomate, proporcionando el primer paso para abordar la posible viabilidad de la implementación de la EH para el control de las poblaciones silvestres de *T. absoluta*.

Los datos presentados en este capítulo han sido publicados en una revista internacional (ver apéndice) siendo la siguiente la correspondiente cita:

Cagnotti, C. L., M. M. Viscarret, M. B. Riquelme, E. N. Botto, L. Z. Carabajal, D. F. Segura, y S. N. López. 2012. Effects of X rays on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): for use in inherited sterility programmes. Journal of Pest Science 85: 413-421

Capítulo III

Supresión de poblaciones silvestres de *Tuta absoluta* mediante el uso de la Esterilidad Heredada

3.1. INTRODUCCIÓN

El uso de la EH en Lepidoptera provee algunas ventajas sobre el uso de la esterilización completa en los programas de control de plagas (North 1975, LaChance 1985, Carpenter *et al.* 2005). Debido a que las hembras son mucho más sensibles a la radiación que los machos de la misma especie, esto permite tratar a ambos sexos con una dosis particular que esteriliza completamente a las hembras y parcialmente a los machos. Un beneficio de usar dosis de radiación más bajas (dosis más bajas de las que serían necesarias para esterilizar completamente a los machos) es que la calidad y competitividad de los machos irradiados es mejorada (North 1975, LaChance 1985, Carpenter *et al.* 2005). Resultados de ensayos de campo realizados con *C. pomonella* han mostrado que machos esterilizados parcialmente con dosis de radiación bajas son insectos más activos, más competitivos y que se dispersan a mayores distancias en el campo (Bloem *et al.* 2001). Para evaluar la dispersión de machos irradiados y poder compararla con aquella en individuos no tratados, las trampas de feromonas son herramientas cuya utilidad es ampliamente reconocida (Suckling y Karg 2000, Hight *et al.* 2005).

Así, teniendo en cuenta las ventajas del uso de la EH en el campo, el potencial de esta técnica para suprimir las poblaciones silvestres de polillas plagas ha sido investigado en muchos experimentos de laboratorio y de jaulas de campo (Krafsur 1998, Bloem y Carpenter 2001, Bloem *et al.* 2005, Klassen 2005, Carpenter *et al.* 2005, Suckling *et al.* 2007, Simmons *et al.* 2009). El término supresión se refiere al intento de disminuir las poblaciones silvestres de las plagas por debajo de los niveles a los cuales estas podrían causar daños económicos (Carpenter *et al.* 2005). Entre las especies de lepidópteros plagas que han sido estudiadas en estos experimentos se encuentran *P. xylostella* (Estados Unidos), *H. zea* (Estados Unidos), *C. cactorum* (Estados Unidos y México), *T. anartoides* (Nueva Zelanda) y *C. leucotreta* (Sudáfrica). Dos programas de EH contra lepidópteros plagas han progresado hasta la etapa operativa, uno contra *P. gossypiella* en el Valle San Joaquín de California, Estados Unidos y el otro contra *C. pomonella* en British Columbia, Canadá. En ambos casos, polillas estériles son liberadas en el contexto de programas

llevados adelante en grandes extensiones, en los cuales se usan la EH en combinación con otras estrategias de control (Bloem *et al.* 2005). Estos programas han sido exitosos en cuanto a la supresión poblacional de dichas plagas (Carpenter *et al.* 2005).

Para que la supresión poblacional de una plaga sea alcanzada mediante el uso de la EH, se requiere además de una depresión de la fertilidad de las cópulas entre individuos irradiados y sus contrapartes silvestres, que un número suficiente de individuos irradiados sea liberado para superar la tasa natural de incremento de la población silvestre de la plaga. La tasa: “insectos irradiados liberados/insectos silvestres” crítica para alcanzar la supresión poblacional de una plaga, puede ser estimada mediante experimentos con jaulas de campo o ensayos a campo y también a través de modelos poblacionales. Sin embargo, el número de individuos irradiados liberados en el campo en un programa de EH para la supresión poblacional de un lepidóptero plaga debe ser mayor que el estimado experimentalmente (Kean *et al.* 2007).

En el caso de *T. absoluta* el potencial de uso de la EH sería tanto a campo abierto como en invernáculo. No hay antecedentes sobre esto pero es esperable que la respuesta de los individuos irradiados liberados sea distinta bajo estas dos situaciones ambientales. Como una primera aproximación se planteó evaluar la supresión de poblaciones silvestres de la polilla mediante la liberación de individuos irradiados bajo condiciones de invernadero. El estudio se realizó en dos etapas, evaluando primero el nivel de dispersión de los machos irradiados mediante el uso de una trampa de feromona. Para esto se contó con la disponibilidad de feromona sintética producida por Chemtica Internacional S. A. Luego, en una segunda etapa, se evaluó el potencial para suprimir poblaciones silvestres de *T. absoluta* mediante la liberación de polillas irradiadas utilizando jaulas.

Los objetivos de este capítulo fueron:

- I. Evaluar el efecto de la radiación sobre la capacidad de dispersión del macho de *T. absoluta*.

- II. Evaluar el potencial que tienen las liberaciones de adultos irradiados de *T. absoluta* para suprimir poblaciones silvestres en condiciones semicontroladas.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados en el Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica (IILB), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), CICVyA- INTA (Castelar, Buenos Aires, Argentina). Los individuos de *T. absoluta* empleados en los experimentos correspondientes a este capítulo fueron obtenidos de la colonia mantenida en el laboratorio. El procedimiento para la cría de la polilla del tomate fue descrito en el Capítulo I (Materiales y Métodos: a) colonias de insectos).

3.2.1. Aparato de rayos X

El aparato de rayos X con el cual se irradiaron las pupas de *T. absoluta* fue descrito en Materiales y Métodos del Capítulo I.

3.2.2. Evaluación del efecto de la radiación sobre la capacidad de dispersión de los machos de *T. absoluta*

El ensayo se realizó en un invernáculo de paredes y techo de vidrio (16 m de largo, 7 m de ancho) ubicado en el predio del CNIA (Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias) del INTA, Castelar (Fig. 25). Pupas machos fueron colocados en cajas de Petri (1,5 cm de altura y 5,5 cm de diámetro) e irradiadas con rayos X (48-72 horas antes de la emergencia). La dosis (mínima-máxima) utilizada fue 198,73-200 Gy. Esta fue la dosis seleccionada como óptima para generar EH en *T. absoluta* (Capítulo I de esta tesis).

En uno de los extremos del invernáculo, considerando su largo, se colocó una trampa de feromona (Fig. 26a). Luego de la emergencia de los machos adultos, se liberaron 50 ♂_I y 50 ♂_N a 14,5 m de la trampa. Luego, a las 48 y 96 h se hicieron nuevamente dos liberaciones de 50 ♂_I y 50 ♂_N cada una.

Además, se colocaron otras dos trampas tipo delta, fuera del invernáculo en el predio del CNIA, a 40 m y a 20 m del punto de liberación de los individuos (Fig. 26b).



Figura 25: Invernáculo de vidrio donde se realizó el ensayo de dispersión



Figura 26: a) Trampa de feromona tipo delta colocada dentro del invernáculo y b) trampa ubicada fuera del invernáculo

Estas trampas se colocaron para evaluar si los machos alcanzaban a dispersarse a mayores distancias desde el punto de liberación. Los machos irradiados y normales fueron identificados mediante marcas con polvo fluorescente de distintos colores (Day Glo Color, Cleveland, OH United States) (Bloem *et al.* 1998a). Durante 4 días, cada 24 horas las trampas fueron revisadas y se registró el número de machos de cada grupo capturado. Se registraron las condiciones de temperatura y humedad relativa dentro del invernáculo con un termohigrógrafo HOBO. Diferencias en la cantidad de machos irradiados y no irradiados capturados en cada uno de los registros fueron analizadas mediante una prueba de Friedman para muestras dependientes en el programa Statistica para Windows (StatSoft Inc. 2000).

3.2.3. Evaluación de la supresión de la población plaga por polillas irradiadas y su progenie.

Ensayo 1. El estudio se realizó en un invernáculo experimental de estructura plástica (Fig. 27) en el IMYZA (INTA- Castelar), durante la temporada verano-otoño 2012. Se dispuso de jaulas de armazón de hierro y paredes y techo de “voile” (0.80 m de alto x 0.55 m de lado x 0.60 m de largo) en cuyo interior se colocaron 4 plantas de tomate (con 6-8 hojas) (Fig. 28). Las plantas fueron regadas cada 2-3 días y no recibieron ningún otro tratamiento durante el transcurso del experimento.



Figura 27. Invernáculo experimental de estructura plástica donde se realizaron los ensayos de supresión poblacional



Figura 28: Jaulas utilizadas en los ensayos de supresión poblacional

Pupas de *T. absoluta* obtenidas de la cría fueron separadas por sexo en cajas de Petri (1,5 cm de altura y 5,5 cm de diámetro) e irradiadas con rayos X (48-72 horas antes de la emergencia). La dosis de radiación (mínima- máxima) utilizada fue 198,73-200 Gy. Esta es la dosis que resultó óptima para generar EE en *T. absoluta*, según los resultados de los ensayos presentados en el Capítulo I.

Se estudió el efecto sobre la supresión poblacional de una tasa de liberación de polillas irradiadas respecto de no irradiadas de 10:1. Para ello, los adultos emergidos de las pupas irradiadas fueron liberados en las jaulas de

acuerdo con las siguientes relaciones ♂I: ♀I: ♂N: ♀N= 1) 0:0:3:3 (tratamiento control) y 2) 30:30:3:3 (tratamiento con liberación de individuos irradiados). Las jaulas fueron asignadas a estos dos tratamientos aleatoriamente contándose con 5 réplicas (jaulas) para cada uno. Las plantas fueron renovadas constantemente de forma que el alimento no fue una limitante para el desarrollo de la población de polillas dentro de cada una de las jaulas. El crecimiento poblacional de la polilla del tomate se determinó registrando una vez por semana la cantidad de huevos, larvas chicas y grandes en cada una de las jaulas. El ensayo se realizó durante los meses de febrero, marzo y abril. Las condiciones ambientales fueron registradas mediante un termohigrógrafo HOBO.

Ensayo 2. Se repitió el procedimiento descrito en el Ensayo 1 con una tasa de liberación de polillas irradiadas respecto de no irradiadas de 15:1. Se liberaron insectos irradiados y no tratados de acuerdo a las siguientes relaciones 0 ♀I: 0 ♂I: 3 ♀N: 3 ♂N (tratamiento control) y 45 ♀I: 45 ♂I: 3 ♀N: 3 ♂N (tratamiento con liberación de individuos irradiados). Se realizaron 10 réplicas del control y 5 réplicas del tratamiento con liberación de individuos irradiados. El ensayo fue iniciado en Octubre de 2012 (comienzo de la primavera). Las variables mencionadas anteriormente fueron registradas durante tres meses.

Análisis estadístico aplicado en los ensayos 1 y 2: el efecto de los tratamientos sobre la cantidad de huevos, larvas pequeñas y larvas grandes por jaula fue evaluado en cada pico poblacional usando modelos lineales generalizados con el software R versión 2.13.1 (<http://www.r-project.org/>). Se usó la función gls (Generalized Least Squares) de la librería NLME (Nonlinear Mixed Effects Linear and Models). Los datos fueron normalizados usando la transformación Box-Cox. Se escogió una estructura de error en donde la correlación entre las fechas fue considerada a través de una matriz de simetría compuesta. Se evaluó la estructura de la matriz de varianzas-covarianzas con el criterio de información de Akaike (AIC) y se usaron pruebas de Máxima Verosimilitud para comparar los tratamientos.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Evaluación del efecto de la radiación sobre la capacidad de dispersión de los machos de *T. absoluta*

Las temperaturas (°C) y la humedad relativa (%) mínimas y máximas (media \pm EE) fueron $21,73 \pm 1,52 / 27,65 \pm 0,47$ y $48,75 \pm 5,39 / 84,25 \pm 4,31$. La prueba de Friedman no mostró diferencias significativas en la dispersión entre machos de *T. absoluta* irradiados y no tratados ($T^2 = 1$; $P = 0,39$) (Fig. 29).

En las trampas colocadas fuera del invernáculo, se encontraron 5 machos no irradiados en la ubicada a 40 m del punto de liberación de los individuos y un macho no irradiado en la trampa ubicada a 20 m de este.

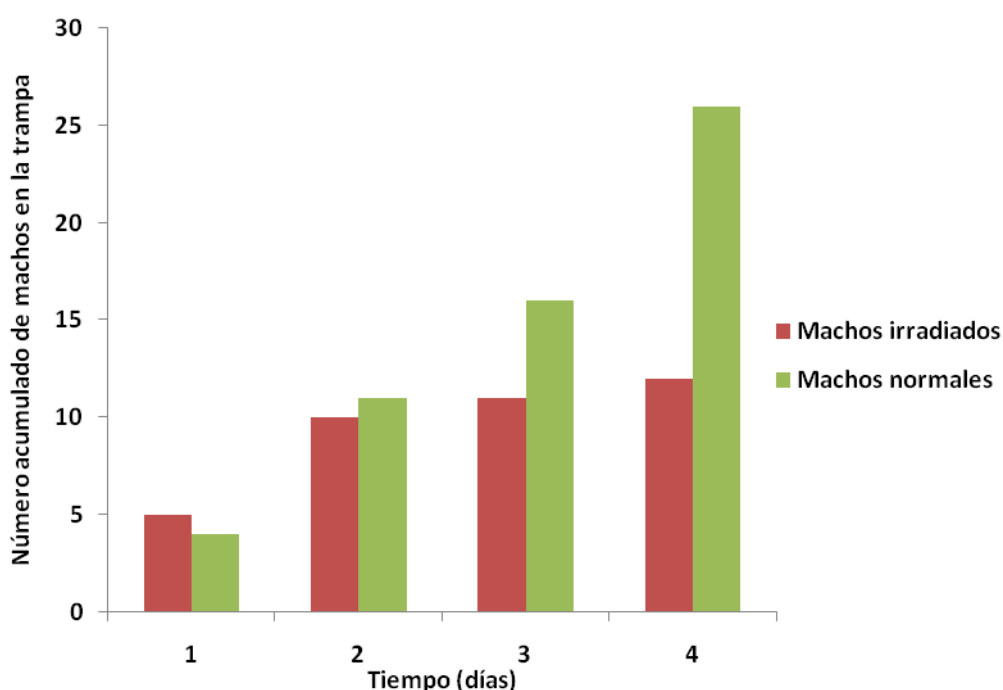


Figura 29: Número acumulado de machos normales y machos irradiados durante cuatro días en la trampa de feromona colocada en el interior del invernáculo.

3.3.2. Evaluación de la supresión de la población plaga por polillas irradiadas y su progenie.

Ensayo 1. Las temperaturas (°C) y la humedad relativa (%) mínimas y máximas durante este experimento (media \pm EE) fueron $11,42 \pm 0,81 / 32,38 \pm 1,22$ y

37,59 ± 2,51/ 83,32 ± 1,3 respectivamente. Durante los tres meses de duración del experimento el incremento poblacional de *T. absoluta* mostró dos generaciones.

Las tres variables registradas (número de huevos, número de larvas pequeñas y número de larvas grandes) mostraron dos picos a lo largo del tiempo (Fig. 30). Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el número de huevos en ambos picos ($F_{1,8}=22,93$; $P=0,0014$; $F_{1,36}=4,39$; $P=0,043$; respectivamente). En el primer pico, se registró un número mayor de huevos en las jaulas con el tratamiento de liberación que en las jaulas control. En el segundo pico, este resultado se invirtió con un número mayor de huevos en las jaulas control. No hubo diferencias significativas entre semanas en el segundo pico ($F_{1,36}=0,0058$, $P=0,93$) (Fig. 30a). En ambos picos poblacionales el número de larvas pequeñas fue mayor en las jaulas control respecto de las jaulas en donde se introdujeron las polillas irradiadas. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($F_{1,26}=0,05$ $P=0,83$; $F_{1,46}=3,14$ $P=0,083$; respectivamente). No hubo diferencias significativas entre fechas en ambos picos ($F_{1,26}=1,56$ $P=0,22$; $F_{1,46}=0,18$ $P=0,67$; respectivamente) (Fig. 30b). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en la cantidad de larvas grandes en ambos picos ($F_{1,16}=0,023$ $P=0,88$; $F_{1,26}=2,66$ $P=0,11$; respectivamente). Por otro lado, hubo diferencias significativas en el número de larvas grandes entre las fechas en ambos picos ($F_{1,16}=11,07$ $P=0,0043$; $F_{1,26}=9,40$ $P=0,0050$; respectivamente) (Fig. 30c).

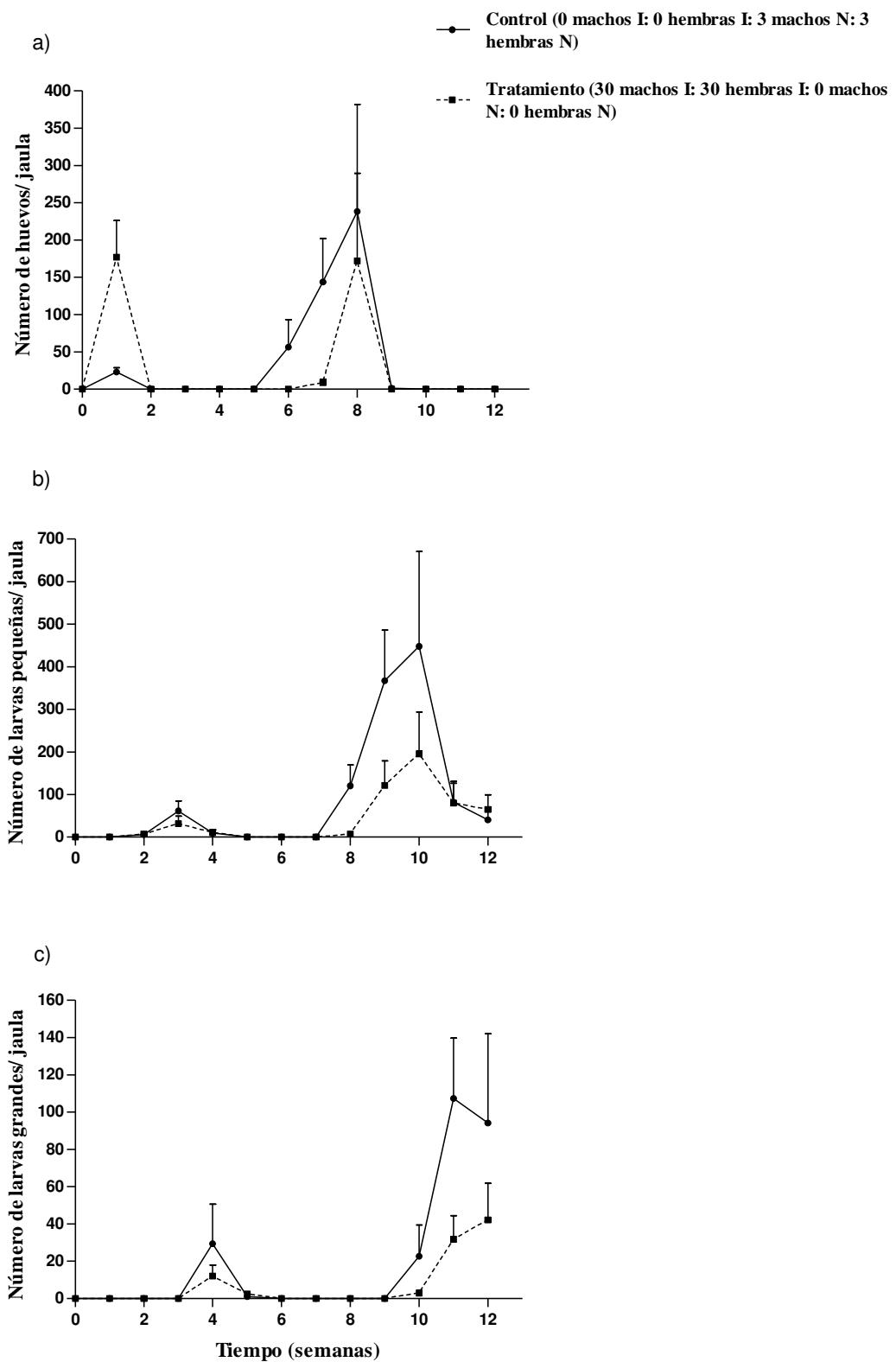


Figura 30. Ensayo 1. Supresión poblacional de una población silvestre de *T. absoluta* por individuos irradiados y su progenie a través del tiempo. a) Número de huevos. b) Número de larvas pequeñas. c) Número de larvas grandes

Ensayo 2. Las temperaturas (°C) y la humedad relativa (%) mínimas y máximas durante este experimento (media±EE) fueron $14,9 \pm 0,049/37,7 \pm 0,99$ y $26,58 \pm 1,38/79,71 \pm 2,19$; respectivamente. Durante los tres meses de duración del experimento el incremento poblacional de *T. absoluta* mostró tres generaciones.

El número de huevos, larvas chicas y larvas grandes mostró tres picos a través del período de tiempo analizado (Fig. 31). Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el número de huevos en el primer pico y marginalmente en el segundo pico ($F_{1,26} = 10,11$ $P = 0,0038$; $F_{1,26} = 3,81$ $P = 0,062$; $F_{1,26} = 2,64$ $P = 0,12$; respectivamente). Diferencias significativas entre fechas solo se observaron en el primer pico ($F_{1,26} = 74,78$, $P < 0,0001$; $F_{1,26} = 0,50$ $P = 0,48$; $F_{1,26} = 2,15$ $P = 0,15$; respectivamente) (Fig. 31a). El número de larvas pequeñas fue significativamente mayor en las jaulas control que en las jaulas con liberación de individuos irradiados en los tres picos ($F_{1,41} = 7,45$ $P = 0,0093$; $F_{1,41} = 5,29$ $P = 0,027$; $F_{1,56} = 4,11$ $P = 0,047$; respectivamente). Hubo diferencias significativas entre fechas en todos los picos ($F_{1,41} = 23,46$ $P < 0,0001$; $F_{1,41} = 10,62$ $P = 0,0022$; $F_{1,56} = 4,84$ $P = 0,032$; respectivamente) (Fig. 31b). El número de larvas grandes fue significativamente diferente entre tratamientos en los primeros dos picos ($F_{1,13} = 72,93$ $P < 0,0001$; $F_{1,26} = 9,01$ $P = 0,0059$; respectivamente). No hubo diferencias entre fechas en el segundo pico ($F_{1,26} = 1,72$ $P = 0,20$). En el tercer pico, el número de larvas grandes fue significativamente diferente entre fechas y marginalmente diferente entre tratamientos ($F_{1,41} = 7,56$ $P = 0,0088$; $F_{1,41} = 3,31$ $P = 0,076$; respectivamente) (Fig. 31c). Al final del ensayo, las plantas de tomate en las jaulas control tuvieron mayor cantidad de daño que en las jaulas donde se liberaron insectos irradiados debido al mayor número de larvas presentes en aquellas (Fig. 32).

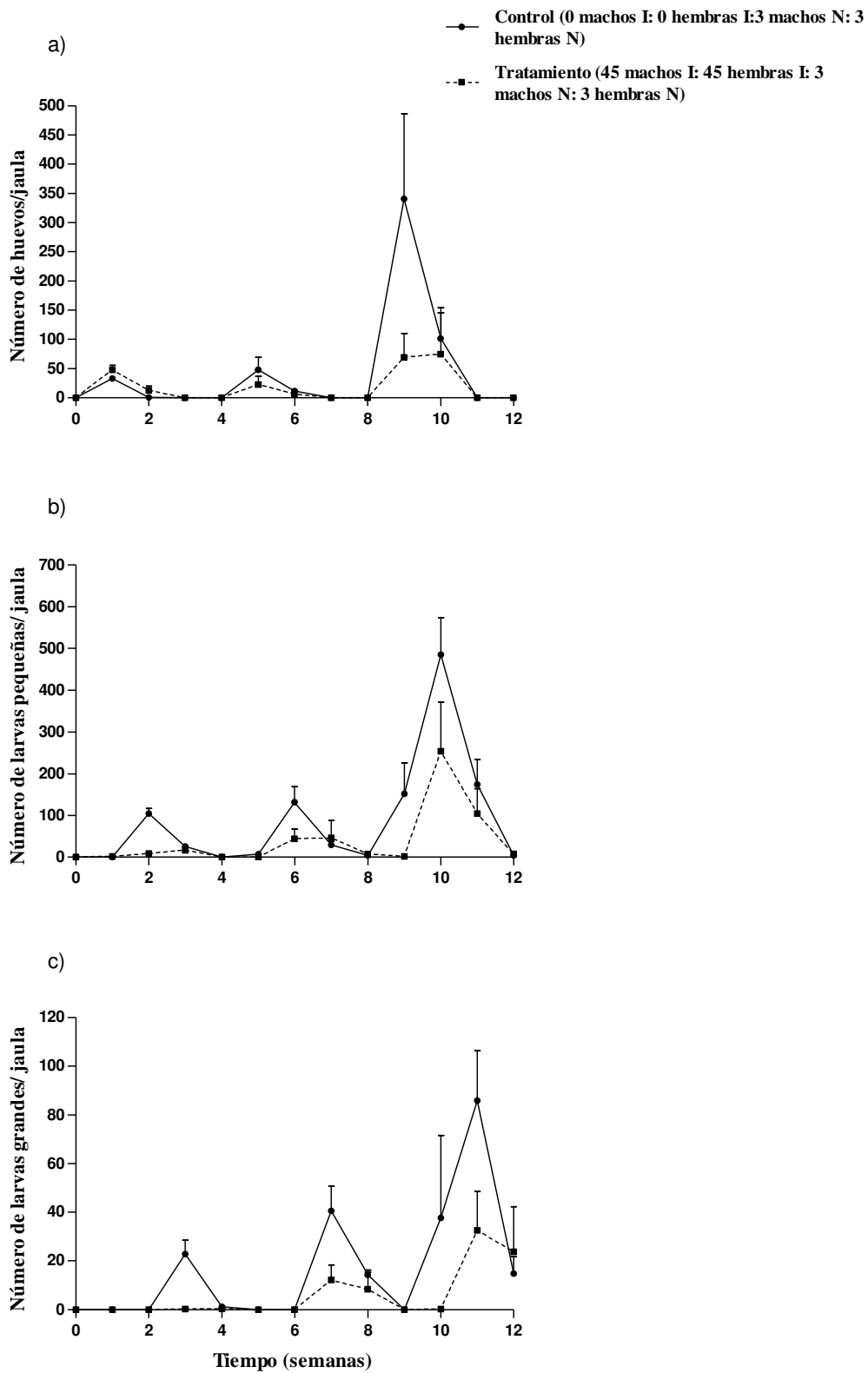


Figura 31. Ensayo 2. Supresión poblacional de una población silvestre de *T. absoluta* por individuos irradiados y su progenie a través del tiempo. a) Número de huevos. b) Número de larvas pequeñas. c) Número de larvas grandes.



Figura 32. Estado de las plantas al final del ensayo 2. a) Jaula con liberación de individuos irradiados b) Jaula control

3.4. DISCUSIÓN

Entre las plagas más devastadoras de los cultivos y bosques, se encuentran una gran cantidad de especies de lepidópteros, las cuales producen enormes pérdidas económicas. De allí, la gran importancia de hallar estrategias más eficientes, de bajos costos y que no generen daños al ambiente para hacer frente a estas plagas. La eficacia de la EH para reducir las poblaciones de los lepidópteros plagas ha sido demostrada en los programas operativos contra las polillas *P. gossypiella* en los Estados Unidos y *C. pomonella* en Canadá (Bloem et al. 2005).

Los resultados del ensayo de dispersión demuestran que los machos de *T. absoluta* irradiados con 200 Gy se dispersan. Si bien, no se midió que sucede a grandes distancias, en la práctica durante la aplicación de un programa de EH los individuos irradiados son liberados en varios puntos. Así, estaría asegurada una dispersión de los machos irradiados de la polilla del tomate al menos en un radio de aprox. 15 m durante 48-72 h. Si las liberaciones se hicieran como en el

caso de *C. pomonella* de forma continua a lo largo de la línea de cultivo o a lo largo de la línea de cultivo pero en varios puntos sucesivos, el resultado aquí presentado respecto a la dispersión de los machos irradiados es positivo.

Uno de los desafíos principales en un proyecto para aplicar la EH contra lepidópteros plagas es determinar una tasa efectiva de la relación polillas irradiadas liberadas/polillas silvestres. Esta indica el número de insectos irradiados que es necesario liberar para lograr la supresión de una población silvestre de una plaga. En los experimentos de jaulas realizados con la polilla del tomate, con ambas tasas de polillas irradiadas/polillas silvestres estudiadas (10:1 y 15:1), se observaron diferencias significativas en el número de huevos en el primer pico de postura entre los tratamientos. El mayor número de huevos depositado fue observado en las jaulas con individuos irradiados, resultado lógico considerando que allí se realizó la liberación de un mayor número de hembras que en las jaulas control. Sin embargo, en el segundo pico se obtuvo el resultado opuesto observándose un mayor número de huevos en las jaulas control comparado con las jaulas donde se habían liberado los individuos irradiados, resultado que podría adjudicarse a los efectos de la EH. El uso de una tasa de 10:1 (polillas irradiadas liberadas/polillas no tratadas) causó una declinación en la población larval en comparación con las jaulas control pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas probablemente debido a la alta variabilidad en los datos. Sin embargo, un pequeño incremento en la tasa de polillas irradiadas liberadas/polillas no tratadas (15:1) mejoró estas diferencias. En este caso, el número de larvas pequeñas y grandes en las jaulas donde se realizaron las liberaciones de los individuos irradiados fue significativamente menor que en las jaulas control a través de las tres generaciones estudiadas. Estos resultados indicarían que los machos subestériles fueron tan competitivos como los machos silvestres para copular con las hembras silvestres, y exitosos para producir una progenie F1 estéril con lo cual se logró reducir el crecimiento de la población silvestre en el tiempo. Las hembras estériles de *T. absoluta* liberadas en las jaulas tratamiento probablemente cumplieron un rol crítico en la disminución de la población larval dentro de estas jaulas, a través de su acción como un sumidero de esperma fértil. Esto es, las hembras irradiadas al competir con las hembras fértiles por

los machos, remueven de esta forma el limitado esperma fértil del sistema. Esto fue demostrado por Hight *et al.* (2005) en ensayos de supresión poblacional con *C. cactorum* realizados en jaulas de campo, donde en algunas se liberaron únicamente machos estériles y en otras machos y hembras estériles, logrando mayor supresión poblacional en estas últimas. Existe amplia evidencia experimental documentada que sugiere que la liberación de hembras estériles desempeña un papel fundamental en la supresión poblacional de los lepidópteros plagas cuando se utiliza la EH (Guerra *et al.* 1974, White *et al.* 1976, Van Steenwyk *et al.* 1979, Bloem y Carpenter 2001, Hight *et al.* 2005).

Para otros lepidópteros plagas, ha sido observado que tasas (polillas irradiadas liberadas/polillas no tratadas) inferiores a 15:1 produjeron una reducción significativa en la población de la polilla silvestre en jaulas de campo experimentales. Una tasa tan baja como 5:1 alcanzó para suprimir poblaciones silvestres de *C. cactorum*, *P. operculella* y *P. xylostella* en jaulas de campo (Nguyen Thi y Nguyen Thanh 2001, Saour 2004, Hight *et al.* 2005). Para la especie *Conopomorpha sinensis* Bradley (Lepidoptera: Gracillariidae) un ensayo con jaulas de campo mostró que la liberación de machos adultos irradiados a la tasa 10:1 (tratados/no tratados) podría controlar efectivamente una población natural de esta plaga (Hu *et al.* 2012). Por otro lado, liberaciones de individuos irradiados de *P. gossypiella* con una tasa de 20:1 en jaulas de campo, causó una reducción significativa de la población silvestre de esta plaga (Ahmad *et al.* 2002). Las diferencias observadas entre distintas especies de polillas plagas en la tasa de insectos irradiados liberados/insectos silvestres que es necesaria para alcanzar la supresión de sus poblaciones, pueden ser explicadas por diferencias en las características intrínsecas de las especies (reproducción, longevidad, daño producido, etc.).

En la mayoría de los estudios a campo abierto donde se evaluó el potencial de la EH para controlar lepidópteros plagas, las tasas de individuos irradiados/individuos no tratados necesarias para alcanzar la supresión poblacional son mucho más altas que aquellas observadas en los estudios de jaulas de campo (mayor a 60:1 para *P. gossypiella*, 40:1 para *C. pomonella*, 100:1 para *T. anartoides*) (Bloem *et al.* 2005). Si bien los ensayos efectuados con *T. absoluta* fueron realizados en jaulas, los resultados indicarían que una

relación 15:1 de individuos irradiados respecto de silvestres podría tomarse como base y que podría esperarse que varias liberaciones a esa tasa o a tasas algo mayores produjeran una reducción de las poblaciones silvestres en un cultivo de tomate. Esto debería validarse en condiciones reales de cultivo.

La EH es una técnica altamente específica, dado que su blanco es el sistema reproductivo de la plaga cuando esta se está reproduciendo sexualmente. Previo a la liberación de los insectos esterilizados, podría requerirse la aplicación de técnicas suplementarias con el fin de reducir las poblaciones silvestres de la plaga a niveles frente a los cuales los insectos estériles liberados tendrían una ventaja numérica para inducir la esterilidad (Mangan 2005). De esta forma se alcanzarían las tasas de insectos esterilizados/insectos silvestres efectivas, sin necesidad de liberar un número demasiado alto de insectos estériles producidos en crías masivas. En general, los programas de liberación de insectos estériles exitosos fueron aplicados cuando las poblaciones silvestres de las plagas estuvieron a bajas densidades.

Ha sido ampliamente sugerido que el potencial total de la EH para controlar lepidópteros plagas podría ser alcanzado cuando la EH es combinada con otros métodos de control (Knipling 1992, Carpenter 1993, 2000). El uso de la EH es compatible con el uso de otros métodos como el cultural, la confusión sexual, el uso de bioplaguicidas y el control biológico mediante liberaciones de parasitoides o predadores (Carpenter 2000, Dyck *et al.* 2005). En los próximos capítulos se presentará el estudio de la compatibilidad entre el uso de la EH y el CB para el control de *T. absoluta*.

3.5. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados de los experimentos presentados en este capítulo, se sugiere que con varias liberaciones de individuos irradiados de *T. absoluta* a una proporción igual o mayor que 15:1 podría esperarse una reducción en una población silvestre de *T. absoluta* en un cultivo de tomate. Investigaciones futuras bajo condiciones de cultivo en invernáculo o a campo son necesarias para probar esta proposición.

Capítulo IV

Integración de la Esterilidad Heredada con el uso de *Trichogramma* spp. para controlar *Tuta absoluta*

4.1. INTRODUCCIÓN

El uso intensivo de plaguicidas, además de impactar negativamente sobre el ambiente, ha generado la aparición de poblaciones de *T. absoluta* resistentes a varios principios activos de productos recomendados en América del Sur (Salazar y Araya 1997, Siqueira *et al.* 2000, Lietti *et al.* 2005). Dada esta situación, se han propuesto otros métodos de control de bajo impacto ambiental contra *T. absoluta*, tales como el control biológico mediante el empleo de parasitoides o predadores, la captura masiva de polillas mediante el empleo de trampas de feromonas y el uso de genotipos de plantas de tomate resistentes (de Oliveira *et al.* 2008, Oliveira *et al.* 2009, 2012, Desneux *et al.* 2010, Castro Antonio *et al.* 2011).

Los parasitoides de huevos de la familia Trichogrammatidae han sido empleados exitosamente en todo el mundo en control biológico inundativo de lepidópteros plagas (Hassan 1993, Smith 1996, Agamy 2010, Desneux *et al.* 2010, Tabone *et al.* 2010). En el caso de *T. absoluta*, estos parasitoides han sido utilizados en algunos países de América del Sur como Brasil, Chile y Colombia (Pintureau *et al.* 1999, Parra y Zucchi 2004, Bueno 2005, Faria *et al.* 2008, Andrade *et al.* 2011) y en países recientemente invadidos, como por ejemplo, Francia y España. En estos últimos países, actualmente *T. achaeae* es comercializado y su eficacia como agente de control biológico de *T. absoluta* continúa siendo evaluada en ensayos de laboratorio y de campo (Chailleux *et al.* 2012, 2013, Cabello *et al.* 2012).

Trichogramma nerudai (Pintureau y Gerding) fue encontrado parasitando naturalmente huevos de la polilla del tomate en Chile (Zucchi y Querino 2000). La biología y el uso de *T. nerudai* como parasitoide de huevos de lepidópteros plagas fueron estudiados detalladamente por Zhang y Hassan (2000), Estay y Bruna (2002), Botto *et al.* (2004), Tezze y Botto (2004) y Horny (2009). *T. pretiosum*, ha sido usado en control biológico de *T. absoluta* en varias regiones productoras de tomate en el noreste de Brasil y Chile (Benitez 2000, Pratissoli y Parra 2000). En Argentina, el uso de *T. bactrae* como potencial agente de control biológico de *T. absoluta* fue evaluado por Riquelme y Botto (2003a, b) y Riquelme (2009).

Como se ha mencionado previamente en esta tesis, la EH es una técnica de control de bajo impacto ambiental que ha sido estudiada y utilizada para la supresión de poblaciones de lepidópteros plagas (Carpenter *et al.* 2005). Existe evidencia teórica y experimental que sugiere que el potencial total de la EH para controlar lepidópteros plagas podría ser alcanzado cuando la EH es combinada con otros métodos de control, de forma de conseguir un efecto aditivo o sinérgico (Knipling 1992, Carpenter 1993, 2000, Bloem y Carpenter 2001, Carpenter *et al.* 2005). Así, el uso de la EH tiene muchas ventajas, pues además de ser especie específica, es compatible con el uso de otros métodos de control tales como el cultural, la confusión sexual, el uso de bioplaguicidas y el control biológico mediante liberaciones inundativas de parasitoides como *Trichogramma* spp. o predadores (Carpenter 2000, Dyck *et al.* 2005).

La utilización de la EH para el control de lepidópteros plagas implica que se esterilizan y liberan machos y hembras, de esta forma todos los tipos de cópulas podrían ocurrir en el campo, incluyendo aquellos que involucran polillas irradiadas (Knipling 1992, Bloem y Bloem 2000). Las hembras irradiadas depositan huevos no viables en el campo, los cuales podrían servir como huéspedes para parasitoides del género *Trichogramma*, cuya progenie F1 podría parasitar huevos depositados por la población silvestre remanente de la polilla remanente.

El objetivo de este capítulo fue:

- i. Evaluar la aceptación por parasitoides tricogramátidos de los huevos producidos por individuos irradiados de *T. absoluta* y la adecuación de estos huevos para el desarrollo de los parasitoides.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Colonias de insectos

El trabajo de investigación fue realizado en el Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica (IILB), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), CICVyA- INTA (Castelar, Buenos Aires, Argentina). Los individuos de *T. absoluta*, *T. nerudai*, y *T. pretiosum* empleados en los experimentos correspondientes a este capítulo fueron obtenidos de las colonias mantenidas

en el laboratorio. El procedimiento para la cría de la polilla del tomate fue descrito en el capítulo I (materiales y métodos: a) colonias de insectos).

Con respecto a los parasitoides, *T. pretiosum* y *T. nerudai* han sido criados desde 2000 y 2003, respectivamente, sobre huevos de la polilla de los cereales *S. cerealella*, de acuerdo al procedimiento de producción estandarizada propuesto por Hassan (1997) (Fig. 33). Las colonias fueron mantenidas en una cámara de cría con las condiciones ambientales controladas a 22-25 °C y 50-70 % de humedad relativa. El parasitoide *T. nerudai* es haplo-diploide y por lo tanto, produce progenie masculina a partir de huevos no fertilizados. Por su parte, la cepa de *T. pretiosum* criada en el laboratorio es telitoca (partenogenética), por lo tanto, la progenie producida es hembra.

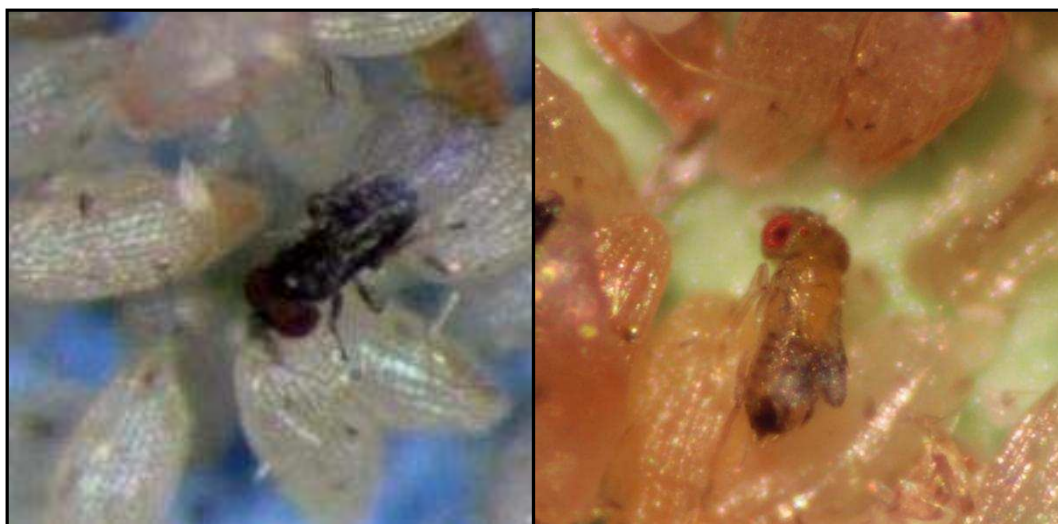


Figura 33: a) adulto de *T. nerudai* y b) adulto de *T. pretiosum*

4.2.2. Aparato de rayos X

El aparato de rayos X con el cual se irradiaron las pupas de *T. absoluta* fue descrito en materiales y métodos del capítulo I.

4.2.3. Experimentos de no elección

En estudios de parasitismo con parasitoides oófagos, un experimento de no elección consiste en ofrecer un solo tipo de huevo al parasitoide hembra. De esta forma se evalúan dos aspectos, primero, si en condiciones extremas el parasitoide es capaz de aceptar el material ofrecido para oviponer (aceptación) y, segundo, si este material es adecuado para el desarrollo del parasitoide (adecuación). La aceptación por *T. nerudai* y *T. pretiosum* de los huevos de *T. absoluta* provenientes de parejas con uno de los individuos irradiados fue evaluada en experimentos de no elección. En estos experimentos también se estudió la adecuación de esos huevos para el desarrollo de *T. nerudai* y *T. pretiosum*. Cada una de las especies de *Trichogramma* fue estudiada en experimentos separados. Ambos ensayos fueron realizados en una cámara con las condiciones ambientales controladas a $25\pm 2^\circ\text{C}$, 35-69% humedad relativa y fotoperiodo 14L: 10O. La temperatura y la humedad de las cámaras fueron registradas con un termohigrómetro digital (TFA) modelo 30.5003 (Dostmann GmbH & Co.KG, Germany).

Pupas de *T. absoluta* fueron separadas por sexo como se indicó en el capítulo I. Luego, se colocaron en cajas de Petri (1,5 cm de altura y 5 cm de diámetro) y se irradiaron 48-72 h previas a la emergencia de los adultos. La dosis de radiación (mínima- máxima) utilizada fue 198,73-200 Gy. Esta fue la dosis seleccionada como óptima para generar EH en *T. absoluta* (capítulo I de esta tesis).

Después de la irradiación, los adultos de *T. absoluta* que emergieron fueron separados en parejas de acuerdo con los siguientes cruzamientos: $\sigma_N \times \varphi_N$ (control), $\sigma_I \times \varphi_N$ y $\sigma_N \times \varphi_I$ (donde σ_N = macho no tratado, φ_N = hembra no tratada, σ_I = macho irradiado y φ_I = hembra irradiada). Cada una de las parejas fue colocada en una jaula cilíndrica de acetato (24,5 cm de altura y 7.5 cm de diámetro) que contenía una planta de tomate (Fig. 34).



Figura 34. Jaulas de acetato donde se colocaron las parejas de *T. absoluta* individualmente

Luego de 24-48 h de exposición, los huevos colocados por las hembras fueron colectados con un pincel fino para ser utilizados en los estudios de parasitismo. Cuarenta huevos ($n= 40$) obtenidos de diferentes parejas de un mismo tipo de cruzamiento fueron transferidos a la superficie de un folíolo de tomate con la ayuda de una lupa estereoscópica (Fig. 35). Luego, cada folíolo con los huevos de la polilla fue colocado en un tubo de vidrio (10 cm de largo, 1,5 cm de ancho) (Fig. 36). No se utilizaron huevos provenientes del cruzamiento $\sigma_1 \times \rho_1$ en este ensayo debido a que las ρ_1 depositan un número reducido de huevos y se decidió dar prioridad al estudio de los huevos provenientes del cruzamiento $\sigma_N \times \rho_1$.



Figura 35. Disposición de los 40 huevos de *T. absoluta* sobre el folíolo de tomate



Figura 36. Tubo de vidrio donde se colocó el foliolo con los huevos de *T. absoluta* y se expusieron al parasitoide

Los huevos fueron expuestos a una hembra naive del parasitoide recién emergida, y apareada solo en el caso de *T. nerudai*. Para cada tipo de cruzamiento descrito previamente ($\text{♂}_N \times \text{♀}_N$, $\text{♂}_I \times \text{♀}_N$, $\text{♂}_N \times \text{♀}_I$), se realizaron entre 10-19 réplicas para cada una de las especies de parasitoides estudiadas. En el caso de *T. nerudai*, los huevos de *T. absoluta* utilizados fueron < 48 h de edad. En cambio, en el caso de *T. pretiosum* los huevos fueron < 24 h de edad debido a que estos parasitoides parasitan los huevos recién depositados (con menor grado de desarrollo embrionario que los que parasita *T. nerudai*) (Pratissoli y Parra 2000, Horny 2009). La cantidad de huevos expuesta a los

parasitoides (n= 40) fue elegida debido a que es mayor a la capacidad que tiene la hembra de ambas especies para parasitar huevos en 24 h (Pratissoli y Parra 2000, Horny 2009).

Después de 24 h de exposición, las hembras parasitoides fueron removidas de los tubos de vidrio. Los folíolos de tomate con los huevos de *T. absoluta* que habían sido expuestos a esas hembras fueron incubados durante 15 días. Esto fue para permitir el desarrollo completo de los parasitoides en los huevos parasitados. Estos fueron mantenidos en una cámara con las condiciones ambientales controladas mencionadas anteriormente. Las larvas de *T. absoluta* que emergieron de los huevos que no fueron parasitados fueron removidas de los folíolos para evitar que consumieran y dañaran el tejido vegetal. Los parasitoides que no pudieron emerger de los huevos parasitados, después del tiempo de incubación, fueron considerados muertos.

Para cada origen de los huevos de *T. absoluta* (tipo de cruzamiento parental) estudiado se registraron los siguientes parámetros:

- Parasitismo: expresado como la cantidad de huevos de *T. absoluta* que fueron parasitados (reconocibles por la coloración negra de los huevos de *T. absoluta* que indica la presencia del parasitoide en estado pupal) (Fig. 37).
- Proporción de emergencia de parasitoides adultos: expresada como la cantidad total de parasitoides adultos emergidos/total de huevos parasitados.
- Proporción sexual (sólo para *T. nerudai*): expresada como la cantidad total de parasitoides hembras F1 emergidas/total de parasitoides adultos emergidos.
- Tiempo de desarrollo del parasitoide desde huevo hasta adulto

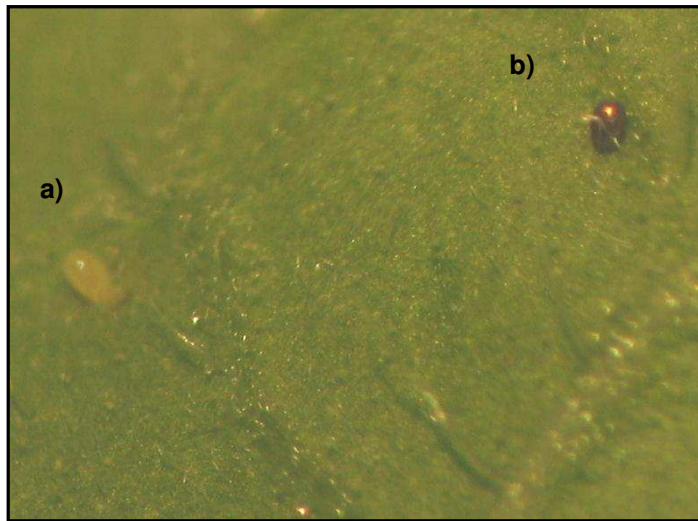


Figura 37. Huevos de *T. absoluta*. a) Huevo normal (sin parasitar) y b) huevo parasitado

La aceptación de los huevos de *T. absoluta*, provenientes de los distintos tipos de cruzamientos, por la hembra de las dos especies de parasitoides fue estimada por el parasitismo (cantidad de huevos parasitados). La adecuación de estos huevos para el desarrollo de cada una de las especies de *Trichogramma* fue estimada por la proporción de emergencia de los parasitoides adultos. El tiempo de desarrollo del parasitoide y la proporción sexual fueron considerados como otros estimadores de la adecuación de los huevos.

En el caso de *T. nerudai*, el parasitismo, la proporción de emergencia de parasitoides adultos y la proporción sexual fueron analizadas con un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), donde el tipo de cruzamiento fue considerado como fuente de variación. Debido a que los datos de tiempo de desarrollo no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza, se analizaron con una prueba de Kruskal Wallis considerando el tipo de cruzamiento como fuente de variación. En el caso de *T. pretiosum*, la proporción de emergencia de parasitoides adultos y el tiempo de desarrollo fueron analizados con un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), teniendo en cuenta el tipo de cruzamiento como fuente de variación. Debido a que los datos de parasitismo no cumplieron los supuestos de normalidad y

homogeneidad de la varianza, fueron analizados con una prueba de Kruskal Wallis con tipo de cruzamiento como fuente de variación. Todos los análisis mencionados se realizaron en Statistica para Windows (Statsoft 2000).

4.2.4. Experimentos de elección

Para estudiar la preferencia en el parasitismo de parasitoides oófagos, se realizan experimentos de elección donde se ofrece a la hembra del parasitoide más de un tipo de huevo. En estos experimentos, se evaluó si existe preferencia en ambas especies de *Trichogramma* por huevos de *T. absoluta* procedentes de padres no irradiados o por huevos de padres donde la hembra o el macho fueron irradiados.

Cada una de las especies de *Trichogramma* fue estudiada en experimentos separados. Estos fueron realizados en una cámara con las condiciones ambientales controladas a 25 ± 2 °C, 50-65% HR y fotoperiodo 14L: 10º.

Para obtener los huevos de *T. absoluta* necesarios para realizar estos ensayos fue seguido un procedimiento similar al descrito para el experimento de no elección. En este caso, las hembras parasitoides recién emergidas, y solo en el caso de *T. nerudai* previamente apareadas, fueron expuestas a 80 huevos de *T. absoluta*, 40 provenientes del cruzamiento $\sigma_N \times \phi_N$ y los otros 40 procedentes de uno de los dos cruzamientos con un individuo irradiado ($\sigma_I \times \phi_N$ o $\sigma_N \times \phi_I$). Los huevos utilizados fueron < 48 h de edad para *T. nerudai* y < 24 h para *T. pretiosum* y se colocaron con un pincel sobre un folíolo de tomate previamente dividido en cuatro cuadrantes. Cada cuadrante tuvo 20 huevos. Los huevos del mismo tipo de cruzamiento se colocaron en cuadrantes opuestos. Cada folíolo con los huevos fue colocado en un tubo de vidrio (10 cm de largo, 1,5 cm de ancho) y expuesto a un parasitoide hembra naive durante 24 h.

En el caso de *T. nerudai* se realizaron 24 réplicas cuando las opciones fueron huevos de los cruzamientos $\sigma_N \times \phi_N$ y $\sigma_I \times \phi_N$, y 11 réplicas cuando las opciones fueron huevos de los cruzamientos $\sigma_N \times \phi_N$ y $\sigma_N \times \phi_I$. En el caso de *T. pretiosum* se realizaron 10 réplicas para cada una de las dos combinaciones de huevos estudiadas. Se registró el parasitismo como el total de huevos

parasitados (de color negro) para cada tipo de origen de los huevos ofrecidos a los parasitoides.

Los datos fueron analizados mediante una prueba t con el programa Statistica para Windows (Statsoft 2000).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Experimentos de no elección

Trichogramma nerudai

El tipo de cruzamiento parental del cual procedieron los huevos de *T. absoluta* ofrecidos a los parasitoides influyó significativamente en el número de huevos parasitados ($F=9,06$ $df=2$ $P=0,0004$) (Tabla 4) (Fig. 37). Los huevos provenientes del cruzamiento parental $\text{♂}_N \times \text{♀}_I$ fueron significativamente menos parasitados que aquellos de los cruzamientos $\text{♂}_N \times \text{♀}_N$ y $\text{♂}_I \times \text{♀}_N$.

El origen de los huevos parasitados afectó la proporción de emergencia de parasitoides adultos ($F= 5,43$ $df=2$ $P=0,008$) (Tabla 4). La emergencia de huevos parasitados del cruzamiento $\text{♂}_N \times \text{♀}_I$ fue significativamente menor que aquella observada en los huevos parasitados de los cruzamientos $\text{♂}_N \times \text{♀}_N$ y $\text{♂}_I \times \text{♀}_N$. En todos los casos donde hubo emergencia, solo un parasitoide emergió de cada uno de los huevos parasitados. No hubo diferencias significativas en la proporción sexual entre los tratamientos ($F= 1,36$ $df=2$ $P=0,27$) (Tabla 4). El tiempo de desarrollo de los parasitoides desde huevo hasta adulto no fue afectado por el tipo de cruzamiento parental de donde procedieron los huevos de *T. absoluta* ($H=0,43$ $P=0,74$) (Tabla 4).

La proporción (media \pm EE) de eclosión de los huevos de *T. absoluta* del cruzamiento $\text{♂}_N \times \text{♀}_N$ fue $0,30 \pm 0,06$; del cruzamiento $\text{♂}_I \times \text{♀}_N$ fue $0,12 \pm 0,03$ y para los huevos de $\text{♂}_N \times \text{♀}_I$ fue $0,004 \pm 0,004$.

Tabla 4. Efecto de la procedencia (cruzamiento parental) de los huevos de *T. absoluta* sobre el parasitismo de *T. nerudai* en el experimento de no elección (media \pm EE).

Cruzamiento parental	Huevos parasitados*	<i>Trichogramma nerudai</i>		
		Prop. emergencia adultos*	Tiempo de desarrollo**	Proporción sexual*
$\text{♂}_N \times \text{♀}_N$ (n=19)	21,21 \pm 1,71a	0,93 \pm 0,02a	10,44 \pm 0,12a	0,38 \pm 0,07a
$\text{♂}_I \times \text{♀}_N$ (n=19)	19,84 \pm 2,44a	0,86 \pm 0,06a	10,44 \pm 0,11a	0,32 \pm 0,07a
$\text{♂}_N \times \text{♀}_I$ (n=14)	8,14 \pm 2,634b	0,59 \pm 0,12b	10,29 \pm 0,18a	0,53 \pm 0,09a

N=no tratado, I=irradiado

Medias seguidas por letras distintas dentro de la misma columna son significativamente diferentes (P<0,05).

*(ANOVA)

** (Kruskal Wallis)

Trichogramma pretiosum

El número de huevos parasitados no fue significativamente afectado por el tipo de cruzamiento parental (H= 0,55 P= 0,75) (Tabla 5) (Fig. 38). Además, el origen de los huevos parasitados no afectó la proporción de emergencia de parasitoides adultos (F= 0,77 df=2 P= 0,47) ni el tiempo de desarrollo de los parasitoides (F= 0,75 df= 2 P= 0,49) (Tabla 5).

La proporción (media \pm EE) de eclosión de los huevos de *T. absoluta* del cruzamiento $\text{♂}_N \times \text{♀}_N$ fue 0,29 \pm 0,05; del cruzamiento $\text{♂}_I \times \text{♀}_N$ fue 0,12 \pm 0,03 y para los huevos de $\text{♂}_N \times \text{♀}_I$ fue 0.



Figura 38. *T. pretiosum* parasitando huevos de *T. absoluta*

Tabla 5. Efecto de la procedencia (cruzamiento parental) de los huevos de *T. absoluta* sobre el parasitismo de *T. pretiosum* en el experimento de no elección (media \pm EE).

Cruzamiento parental	Huevos parasitados**	<i>Trichogramma pretiosum</i>	
		Prop. emergencia de adultos*	Tiempo de desarrollo*
♂ _N X ♀ _N (n=10)	4,30 \pm 1,07a	0,34 \pm 0,14a	12,67 \pm 0,33a
♂ _I X ♀ _N (n=16)	6,31 \pm 1,47a	0,54 \pm 0,10a	12,22 \pm 0,22a
♂ _N X ♀ _I (n=10)	4,30 \pm 1,44a	0,45 \pm 0,13a	12,40 \pm 0,25a

N=no tratado, I=irradiado

Medias seguidas por letras iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

*ANOVA

**Kruskal Wallis

4.3.2. Experimentos de elección

Trichogramma nerudai

En el experimento de elección, los parasitoides hembras parasitaron un número similar de huevos del cruzamiento $\sigma_N \times \varphi_N$ y del cruzamiento $\sigma_I \times \varphi_N$ ($t = -0,03$ $df = 23$ $P = 0,97$) (Tabla 6). También las cantidades de huevos parasitados de los cruzamientos $\sigma_N \times \varphi_N$ y $\sigma_N \times \varphi_I$ fueron similares ($t = 0,55$ $df = 10$ $P = 0,59$) (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del experimento de elección con *T. nerudai* (media \pm EE).

Cruzamiento parental	N	Huevos parasitados*	Huevos parasitados total / réplica
1) $\sigma_N \times \varphi_N$	24	8,83 \pm 1,20	17,71 \pm 3,56
vs. $\sigma_I \times \varphi_N$		8,88 \pm 1,79	
2) $\sigma_N \times \varphi_N$	11	10,64 \pm 2,84	19,81 \pm 4,77
vs. $\sigma_N \times \varphi_I$		9,18 \pm 2,59	

N=no tratado, I=irradiado

*Para cada combinación de huevos (1 y 2) los valores de las medias no son significativamente diferentes (t-test, $P > 0,05$).

Trichogramma pretiosum

Los parasitoides hembras no mostraron preferencia por ninguno de los dos tipos de procedencia de los huevos de *T. absoluta* que les fueron ofrecidos, en las dos combinaciones de huevos estudiadas: $\sigma_N \times \varphi_N$ vs. $\sigma_I \times \varphi_N$ ($t = 1,47$ $df = 9$ $P = 0,17$) y $\sigma_N \times \varphi_N$ vs. $\sigma_N \times \varphi_I$ ($t = 0,20$ $df = 9$ $P = 0,84$) (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del experimento de elección con *T. pretiosum* (media \pm E).

Cruzamiento parental	N	Huevos parasitados*	Huevos parasitados total / réplica
1) $\sigma_N \times \varphi_N$	10	3,80 \pm 1,41	5,4 \pm 1,67
vs. $\sigma_I \times \varphi_N$		1,60 \pm 0,72	
2) $\sigma_N \times \varphi_N$	10	3,70 \pm 1,26	7,10 \pm 2,15
vs. $\sigma_N \times \varphi_I$		3,40 \pm 1,34	

N=no tratado, I=irradiado

*Para cada combinación de huevos (1 y 2) los valores de las medias no son significativamente diferentes (t-test, $P > 0,05$).

4.4. DISCUSION

La aceptación del huésped es un aspecto muy importante en el comportamiento reproductivo de los parasitoides oófagos (van Alphen y Jervis 1996). Según Murray *et al.* (2010), en todo estudio de control biológico los parasitoides deberían ser sometidos a ensayos de no elección y elección de potenciales huéspedes, acompañados de estudios comportamentales, para la correcta interpretación de los resultados y determinación del rango de huéspedes. Los experimentos de laboratorio presentados en este capítulo fueron realizados para estudiar si los huevos provenientes de adultos irradiados de *T. absoluta* podrían afectar el comportamiento de *T. nerudai* y *T. pretiosum*, respecto a la aceptación de los huevos para ser parasitados y a su adecuación para el desarrollo de los parasitoides.

En el ensayo de no elección, los huevos de la polilla del tomate obtenidos a partir de parejas formadas por la hembra no tratada y el macho irradiado fueron aceptados para la oviposición y adecuados para el desarrollo de *T. nerudai*. Sin embargo, la aceptación y la adecuación de los huevos depositados por las hembras irradiadas fueron significativamente menores que las de los huevos provenientes de parejas no tratadas. Se observó una reducción del 60 % en el parasitismo de huevos colocados por hembras irradiadas respecto a los huevos procedentes de las hembras normales cruzadas con machos normales. En todo evento de oviposición, las avispas hembras evalúan muchas claves de los potenciales huéspedes, tales como tamaño, olor, forma y calidad interna, para decidir dónde colocar sus huevos (van Alphen y Jervis 1996). Sin embargo, no se conoce con certeza de qué modo la irradiación de una polilla hembra en estado de pupa puede afectar a los huevos que esta deposita, respecto de su posterior aceptación por un parasitoide y su adecuación para el desarrollo de este.

En la bibliografía se menciona que en los lepidópteros, como consecuencia de la irradiación de pupas hembras maduras, se podría interrumpir el curso normal de la meiosis incluyendo la segregación de los cromosomas. Además, como consecuencia de la irradiación también se producen efectos perjudiciales secundarios en los oocitos, los cuales cuando son normales tienen una gran

cantidad de citoplasma que contiene muchos de los componentes requeridos para el desarrollo embrionario (Carpenter *et al.* 2005). En base a estos conocimientos y suponiendo que las claves externas de los huevos de *T. absoluta* no hubieran sido afectadas por la irradiación de la hembra, se podrían sugerir dos explicaciones de la disminución del parasitismo de *T. nerudai*, que estarían relacionadas a la calidad interna de los huevos. En primer lugar, los parasitoides podrían haber detectado una calidad interna de los huevos de la hembra irradiada inadecuada (ausencia de componentes requeridos para el desarrollo embrionario por efecto de la irradiación) y, como consecuencia directa, haber parasitado en menor medida estos huevos respecto a los huevos normales. La otra posible explicación es que los parasitoides carezcan de esta capacidad para percibir diferencias en la calidad interna de los huevos, y que el registro de un parasitismo menor en los huevos depositados por las hembras irradiadas se deba a limitaciones de la metodología empleada para detectar si hubo o no parasitismo, a las pocas horas de la exposición de los huevos al parasitoide. En este caso, huevos parasitados pero en los que el desarrollo embrionario abortó poco tiempo después del evento de la oviposición no habrían sido registrados, resultando en el conteo de un menor número de huevos negros por la presencia del parasitoide en estado de pupa. En este último escenario, podría sugerirse que los parasitoides aceptaron los huevos de la hembra irradiada para parasitarlos debido a que fueron incapaces de detectar la calidad interna inadecuada de estos huevos. La irradiación no afectaría entonces a la aceptación por *T. nerudai* de los huevos de la hembra irradiada pero sí a la adecuación de estos huevos para el desarrollo del parasitoide.

Frente a estos resultados, se ve necesario realizar futuros estudios que contemplen el reconocimiento de huevos parasitados por *Trichogramma* spp. a las pocas horas del evento de oviposición. Esto permitiría comprender qué factores conducen a la respuesta de la hembra de *T. nerudai* a los huevos depositados por hembras irradiadas de *T. absoluta*.

Por otro lado, la emergencia del parasitoide adulto, su tiempo de desarrollo y la proporción sexual registradas en un experimento sin elección también determinan si un huésped es adecuado o no para el desarrollo de un

parasitoide (Carpenter *et al.* 1996, Van Driesche y Murray 2004, Desneux *et al.* 2009, Botto y Glaz 2010, Murray *et al.* 2010). En el ensayo se observaron altas proporciones de emergencia de los adultos de *T. nerudai* en todos los tratamientos, aunque la emergencia en huevos provenientes de hembras irradiadas fue reducida aproximadamente un 34 % comparada a los huevos normales. Esto indicaría que el desarrollo del parasitoide fue afectado por los huevos depositados por las hembras irradiadas de *T. absoluta*, sugiriendo que la adecuación de estos huevos para el desarrollo del parasitoide no es tan buena como la de aquellos colocados por las hembras no tratadas. El tiempo de desarrollo de *T. nerudai* y la proporción sexual fueron similares independientemente de la procedencia de los huevos evaluados.

A pesar de las diferencias observadas en el parasitismo y la emergencia del parasitoide adulto entre los huevos de los diferentes tipos de cruzamientos, se podría sugerir que, en general, todos ellos fueron aceptados para la oviposición y adecuados para el desarrollo de *T. nerudai*.

Los resultados obtenidos respecto al parasitismo de *T. nerudai* sobre huevos de *T. absoluta* producidos por parejas con uno de sus miembros irradiados, fueron similares a aquellos encontrados por otros autores para otros sistemas plaga-parasitoide (Carpenter *et al.* 1996, 2004, Saour 2004, Botto y Glaz 2010). Botto y Glaz (2010) observaron que los huevos producidos por hembras de *C. pomonella* esterilizadas con rayos gamma fueron aceptados para parasitismo y adecuados para el desarrollo de *T. nerudai*, aunque la aceptación de estos huevos por *Trichogramma cacoeciae* (Marchal) fue significativamente menor respecto de huevos normales. Carpenter *et al.* (2004) encontró que huevos de *C. leucotreta* fueron significativamente menos parasitados por *Trichogrammatoidea cryptophlebiae* Nagaraja (Hymenoptera: Trichogrammatidae) cuando la hembra de *C. leucotreta* del cruzamiento parental había sido irradiada. En otra especie de la familia Gelechiidae, *P. operculella*, los huevos depositados por hembras irradiadas a 300 Gy también fueron significativamente menos parasitados que huevos procedentes de padres no tratados por tres especies del género *Trichogramma* (Saour 2004).

En el ensayo de elección, *T. nerudai* no mostró preferencia para parasitar huevos de *T. absoluta* procedentes de padres no irradiados o de padres con la

hembra o el macho irradiados. Si bien los huevos colocados por hembras irradiadas podrían tener una menor calidad para la aceptación y el desarrollo del parasitoide según las pruebas de no elección, ante la posibilidad de elegir las hembras del parasitoide no eligieron ningún tipo de huevo. Este resultado es consistente con observaciones comportamentales realizadas bajo lupa que demostraron que las hembras de *T. nerudai* muestran similar actividad de parasitismo sobre los huevos de cruzamientos de individuos no tratados o de cruzamientos con uno de los individuos irradiados. El tiempo asignado a tamborileo y oviposición fue equivalente entre los tratamientos. El tamborileo es el comportamiento mediante el cual el parasitoide hembra examina el huésped potencial, moviendo las antenas hacia arriba y hacia abajo sobre la superficie del huevo.

A semejanza de estas observaciones, en otros estudios con parasitoides de huevos de lepidópteros no se encontró preferencia por la progenie de parejas no irradiadas o parejas con uno de los individuos irradiados (Mannion *et al.* 1994, 1995, Zhang y Cossentine 1995, Carpenter *et al.* 1996). Este resultado es positivo desde el punto de vista de la integración exitosa de la EH y el control biológico mediante el uso de parasitoides, ya que esta requiere que los parasitoides no elijan entre los dos tipos de huevos (viables o no viables). No obstante, para este sistema en particular sería interesante realizar futuros ensayos de elección en arenas experimentales de mayor tamaño para evitar la posibilidad de “falsos positivos”, frecuentemente encontrados en estudios con parasitoides debido a que en arenas pequeñas se crea un efecto de confusión en el enemigo natural (Van Driesche y Murray 2004).

Con respecto a la otra especie de *Trichogramma* estudiada, más allá del origen de los huevos (individuos no tratados o irradiados), *T. pretiosum* no mostró diferencias significativas en el número de huevos parasitados, la emergencia de los parasitoides adultos y el tiempo de desarrollo. Esta diferencia con *T. nerudai* indica que las claves presentes o ausentes (dado que se desconoce el mecanismo) en los huevos producidos por las hembras irradiadas que afectaron el parasitismo de *T. nerudai* no estarían afectando el parasitismo de *T. pretiosum*. Esta especie tampoco mostró preferencia por huevos de *T. absoluta* de ninguno de los cruzamientos de procedencia.

Cabe mencionar que los valores de parasitismo de *T. pretiosum* obtenidos en estos experimentos son consistentes con aquellos obtenidos en otros experimentos donde los huevos de *T. absoluta* fueron expuestos en exceso a este parasitoide (Faria *et al.* 2008, Chailleux *et al.* 2012). Es notable que en esos trabajos así como en esta tesis, *T. pretiosum* tuvo menores valores de parasitismo y emergencia del adulto comparado a *T. nerudai*. Chailleux *et al.* (2012) encontraron que el nivel de parasitismo puede diferir enormemente entre diferentes especies de *Trichogramma* e incluso entre razas de la misma especie de *Trichogramma* cuando parasitan huevos de *T. absoluta*. Estos autores comentan que el bajo parasitismo registrado para algunas especies de *Trichogramma* podría ser atribuido a dos factores: el tamaño pequeño de los huevos de *T. absoluta* y la alta susceptibilidad a los trichomas de las plantas de tomate (Romeis *et al.* 1999, Kennedy 2003, Kauffman y Kennedy 1989, Kashyap *et al.* 1991). Estos factores podrían afectar en mayor medida a *T. pretiosum* en comparación con *T. nerudai*. Además Chailleux *et al.* (2012) encontraron que las características del huésped original y la de la planta hospedera son altamente influyentes en la eficiencia de los parasitoides del género *Trichogramma*. Esto también podría explicar el mayor parasitismo de *T. nerudai* comparado a *T. pretiosum* ya que el primero ha sido encontrado espontáneamente parasitando huevos de *T. absoluta* en el campo.

La EH es una técnica especie específica que es efectiva especialmente cuando se combina con otros métodos de control tales como confusión sexual, trapeo masivo, remoción del hábitat, resistencia de la planta huésped y control biológico (Bloem *et al.* 2005). Escenarios teóricos posibles en los cuales la EH y el control biológico podrían ser integrados para el control de lepidópteros plagas fueron propuestos por Carpenter *et al.* (1996, 2005). Carpenter *et al.* (2005) demuestran que es posible un efecto aditivo o sinérgico entre la EH y el empleo de enemigos naturales en el control de lepidópteros plagas. Además, varios estudios experimentales con otras especies de polillas demostraron la existencia de sinergismo entre ambas estrategias (Mannion *et al.* 1994, 1995, Carpenter *et al.* 1996, Bloem *et al.* 1998b, Cossentine y Jensen 2000, Wang *et al.* 2002).

Según Carpenter (1993) para que exista una combinación exitosa entre la EH y el CB en un manejo integrado de plagas, el enemigo natural no debe impactar negativamente sobre la progenie de los adultos irradiados más severamente que sobre la población silvestre de la plaga, y los insectos irradiados no deben impactar negativamente sobre la eficacia del enemigo natural. En el caso estudiado, los parasitoides no afectaron más a los huevos colocados por hembras irradiadas de *T. absoluta* o por hembras normales cruzadas con machos irradiados, que a los huevos provenientes de cruzamientos entre adultos no tratados. Por otro lado, la emergencia de parasitoides adultos de los huevos de la hembra irradiada parasitados no es tan alta como aquella de los huevos normales, así los huevos de la hembra irradiada contribuirían menos al crecimiento poblacional del parasitoide, respecto a los huevos normales. Sin embargo, debido a que la aplicación del CB mediante el uso de *Trichogramma* spp. se realiza de forma inundativa, la integración exitosa entre la EH y la liberación de *T. nerudai* podría ser posible para el control de *T. absoluta*.

4.5. CONCLUSIÓN

No existen datos experimentales previos acerca del potencial uso de la EH en *T. absoluta*, combinada con la liberación de *Trichogramma* spp. en una estrategia de manejo integrado de plagas. Estos ensayos proveen evidencia experimental que sugiere que la liberación inundativa de estos parasitoides combinada con el uso de la EH puede ser practicable, y posiblemente más efectiva que cualquiera de estas dos técnicas usada sola para el control de esta plaga.

Capítulo V

Integración de la Esterilidad Heredada con un predador para controlar *Tuta absoluta*

5.1. INTRODUCCIÓN

Una gran diversidad de predadores ha sido encontrada en asociación con lepidópteros plagas de cultivos hortícolas y forestales. Sin embargo, no existen trabajos en los cuales se haya investigado la combinación de la EH y el CB mediante el uso de predadores para el control de lepidópteros plagas. En este capítulo se plantea el objetivo inédito de estudiar la combinación de estas dos técnicas para el control de *T. absoluta* usando un predador de huevos de esta plaga.

Como se mencionó anteriormente, combinando la EH con el CB se logran efectos aditivos o sinérgicos en el control de lepidópteros plagas (Knipling 1992, Carpenter 1993, 2000, Bloem y Carpenter 2001, Carpenter *et al.* 2005). Por lo tanto, se espera que con el empleo combinado de un predador y la EH para el control de la polilla del tomate, se alcancen mejores niveles de supresión poblacional que con el uso de cualquiera de estos métodos por separado. Al igual que para la combinación de la EH con el CB utilizando parasitoides oófagos, para una integración exitosa entre la EH y la liberación de un predador el impacto negativo del enemigo natural no debe ser mayor sobre la progenie de los individuos irradiados que sobre la población silvestre de la plaga. A su vez, la liberación de los insectos irradiados no debe impactar negativamente sobre la eficacia del enemigo natural (Carpenter 1993). Un escenario negativo podría darse en caso de que el predador prefiera marcadamente los huevos (presas), procedentes de los adultos irradiados de la plaga que son liberados en el campo.

En Europa donde *T. absoluta* ha ingresado recientemente 15 especies de artrópodos fueron registradas predando sobre esta polilla. En general, estos predadores son chinches zoofitófagas, que usualmente colonizan cultivos con estrategias de manejo integrado de plagas o estrategias de manejo orgánico. Allí se establecen y desarrollan sus poblaciones previo al arribo de *T. absoluta*, explotando presas alternativas como moscas blancas, trips, ácaros, áfidos, minadores y otros lepidópteros (Desneux *et al.* 2010). Las dos especies de mayor dispersión en cultivos de tomate europeos son los predadores míridos *N. tenuis* y *M. pygmaeus*. Ambos se han observado consumiendo activamente

sobre huevos y larvas de diferentes estadios de *T. absoluta* (Arnó *et al.* 2009, Mollá *et al.* 2009, Urbaneja *et al.* 2009).

En los países de América del Sur, se han realizado escasos trabajos sobre los predadores de huevos y larvas de la polilla del tomate, en comparación con el vasto conocimiento que ha sido generado acerca del parasitismo de las especies del género *Trichogramma* sobre los huevos de *T. absoluta*. En Brasil se ha registrado la presencia de los siguientes predadores de huevos y larvas de *T. absoluta*: *Cycloneda sanguinea* L. (Coleoptera: Coccinellidae), Staphylinidae, *Orius* sp. y *Xylocoris* sp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), Formicidae (Hymenoptera) y Phlaeothripidae (Thysanoptera). También se han encontrado algunos predadores de pupas y adultos como *Pyemotes* sp. (Acari: Pyemotidae) (Miranda *et al.* 2005, de Oliveira *et al.* 2007, Vivian *et al.* 2002, 2003, Torres *et al.* 2002). *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) ha demostrado ser un buen predador de larvas de *T. absoluta* bajo ensayos de laboratorio (Carneiro y Medeiros 1997). En Venezuela, *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) ha sido registrado como un predador importante de huevos y larvas de la polilla del tomate por Salas (1995). En Chile, Vargas (1970) ha mencionado que *Nabis* sp. (Heteroptera: Nabidae), *Polistes* sp. (Hymenoptera: Vespidae) y las arañas son predadores de *T. absoluta* hallados en campos de cultivos de tomate.

En Argentina, recientemente, la chinche *Tupiocoris cucurbitaceus* (Spinola) (Hemiptera: Miridae) ha sido encontrada en cultivos de tomate en invernáculos infestados con *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) (del Pino *et al.* 2009). Este mírido prefiere desarrollarse sobre plantas pilosas, especialmente Solanaceae y Cucurbitaceae, cuyas superficies proveen mayor protección y suficiente disponibilidad de agua a los huevos que son insertados en el tejido vegetal (Agustí y Gabarra 2009, Ingegno *et al.* 2011). Al igual que otros míridos, *T. cucurbitaceus* es principalmente una chinche predadora, aunque también ha sido registrada su fitofagia (Carpintero 1998, Ohashi y Urdampilleta 2003). Se encuentra frecuentemente asociada con moscas blancas en el campo pero también es predadora de huevos de *T. absoluta* (López *et al.* 2012). Ha sido demostrado que la chinche *T. cucurbitaceus* es un

agente de control biológico potencial contra *T. absoluta*, siendo la hembra la que muestra el mayor consumo (López *et al.* 2012).

El objetivo de este capítulo fue:

- I. Evaluar si los huevos producidos por individuos irradiados de *T. absoluta* son adecuados como presas para la chinche *T. cucurbitaceus*

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Colonias de insectos

El trabajo de investigación fue realizado en el Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica (IILB), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), CICVyA- INTA (Castelar, Buenos Aires, Argentina). Los individuos de *T. absoluta* y *T. cucurbitaceus*, empleados en los experimentos correspondientes a este capítulo fueron obtenidos de las colonias mantenidas en el laboratorio. El procedimiento para la cría de la polilla del tomate fue descrito en el capítulo I (materiales y métodos: a) colonias de insectos).

Los adultos y las ninfas de *T. cucurbitaceus* fueron originalmente coleccionados en cultivos de tomate en invernáculos localizados en La Plata, provincia de Buenos Aires, en 2009. La especie fue identificada por Diego Carpintero del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Buenos Aires, Argentina, y especímenes *voucher* fueron preservados en la colección del IILB. Acorde a la bibliografía existente sobre la cría de míridos (Agustí y Gabarra 2009), estas chinches fueron criadas sobre plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y alimentadas con huevos de *S. cerealella*, sistema que demostró ser adecuado para la multiplicación del predador.

5.2.2. Aparato de rayos X

El aparato de rayos X con el cual se irradiaron las pupas de *T. absoluta* fue descrito en materiales y métodos del capítulo I.

5.2.3. Estudios con *T. cucurbitaceus*

Los ensayos fueron realizados con la hembra de *T. cucurbitaceus*, dado que es el estado y sexo más voraz de la especie (López *et al.* 2012) (Fig. 39b). Para obtener los adultos hembras de *T. cucurbitaceus* necesarias para realizar los ensayos, ninfas del último estadio (V) fueron tomadas al azar de la cría (Fig. 39a). Estas fueron aisladas individualmente en tubos de vidrio y solo se les proporcionó agua mediante un algodón húmedo por un período de 24 h, hasta la emergencia del adulto. Tanto las ninfas como los adultos fueron mantenidos en una cámara con las condiciones ambientales controladas hasta su uso en los ensayos (25 ± 2 °C, 50-80% HR y fotoperiodo 14L: 10O).



Figura 39: *T. cucurbitaceus* a) ninfa v, b) adulto hembra

5.2.3.1. Experimento de no elección

Se evaluó la predación de las hembras de *T. cucurbitaceus* sobre tres tipos de huevos de *T. absoluta*, procedentes de distintos cruzamientos (padres no irradiados o padres donde uno de los individuos progenitores fue irradiado).

Pupas de *T. absoluta* fueron separadas por sexo como se indicó en el capítulo I. Luego, se colocaron en cajas de Petri (1,5 cm de altura y 5 cm de diámetro) y se irradiaron 48-72 h previas a la emergencia de los adultos. La dosis de radiación (mínima- máxima) utilizada fue 198,73-200 Gy. Luego de la irradiación, los adultos emergidos fueron separados en parejas según los siguientes cruzamientos $\sigma_N \times \phi_N$ (control), $\sigma_I \times \phi_N$ y $\sigma_N \times \phi_I$ (donde $\sigma_N =$

macho no tratado, ♀_N = hembra no tratada, ♂_I = macho irradiado y ♀_I = hembra irradiada). Para obtener los huevos necesarios para realizar este experimento, cada una de las parejas de *T. absoluta* fue colocada individualmente en una jaula conteniendo una planta de tomate (similar a la descrita para los ensayos realizados en los capítulos previos). Los huevos depositados por las hembras de *T. absoluta* sobre las plantas de tomate fueron coleccionados con un pincel fino y empleados en los estudios de predación. Doscientos (200) huevos obtenidos de distintas parejas de *T. absoluta* pero de un mismo tipo de cruzamiento fueron transferidos sobre la superficie de un folíolo de tomate (3 x 2 cm aprox.) mediante el uso de una lupa estereoscópica.

Los folíolos fueron colocados en una caja de Petri (9 cm de diámetro y 1.5 cm de altura) sobre un papel de servilleta húmedo (Fig. 40) y ofrecidos a una hembra de *T. cucurbitaceus* (recién emergida y en condición de inanición por 24 h). Los huevos fueron expuestos a la chinche hembra durante 24 h.



Figura 40: Dispositivo utilizado en el ensayo de no elección

Después de la exposición, la cantidad de huevos predados (total o parcialmente) fue registrada usando una lupa estereoscópica. Los huevos consumidos se distinguen fácilmente debido a que luego de la predación se

observa el corion del huevo vacío o con restos del contenido interno cuando el consumo no es total (Fig. 41).



Figura 41: Huevo normal de *T. absoluta* y corion de huevo predado

Se realizaron 10-11 réplicas para cada tipo de presa (huevos provenientes de los diferentes cruzamientos). El experimento se llevó a cabo en una cámara con las condiciones ambientales controladas a 25 ± 2 °C, 44-80% HR y 14L:10O como fotoperiodo. Las condiciones ambientales fueron medidas con un termohigrómetro digital TFA modelo 30.5003 (Dostmann GmbH & Co.KG, Germany).

La cantidad de huevos predados fue analizada estadísticamente con un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con tipo de cruzamiento como fuente de variación en Statistica para Windows (Statsoft 2000).

5.2.3.2. Experimento de elección

Se estudió la preferencia de las hembras de *T. cucurbitaceus* por huevos de *T. absoluta* procedentes de cruzamientos entre individuos no irradiados o de cruzamientos con uno de los individuos irradiado. Los huevos de *T. absoluta* y las hembras del predador necesarios para realizar este ensayo se obtuvieron como fue descrito para el experimento de no elección.

En este ensayo, cada una de las hembras de *T. cucurbitaceus* tuvieron que elegir entre dos opciones de huevos diferentes. Estas chinches recién emergidas fueron expuestas, cada una de ellas a 400 huevos de *T. absoluta*, 200 del cruzamiento control ($\text{♂}_N \times \text{♀}_N$) y los restantes 200 de uno de los cruzamientos con uno de los individuos irradiados ($\text{♂}_I \times \text{♀}_N$ o $\text{♂}_N \times \text{♀}_I$). Los huevos (24-48 h de edad) fueron colocados con un pincel sobre un folíolo de tomate previamente dividido en cuatro cuadrantes. Cada cuadrante tuvo 100 huevos. En los cuadrantes opuestos se colocaron los huevos del mismo tipo de cruzamiento. Los folíolos fueron expuestos al mirido hembra durante 24 h dentro de una caja de Petri similar a la utilizada en el ensayo de no elección.

Se realizaron 10 réplicas para la combinación de huevos procedentes de los cruzamientos $\text{♂}_N \times \text{♀}_N$ y $\text{♂}_I \times \text{♀}_N$ y 8 réplicas para la combinación $\text{♂}_N \times \text{♀}_N$ y $\text{♂}_N \times \text{♀}_I$. Se registró la cantidad de huevos consumidos total y parcialmente.

El experimento se realizó en una cámara con las condiciones ambientales controladas a 25 ± 2 °C, 40-65% HR y 14L:10O como fotoperiodo. Los datos se analizaron usando una prueba de t con Statistica para Windows (Statsoft 2000).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Estudios con *T. cucurbitaceus*

5.3.1.1. Experimento de no elección

El número de huevos predados por *T. cucurbitaceus* no fue afectado por el origen de los huevos de *T. absoluta* (tipo de cruzamiento parental) ($F = 1,37$ df = 2 $P = 0,27$) (Fig. 42).

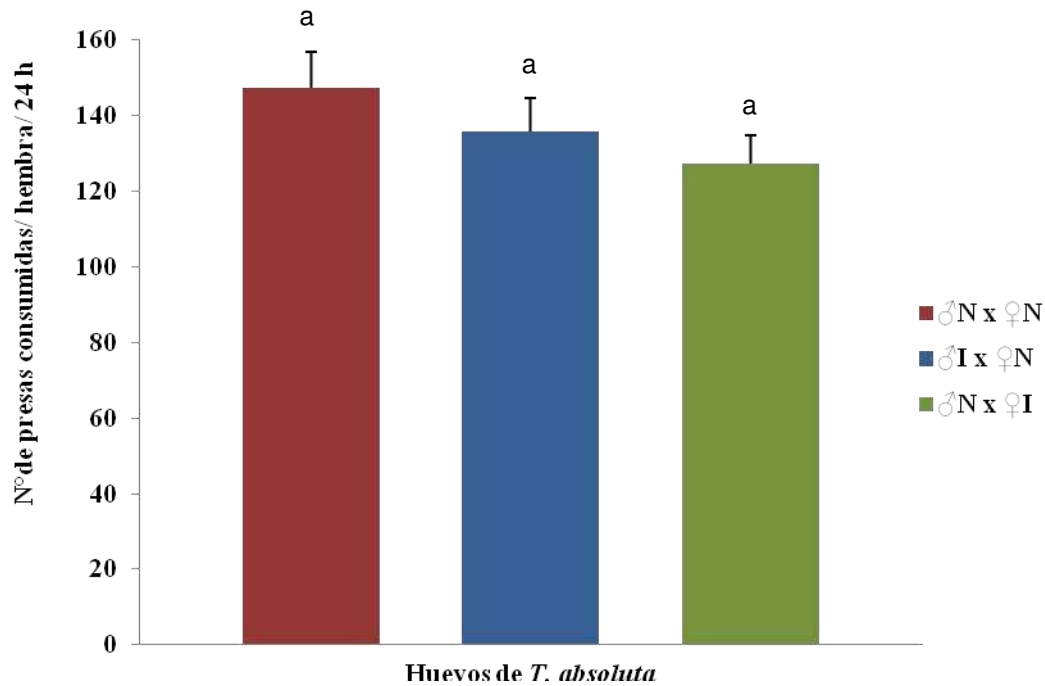


Figura 42. Consumo de presas por la hembra de *T. cucurbitaceus* (media \pm EE) en el experimento de no elección. Presas: huevos de *T. absoluta* de los cruzamientos ♂_N x ♀_N, ♂_I x ♀_N y ♂_N x ♀_I. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre tipos de presas (ANOVA, $P > 0.05$). N= no tratado, I= irradiado

5.3.1.2. Experimento de elección

En este ensayo, las chinches hembras predaron de modo similar los huevos procedentes de individuos no tratados y los provenientes de parejas con el macho irradiado ($t = 0,48$ $df = 9$ $P = 0,64$) (Fig. 43). Sin embargo, los huevos de hembras irradiadas fueron significativamente más consumidos que aquellos de hembras no tratadas ($t = -3,07$ $df = 7$ $P = 0,02$) (Fig. 44). El número (media \pm EE) de huevos de *T. absoluta* provenientes del cruzamiento ♂_N x ♀_N consumidos fue $77,25 \pm 5,01$ y el de hembras irradiadas fue $99,13 \pm 6,33$.

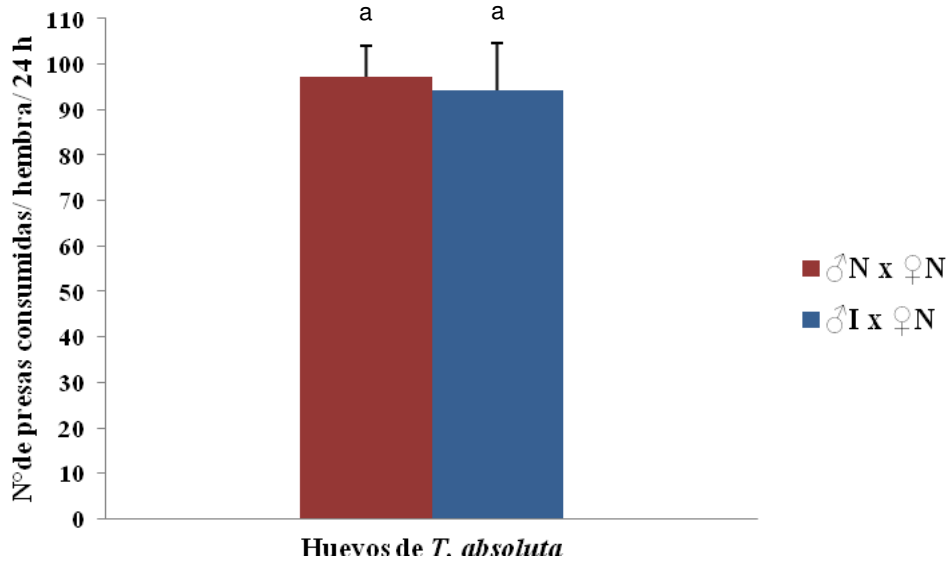


Fig. 43: Consumo de presas por *T. cucurbitaceus* (media \pm EE) en el experimento de elección. Presas: huevos de *T. absoluta* de los cruzamientos ♂_N x ♀_N y ♂_I x ♀_N. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre tipos de presas (t test, $P > 0.05$). N = no tratado, I = irradiado

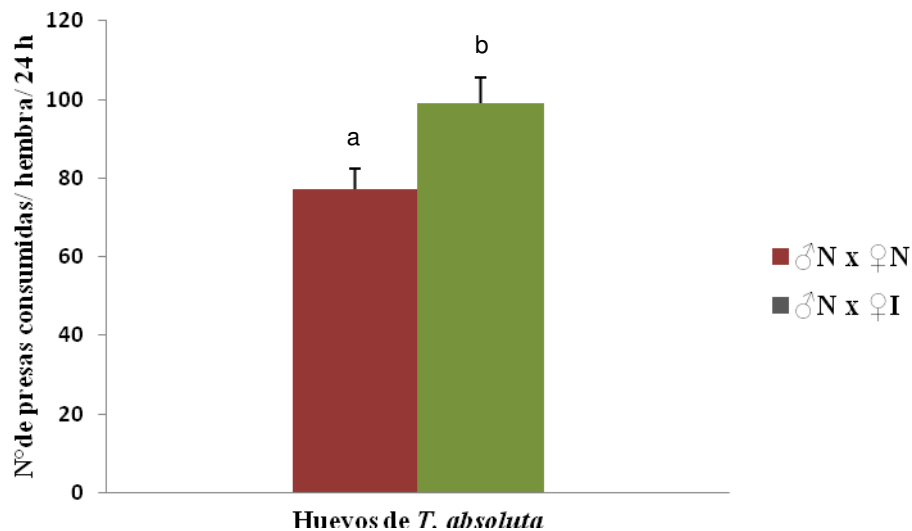


Fig. 44: Consumo de presas por *T. cucurbitaceus* (media \pm EE) en el experimento de elección. Presas: huevos de *T. absoluta* de los cruzamientos ♂_N x ♀_N y ♂_N x ♀_I. Las letras distintas indican que hubo diferencias significativas entre tipos de presas (t test, $P < 0.05$). N = no tratado, I = irradiado

5.4. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la premisa de que con la integración de la EH con otro método, por ejemplo el CB, se puede generar un efecto aditivo o sinérgico sobre el control de una plaga, se condujeron los ensayos de predación sobre huevos de la polilla del tomate con el predador *T. cucurbitaceus* en combinación con la EH. En el experimento de no elección se observó que las hembras de *T. cucurbitaceus* fueron capaces de consumir un número alto de huevos de *T. absoluta*, más allá del origen de ellos (hembras no tratadas o irradiadas). En el ensayo de elección, las hembras predaron de forma similar huevos provenientes de parejas no tratadas como de parejas donde el macho había sido irradiado. Sin embargo, *T. cucurbitaceus* predó significativamente más huevos procedentes de hembras irradiadas que aquellos de hembras no tratadas.

Los predadores, al igual que los parasitoides, siguen señales externas y otras asociadas a la calidad interna para la elección de sus presas. En relación con la calidad interna, una de las características que determina la preferencia del predador por algún tipo de presa es la calidad nutricional de la misma, ya que cuanto mayor es el valor nutritivo de esta, mayor es el *fitness* del predador (mayor supervivencia, fecundidad, etc.) (Eubanks y Denno 2000).

Hagler *et al.* (1992) encontraron que los predadores míridos consumen más huevos jóvenes que viejos y concluyeron que esto es debido al hecho de que los huevos jóvenes tienen mayor contenido de vitelo (menor desarrollo embrionario) que los huevos con mayor edad (mayor desarrollo embrionario). El vitelo es la principal fuente proteica en el huevo, y es consumido de manera constante y progresiva por el embrión en desarrollo. Debido a que los huevos de *T. absoluta* colocados por las hembras irradiadas con rayos X a 200 Gy son infértiles (resultado presentado en el capítulo I de la tesis) en ellos no se produce el desarrollo del embrión. Entonces, es probable que esos huevos contengan más vitelo que los huevos fértiles. De esta manera, estos huevos infértiles son una fuente de proteína para el predador y, por esta razón, podrían ser preferidos por la hembra de *T. cucurbitaceus*. Dado que no existe evidencia concreta de los elementos que son alterados en un huevo depositado por una

hembra irradiada, sería necesario clarificar este tema. Para esto se deberían desarrollar futuras investigaciones donde se analicen los niveles de vitelo y otros elementos nutritivos en los huevos de *T. absoluta* procedentes de cruzamientos entre individuos no irradiados y de parejas con la hembra o el macho irradiados.

Como se mencionó en el capítulo anterior, para que la integración de la EH y el CB sea exitosa, los enemigos naturales no deben impactar negativamente sobre la progenie de los individuos irradiados más que sobre la población silvestre de la plaga, y a la inversa, los individuos irradiados que se liberen no deben afectar la eficacia del enemigo natural. Por un lado, esto significa que los predadores no deberían alimentarse más de los huevos colocados por las hembras normales cruzadas con los machos irradiados que sobre los huevos provenientes de cruzamientos normales. Esto es debido a que la idea de usar la EH para el control de lepidópteros plagas es que sobrevivan los hijos del macho irradiado que son más estériles que este y se crucen con las hembras silvestres de la plaga. Entonces, la estrategia para controlar *T. absoluta* combinando la EH y el uso de *T. cucurbitaceus* parece ser posible, ya que en los ensayos presentados el predador consumió de forma similar huevos procedentes de cruzamientos entre individuos no tratados, y aquellos procedentes de los cruzamientos entre machos irradiados y hembras normales. De esta forma, el enemigo natural no estaría afectando a la progenie F1 del macho irradiado más que a la población silvestre de la plaga, y efectivamente, los efectos de la radiación generados sobre los machos parentales serían transmitidos a sus descendientes a través de la EH. Esta situación contribuiría positivamente a mejorar el nivel de control de *T. absoluta* utilizando ambos métodos. Por otro lado, el predador mostró preferencia por los huevos estériles colocados por las hembras irradiadas de *T. absoluta*, es decir, por aquellos huevos que no van a dejar descendencia pero si pueden servir para mantener la población del predador en el campo a niveles basales. Así, el predador aprovecharía estos huevos estériles como una fuente alimenticia extra, cuya energía podría ser usada para crecimiento del individuo o para aumentar su éxito reproductivo, esto sería traducido en un crecimiento del tamaño de la población del predador. Entonces, considerando estos resultados en conjunto

podría esperarse que el empleo del predador y la técnica de la EH sean compatibles y complementarios.

Independientemente del objetivo del ensayo, un dato relevante para destacar es que el número de huevos consumidos por *T. cucurbitaceus* fue mayor que aquellos registrados para los predadores europeos de huevos de lepidópteros *M. pygmaeus* y *N. tenuis* por Arnó *et al.* (2009), Urbaneja *et al.* (2009) y Chailleux *et al.* (2013).

5.5. CONCLUSIÓN

Basados sobre los resultados generales aquí presentados, sería factible combinar la EH con el uso de *T. cucurbitaceus* para el control de la polilla del tomate. Así, el enfoque de estrategias integradas para el control de plagas parece ser una herramienta prometedora para el control de las poblaciones silvestres de *T. absoluta*.

CONSIDERACIONES GENERALES Y CONCLUSIONES

Las demandas actuales del uso de productos inocuos para el ambiente en el manejo de organismos perjudiciales, hacen que la EH sea una importante alternativa de control contra lepidópteros plagas. Dadas las características propias de la EH, su uso para el control de lepidópteros plagas podría enmarcarse dentro de las tecnologías compatibles con el desarrollo de una agricultura sustentable. Los conocimientos básicos generados a lo largo de la ejecución de esta tesis permiten dar los pasos iniciales para el desarrollo de un protocolo de aplicación de la EH contra *T. absoluta*. Esto implica que la investigación aquí presentada se considere de relevancia para su integración con otras tecnologías de bajo impacto ambiental.

Se ha contribuido a la generación de conocimientos básicos acerca del efecto de la radiación X sobre parámetros biológicos de *T. absoluta*, siendo este el primer paso para un futuro desarrollo de la EH para el control de esta polilla. Además, en el contexto de un invernáculo experimental, se ha generado información sobre la capacidad de esta técnica para suprimir poblaciones silvestres de la polilla. Estos aportes son de importancia para pasar a evaluar el uso de la EH para control de la polilla a una escala mayor (estudios en cultivos comerciales de invernáculo y a campo).

Asimismo, los estudios donde se combinaron la EH y el control biológico (parasitoides o predadores), aportan información de utilidad para la posible integración de ambas técnicas en sistemas de MIP.

Los resultados obtenidos permiten arribar a las siguientes conclusiones generales:

- ✓ La aplicación de radiación (rayos X) sobre *T. absoluta* permite el desarrollo de la esterilidad heredada (EH).
- ✓ La exposición de pupas de *T. absoluta* a una dosis óptima de rayos X, permite obtener hembras totalmente estériles y machos parcialmente estériles con capacidad competitiva para el apareamiento respecto de machos silvestres.

- ✓ Los huevos producidos por hembras irradiadas de *T. absoluta* y por hembras no tratadas cruzadas con machos irradiados fueron aptos (aceptación/ adecuación) para parasitoides oófagos *Trichogramma* spp. y para el predador *T. cucurbitaceus*

- ✓ La integración de la EH y el CB para el control de la polilla del tomate es factible.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agamy, E. 2010. Field evaluation of the egg parasitoid, *Trichogramma evanescens* West. against the olive moth *Prays oleae* (Bern.) in Egypt. *J Pest Sci* 83:53–58
- Agresti, A. 1996. An introduction to categorical data analysis. Wiley & Sons, Inc. University of Florida, USA
- Agustí, N. y R. Gabarra. 2009. Puesta a punto de una cría masiva del depredador polífago *Dicyphus tamanii* Wagner (Hemiptera: Miridae). *Bol San Veg Plagas* 35: 205-218.
- Ahmad, N., M. Ashraf, y B. Fatima. 2001. Integration of mating disruption technique and parasitoids for the management of cotton bollworms. *Pak J Zool* 33:57–60.
- Ahmad, N., M. Ashraf, T. Hussain y Z. A. Qureshi. 2002. Feasibility of integrating radiation-induced F1 sterility and biological control for population suppression of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*, in Pakistan. In *Evaluation of Lepidoptera Population Suppression by Radiation Induced Sterility, Proceedings of a Final Research Coordination Meeting by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, 28 May-2 June 1998, Penang, Malaysia*, pp. 69-79. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria
- AL-Taweel, A. A., M. S. H. Ahmed, S. S. Kadhum y A. A. Hameed. 1990. Effect of gamma radiation on the progeny of irradiated *Ephesia cutella* males. *J. Stored Prod. Res.*, 26: 233-236.
- Altieri, M. A., C. I. Nicholls y M. S. Wolfe. 1996. Biodiversity- a central concept in organic agriculture: Restraining pests and diseases. En: *Fundamentals of Organic Agriculture. 11th IFOAM International Scientific Conference, Copenhagen. Proceedings Vol. 1*, pp: 91-112.
- Andrade, G. S., D. Pratisoli, L. P. Dalvi, N. Desneux y H. J. Gonçalves. 2011. Performance of four *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) as biocontrol agents of *Heliothis virescens*

- (Lepidoptera: Noctuidae) under various temperature regimes. *J Pest Sci* 84:313–320
- Anisimov, A. I. 1998. Computer simulations of population suppression by irradiated and mutant Lepidoptera pests, p. 35. In Book of Abstracts FAO/IAEA International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests Integrating the Sterile Insect and Related Nuclear and Other Techniques Penang, Malaysia, 28 May-2 June, 1998. IAEA-CN-71. 223 pp.
- Anisimov, A. I., N. V. Lazurkina y A. N. Shvedov. 1989. Influence of radiation induced genetic damage on the suppressive effect of inherited sterility in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 82: 769-777.
- Apablaza, J. 1992. La polilla del tomate y su manejo. *Tattersal* 79: 12–13
- Arnó, J., R. Sorribas, M. Prat, M. Matas, C. Pozo, D. Rodríguez, A. Garreta, A. Gómez y R. Gabarra. 2009. *Tuta absoluta*, a new pest in IPM tomatoes in the northeast of Spain. *IOBC/WPRS Bulletin*. 49: 203-208
- Arthur, V. 2004. Use of gamma radiation to control three Lepidopteran pests in Brazil. Irradiation as a phytosanitary treatment of food and agricultural commodities. In: Proceedings of the Final research coordination meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, 2002, Vienna, Austria, pp. 45-50
- Asturov, B. I. y S. L. Frolova. 1935. Artificial mutations in the silkworm (*Bombyx mori* L.). V. Sterility and spermatogenic anomalies in the progeny of irradiated moths concerning some questions of general biological and mutagenic action of X-rays. *Biologicheskii Zhurnal* 4: 861-894
- Ayvaz, A., S. Albayrak y A. S. Tunçbilek. 2007. Inherited sterility in Mediterranean flour moth *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae): Effect of gamma radiation on insect fecundity, fertility and developmental period. *J Stored Prod Res* 43: 234-239
- Bahamondes, L. A. y A. R. Mallea. 1969. Biología en Mendoza de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)

- especie nueva para la República Argentina. Rev. Fac. de Ciencias Agrarias 15: 96-104.
- Bakri, A., k. Mehta y D. R. Lance. 2005. Sterilizing insects with ionizing radiation. In: Dyck V. A., J. Hendrichs, A. S. Robinson (eds), Sterile Insect Technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management. Springer, Dordrecht, pp 233-268
- Barclay, H. J. 1987. Models for pest control: complementary effects of periodic releases of sterile pests and parasitoids. Theoretical Population Biology 32: 76-89.
- Barrientos, Z. R., H. J. Apablaza, S. A. Norero y P. P. Estay. 1998. Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Ciencia e Investigación Agraria 25: 133–137
- Bedo, D. G. 1984. Karyotypic and chromosome banding studies of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera, Gelechiidae). Can J Genet Cytol 26: 141-145
- Benitez, E. A. 2000. Levantamiento, identificación y cría de avispa parasitoides (*Trichogramma* spp.) con fines de uso en control biológico de plagas. Revista de Ciencia y Tecnología, Dirección de Investigaciones—UNA 1:15–19
- Berta, D. C. y M. V. Colomo. 2000. Dos especies nuevas de *Bracon* F. y primera cita para la Argentina de *Bracon lucileae* Marsh (Hymenoptera, Braconidae), parasitoides de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Insecta Mundi 14:211–219
- Bloem, S. y K. A. Bloem. 2000. SIT for codling moth eradication in British Columbia, Canada. In: Tan KH (ed), Area-wide control of fruit flies and other insect pest. Penerbirt University Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia, pp 207-214
- Bloem, S. y J. E. Carpenter. 2001. Evaluation of population suppression by irradiated Lepidoptera and their progeny. Fla Entomol 84: 165-170
- Bloem, S. y E. Spaltenstein. 2011. New Pest Response Guidelines Tomato Leafminer (*Tuta absoluta*). USDA/ARS. pp. 176

- Bloem, S., K. A. Bloem y A. L. Knight. 1998a. Assessing the quality of mass-reared codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) by using field release-recapture tests. *J. Econ. Entomol.* 91: 1122—1130.
- Bloem, S., K. A. Bloem y A. L. Knight. 1998b. Oviposition by sterile codling moths, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) and control of wild populations with combined releases of sterile moths and egg parasitoids. *J Entomol Soc BC* 95: 99–109
- Bloem, S., K. A. Bloem, J. E. Carpenter y C. O. Calkins. 1999. Inherited sterility in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): Effect of substerilizing doses of radiation on insect fecundity, fertility and control. *Ann Entomol Soc Am* 92: 222-229
- Bloem, S., K. A. Bloem, J. E. Carpenter y C. O. Calkins. 2001. Season-long releases of partially sterile males for control of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), in Washington apples. *Environ Entomol* 30: 763-769
- Bloem, S., J. E. Carpenter y J. H. Hofmeyr. 2003. Radiation biology and inherited Sterility in false codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J Econ Entomol* 96: 1724-1731
- Bloem, K. A., S. Bloem y J. E. Carpenter. 2005. Impact of moth suppression/eradication programmes using the sterile Insect Technique or Inherited Sterility In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS (eds) *Sterile insect technique principles and practice in area-wide integrated pest management*, Chap 7.3. Springer, Netherlands, pp 677-700
- Bompard, A., C. C. Jaworski, P. Bearez, y N. Desneux. 2013. Sharing a predator: can an invasive alien pest affect the predation on a local pest? *Popul Ecol* 55(3): 433-440.
- Boshra, S. A. 2007. Effect of high-temperature pre irradiation on reproduction and mating competitiveness of male *Sitotroga cerealella* (Olivier) and their F1 progeny. *J Stored Prod Res* 43: 73-78
- Botto, E. N. 1999. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. *Rev. Soc. Entomol. Arg.* 58(1-2): 58-64.
- Botto, E. N. y P. Glaz. 2010. Potential for controlling codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) in Argentina using the

- sterile insect technique and egg parasitoids. *J Appl Entomol* 134: 251-260
- Botto, E. N., S. Ceriani, E. Saini, C. Moneti, O. Jamaro y S. N. López. 1995. Estudios bioecológicos sobre la polilla del tomate, *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Resúmenes del III Cong. Arg. de Entomol. p.113.
- Botto, E. N., S. Ceriani, S. López, E. Saini, C. Cédola, G. Segade y M. Viscarret 2000. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. La experiencia argentina hasta el presente. *RIA* 29(1): 83-98
- Botto, E. N., C. Horny, P. Klasmer y M. Gerding. 2004. Biological studies on two neotropic egg parasitoids species: *Trichogramma nerudai* Pintureau and Gerding, and *Trichogramma* sp., (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biocontrol Sci Tech* 14:449-459.
- Botto, E., Garrido, S., Saez, T., Hernández C., Lafalce C., Cichón L. y D. Fernández. 2005. Evaluación de *Trichogramma* spp., (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para el control Biológico de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) en Alto Valle de Río Negro, Argentina. XXVII Congreso Nacional Entomología. Valdivia, Chile, 23-25 Noviembre, 2005. Libro Resúmenes. Pp. 44.
- Brower, J. H. 1979. Substerilizing irradiation of *Plodia interpunctella* males: effect on three filial generations. *Annals of the Entomological Society of America* 72: 716-720
- Brown, K. S., A. V. L. Freitas, N. Wahlberg, B. von Schoultz, A. O. Saura y A. Saura. 2007. Chromosomal evolution in the South American Nymphalidae. *Hereditas* 144:137-148
- Bueno, V.H. P. 2005. IPM and biological control of protected cropping in some developing greenhouse regions. *IOBC/WPRS Bulletin* 28:23-26.
- Bushland, R. C. 1971. Sterility principle for insect control: Historical development and recent innovations. In: *Sterility principle for insect control or eradication*, pp. 3-14. Vienna: Int. At. Energy Ag. 542 pp.
- Cabello, T., J. R. Gallego, F. J. Fernández, M. Gamez, E. Vila, M. del Pino y E. Hernández-Suárez. 2012. *Biological Control Strategies for the South*

- American Tomato Moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in Greenhouse Tomatoes. *J Econ Entomol* 105:2085-2096
- Cáceres, S. 1992. Control de la polilla del tomate en Corrientes. *Biología y control*. Boletín EEA INTA Bella Vista, Corrientes. 19p.
- Campos, R. G. 1976. Control químico del “minador de hojas y tallos de la papa” (*Scrobipalpa absoluta* Meyrick) en el valle del Cañete. *Rev Per Entomol* 19: 102–106
- Carabajal Paladino, L. Z., Ferrari M. E., Lauría J. P., Cagnotti C. L., Šíchová J. y López S. 2014. Impact of x-rays on cytological traits of *tuta absoluta* (Lepidoptera: gelechiidae). Enviado a *Fla Entomol*
- Cardozo, M. R., M. B. López, M. T. Evert, C. Palacio, S. Yasuda, H. Sugiyama, K. Mori, M. Kajita y T. Sato. 1994. Control integrado de la palomilla del tomate, *Scrobipalpa absoluta* (Meyrick, 1917). *Ins. Agr. Nac. CAACUPE*, Paraguay.
- Carneiro, J. R. y M. A. Medeiros. 1997. Potencial de consumo de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) utilizando ovos de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). In: Abstracts of Congresso Brasileiro de Entomologia 16: 117–118
- Carpenter, J. E. 1993. Integration of inherited sterility and other pest management strategies for *Helicoverpa zea*, pp. 363-370. *In Proc. Int. Symp. Management of insect pests: Nuclear and related molecular and genetic techniques*, IAEA/FAO, Vienna, Austria.
- Carpenter, J. E. 2000. Area-wide integration of lepidopteran F1 sterility and augmentative biological control. In: Tan, K.-H. (Ed.), *Area-wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests*. Penerbit University Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia, pp. 193–200
- Carpenter, J. E. y H. R. Gross. 1993. Suppression of feral *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations following the infusion of inherited sterility from released substerile males. *Environ Entomol* 22: 1084–1091
- Carpenter, J. E., J. R. Young y A. N. Sparks. 1986. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): comparison of inherited deleterious effects in progeny from irradiated males and females. *J Econ Entomol* 79: 47-49

- Carpenter, J. E., J. R. Young, A. N. Sparks, H. L. Cromroy y M. A. Chowdhury. 1987. Corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae): Effects of substerilizing doses of radiation and inherited sterility on reproduction. *J Econ Entomol* 80: 483-489
- Carpenter, J. E., Hidrayani y W. Sheehan. 1996. Compatibility of F1 sterility and a parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae), for managing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae): acceptability and suitability of hosts. *Fla Entomol* 79:289-295
- Carpenter, J. E., S. Bloem y K. A. Bloem. 2001. Inherited sterility in *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae). *Fla Entomol* 84: 537-542
- Carpenter, J. E., S. Bloem y J. H Hofmeyr. 2004. Acceptability and suitability of eggs of false codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from irradiated parents to parasitism by *Trichogrammatoidea cryptophlebiae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biol Cont* 30:351-359
- Carpenter, J. E., S. Bloem y F. Marec. 2005. Inherited sterility in insects. In: Dyck, V. A., J. Hendrichs, A. S. Robinson (eds.) *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* Chap 2.4. Springer, Netherlands, pp. 115-146
- Carpintero, D. L. 1998. Miridae. In *Biodiversidad de artrópodos Argentinos. Una perspectiva biotaxonomica*, eds. J.J. Morrone y S. Coscarón, Ediciones Sur, La Plata, Buenos Aires, Argentina, pp. 144-150.
- Castro Antonio, A., D. J. H. da Silva, M. C. Picanço, N. T. Santos y M. E. de Sena Fernandes. 2011. Tomato plant inheritance of antixenotic resistance to tomato leafminer. *Pesq Agropec Bras* 46:74-80
- Ceriani, S. A., E. Botto y O. Jaramo. 1994. *Trichogrammatoidea bactrae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Estudios sobre su potencial biológico para el control de la "polilla del tomate", *Scrobipalpuloidea absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). ANAIS: 4° SICONBIOL - EMBRAPA/CPACT. Pelotas, R. S. p.: 208.
- Chailleux, A., N. Desneux, N. Seguret, H. Do Thi Khanh, P. Maignet, y E. Tabone. 2012. Assessing European egg parasitoids as a mean of controlling the invasive South American tomato pinworm *Tuta absoluta*. *PLoS ONE* 7:e48068.

- Chailleux, A., P. Bearez, J. Pizzol, E. Amiens-Desneux, R. Ramírez-Romero y N. Desneux. 2013. Potential for combined use of parasitoids and generalist predators for biological control of the key invasive tomato pest *Tuta absoluta*. L. Pest Sci. 86 (3): 533-541.
- Coelho, M. C. F. de y F. H. Franca. 1987. Biologia, quetotaxia da larva e descricao da pupa e adulto da traca-do-tomateiro. Pesqui Agropecu Bras 22: 129-135
- Cook, P. A. y M. J. G. Gage. 1995. Effects of risks of sperm competition on the numbers of eupyrene and apyrene sperm ejaculated by the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). Behav. Ecol. Sociobiol. 36: 261-268.
- Cook, P. A. y N. Wedell. 1996. Ejaculate dynamics in butterflies: a strategy for maximizing fertilization success? Proc. R. Soc. London B. 263: 1047-1051.
- Cossentine, J. E. y L. B. M. Jensen. 2000. Releases of *Trichogramma platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in apple orchards under a sterile codling moth release program. Biol Cont 18:179-186
- Croft, B. A. 1990. Arthropod biological agents and pesticides. Wiley and Sons, New York
- De Bach, P. 1977. Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Ed. Continental, Mexico. 949 p.
- de Oliveira, A. C. R., V. R. S. Veloso, R. G. Barros, P. M. Fernandes y E. R. B. de Souza. 2008. Captura de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) com armadilha luminosa na cultura do tomateiro tutorado. Pesq Agrop Trop 38:153-157
- de Oliveira, C. R. F., C. H. C. Matos y E. Hatano. 2007. Occurrence of *Pyemotes* sp on *Tuta absoluta* (Meyrick). Braz Arch Biol Techn 50:929–932
- Del Pino, M., A. Polack, S. Gamboa, M. Massi y G. Peruzzi. 2009. *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae), aspectos poblacionales en relación al control de la mosca blanca de los invernáculos *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) y al cultivo de tomate bajo

- cubierta', in Proceedings of XXXII Congreso Argentino de Horticultura. ASAHO, Salta, Argentina. p. 75.
- Desneux, N., A. Decourtye y J. M. Delpuech. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52: 81–106
- Desneux, N., R. J. Barta, K. A. Hoelmer, K. R. Hopper y G. E. Heimpel. 2009. Multifaceted determinants of host specificity in an aphid parasitoid. *Oecologia* 160: 387–398
- Desneux, N., E. Wajnberg, K. A. G. Wyckhuys, G. Burgio, S. Arpaia, C. A. Narváez-Vasquez, J. González-Cabrera, D. Catalán Ruescas, E. Tabone, J. Frandon, J. Pizzol, C. Poncet, T. Cabello y A. Urbaneja. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J Pest Sci* 83:197-215
- Desneux N., M. G. Luna, T. Guillemaud y A. Urbaneja. 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J Pest Sci* 84: 403-408
- Dhouibi, M. H y C. T. Abderahmane. 2001. The effect of substerilizing doses of gamma radiation on the pupae of the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). In: Proceedings of the Symposium Evaluation of population, suppression by irradiated Lepidoptera and their progeny. FAO/IAEA Final Research Coordination Meeting, 28-30 May 1998. Penang, Malaysia, IAEA-D4-RC-561, pp. 43-48
- Dyck, V. A., J. Reyes Flores, M. J. B. Vreysen, E. E. Regidor Fernández, T. Teruya, B. Barnes, P. Gómez Riera, L. Lindquist y M. Loosjes. 2005. Management of area-wide integrated pest management programmes that integrate the sterile insect technique. In: Dyck V. A., Hendrichs J., Robinson A. S. (eds) Sterile insect technique principles and practice in area-wide integrated pest management, Chap 2.4. Springer, Netherlands, pp. 525–538.
- Estay, P. 2000. Polilla del Tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) 2010. [WWW document]. URL <http://alerce.inia.cl/docs/Informativos/Informativo09.pdf>.

- Estay, P. y A. Bruna. 2002. Insectos, ácaros y enfermedades asociadas al tomate en Chile. Ed. Instituto de Investigaciones Agropecuaria (INIA). La Platina, Chile. 111 p.
- Eubanks, M. D. y R. F. Denno. 2000. Health food versus fast food: the effects of prey quality and mobility on prey selection by a generalist predator and indirect interactions among prey species. *Ecol Entomol* 25(2): 140-146.
- Faria, C. A., J. B. Torres, A. M. V Fernandes y A. M. I. Faria. 2008. Parasitism of *Tuta absoluta* in tomato plants by *trichogramma pretiosum* Riley in response to host density and plant structures. *Ciencia Rural* 38:1504-1509
- Fernández Lozano, J. 2006. Boletín electrónico de Tomate, Boletín N°1. Mercado Central de Buenos Aires.
- Fernández, S. y A. Montagne. 1990. Biología del minador del tomate, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bol. Entomol. Venez.* 5(12): 89-99.
- Ferrari, M. E., C. L. Cagnotti, L. Z. Carabajal Paladino, J. L. Cladera, D. F. Segura, M. M. Viscarret y S. N. López. 2011. Impacto de la radiación en la espermatogénesis de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Pp. 155. *In Proceedings: XL Congreso Argentino de Genética*, 19-21 September 2011. Corrientes, Argentina.
- Folcia, A. 2013. Evaluación de *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera-Braconidae) como posible agente de control biológico de *Tuta absoluta* (Lepidoptera-Gelechidae), plaga clave del cultivo de tomate en los alrededores del Gran Buenos Aires. Tesis de doctorado. Buenos Aires. pp. 167
- Folcia, A. M., E. N. Botto y M. B. Riquelme. 2003. Biología de *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae) parasitoide de la polilla del tomate (*Tuta absoluta*). XXV Congreso Nacional de Entomología. 26 al 28 de Noviembre. Talca, Chile.
- Friedländer, M. 1997. Control of the eupyrene-apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera. *J. Insect Physiol.* 43: 1085-1092.

- Gage, M. J. G. y P. A. Cook. 1994. Sperm size or numbers- effects of nutritional stress upon eupyrene and apyrene sperm production strategies in the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Funct. Ecol.* 8: 594-599.
- García Roa, F. 2000. Control biológico de Plagas. Manual Ilustrado. Corpoica. Pp 95
- García, M. F. y J. C. Espul. 1982. Bioecología de la polilla del tomate (*Scrobipalpula absoluta*) en Mendoza, República Argentina. *Rev. Inv. Agrop. INTA.* 17(2): 135-145.
- Gassner, G. y D. J. Klemetson. 1974. A transmission electron microscope examination of hemipteran and lepidopteran gonial centromeres. *Can. J. Genet. Cytol.* 16: 457-464.
- Germain, J. F., A. I. Lacordaire, C. Cocquempot, J. M. Ramel y E. Oudard. 2009. Un nouveau ravageur de la tomate en France: *Tuta absoluta*. *PHM-Revue Horticole* 512: 37–41
- Guerra, A. A., R. D. García y H. H. de la Rosa. 1974. Suppression of populations of tobacco budworms cages with sterile females. *J Econ Entomol* 67: 333-334
- Gullan, P. J. y P. S. Cranston. 2000. *The Insects. An outline of entomology.* Blackwell Science, USA. 470 p.
- Haddi, K., M. Berger, P. Bielza, D. Cifuentes, L. M. Field, K. Gorman, C. Rapisarda, M. S. Williamson y C. Bass. 2012. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). *Insect Biochem Mol Biol* 42: 506–513
- Hagler, J. R., A. C. Cohen, D. B. Dunlop y F. J. Enriquez. 1992. Field evaluation of predation on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) using a species-and stage-specific monoclonal antibody. *Environ Entomol* 21: 896-900
- Hassan, S. A. 1993. The mass rearing and utilization of *Trichogramma* to control lepidopterous pests: achievements and outlook. *Pestic Sci* 37:387–391
- Heit, G., A. M. Folcia y G. Mareggiani. 2006. Respuesta de *Pseudapanteles*

- dignus* (Hymenoptera, Braconidae) frente a *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) en tomate. 1º Reunión Argentina de Parasitoidólogos Integrando Aspectos teóricos y Aplicados. Bariloche.
- Henneberry, T. J. y T. E. Clayton. 1988. Effects of gamma radiation on pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) pupae: adult emergence, reproduction, mating, and longevity of emerged adults and their F₁ progeny. *J Econ Entomol* 81: 322-326
- Hight, S.D., J. E. Carpenter, S. Bloem y K. A. Bloem. 2005. Developing a sterile insect release program for *Cactoblastis cactorum* (Berg) (Lepidoptera: Pyralidae): effective overflooding ratios and release-recapture field studies. *Environ Entomol* 34(4): 850-856
- Horny, C. 2009. Estudios taxonómicos, filogenéticos y biológicos en especies del género *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para su uso en control biológico. PhD thesis. Buenos Aires, 166 pp.
- Hu, M., M. Weng, Y. Deng y H. Fu. 2012. Inherited sterility (IS) stability of Litchi stem-end borer (*Conopomorpha sinensis* Bradley) and field cage trials to evaluate moth quality. Third Research Co-ordination Meeting within the FAO/IAEA Coordinated Research Programme held in Phoenix, USA from 12 to 16 September 2012. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/crp/2nd-rcm-efficiency-lepidoptera-2010.pdf>
- Ingegno, B. L., M. G. Pansa, y T. Tavella. 2011. Plant preference in the zoophytophagous generalist predator *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). *Biological Control* 58: 174-181
- Kashyap, R. K., G. G. Kennedy y R. R. Farrar. 1991. Behavioral-response of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Telenomus sphingis* (Ashmead) to trichome/methyl ketone mediated resistance in tomato. *J Chem Ecol* 17: 543–556.
- Kauffman, W. C. y G. G. Kennedy. 1989. Relationship between trichome density in tomato and parasitism of *Heliothis* spp (Lepidoptera, Noctuidae) eggs by *Trichogramma* spp (Hymenoptera, Trichogrammatidae). *Environ Entomol* 18: 698–704.

- Kean, J. M., A. E. A. Stephens, S. L. Wee, D. M. Suckling. 2007. Optimising strategies for eradication of discrete-generation Lepidopteran pests using inherited sterility. In: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J ed. Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp 603-615
- Kennedy, G. G. 2003. Tomato, pests, parasitoids, and predators: Tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annu Rev Entomol* 48: 51–72.
- Klassen, W. 2005. Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. In: Dyck, V. A., J. Hendrichs, J. y A. S. Robinson (eds.), Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management. Springer, The Netherlands. 39–68
- Knipling, E. F. 1964. The potential role of the sterility method for insect population control with special reference to combining this method with conventional methods. Serie 33-98. USDA/ARS, Washington, DC, USA
- Knipling, E. F. 1970. Suppression of pest Lepidoptera by releasing partially sterile males. A theoretical appraisal. *Bioscience* 20: 465-70.
- Knipling, E. F. 1979. The basic principles of insect population suppression and management, agricultural handbook, 512. USDA, Washington, DC.
- Knipling, E. F. 1992. Principles of Insect Parasitism Analyzed from New Perspectives: Practical Implications for Regulating Insect Populations by Biological Means, USDA ARS, Agricultural Handbook vol. 693, Washington, DC, p. 337
- Knipling, E. F. y W. Klassen. 1976. Relative efficiency of various genetics mechanisms for suppression of insect populations. U. S. Dep. Agric. Tech. Bull. 1533. 56 pp.
- Koudelová, J. y P. A. Cook. 2001. Effect of gamma radiation and sex-linked recessive lethal mutations on sperm transfer in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Fla. Entomol.* 84: 172-182.
- Krafsur, E. S. 1998. Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect population: 55 years and counting. *J. Agric. Entomol.* 15(4): 303-317.

- LaChance, L. E. 1967. The induction of dominant lethal mutations in insects by ionizing radiation and chemicals Ñas related to the sterile-male technique of insect control, pp. 617-650. In J. W. Wright, and R. Pal eds. Genetics of insect vectors of disease. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- LaChance, L. E. 1974. Dominant lethal mutations in insects with holokinetic chromosomes. 2. Irradiation of sperm of cabbage looper. *Annals of the Entomological Society of America* 67: 35–39.
- LaChance, L. E. 1985. Genetic methods for the control of the lepidopteran species: status and potential. U. S. Department of Agriculture, Washington, DC.
- LaChance, L. E. y C. K. Graham. 1984. Insect radiosensitivity: dose curves and dose fractionation studies of dominant lethal mutations in the mature sperm of 4 insect species. *Mutation Research* 127: 49–59.
- LaChance, L. E., C. H. Schmidt y R. C. Bushland. 1967. Radiation-induced sterilization. In: *Pest control: biological, physical, and selected chemical methods*, pp. 147-196. New York: Academic. 477 pp.
- LaChance, L. E., R. A. Bell y R. D. Richard. 1973. Effect of low doses of Gamma radiation on reproduction of male pink bollworms and their F1 progeny. *Environ Entomol* 2: 653-658.
- Landis, D. A., S. D. Wratten y G. M. Gurr. 2000. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review Entomology* 45: 175-201
- Larraín, P. S. 1986. Plagas del tomate. *IPA, La Platina* 39:30–35
- Lauría, J. P., Carabajal Paladino L. Z., Cagnotti C. L., Muntaabski I., Cladera J., y López S. N. 2012. Caracterización de los euespermatozoides transferidos por machos irradiados de *Tuta absoluta* (Lepidoptera). XLI Congreso Argentino de Génética. Rosario, provincia de Santa Fe. 28 al 31 de Octubre. Pág. 85
- Lauría, J. P., Carabajal Paladino L. Z., Cagnotti C. L., Cladera J. y López S. N. 2013. Análisis del esperma eupireno transferido por *Tuta absoluta* (Lepidoptera) durante la cópula. XLII Congreso Argentino de Génética. Salta, provincia de Salta. 20 al 23 de Octubre de 2013. Pág. 60

- Leite, L. D., M. Picanço, A. Alves Azevedo y A. H. Rocha Gonring. 1999. Efeito de tricomas, aleloquímicos e nutrientes na resistência de *Licopersycon hirsutum* á traça-do-tomateiro. *Pesq. Agropec. Brasileira* 34(11): 2059-2064.
- Lietti M. M., E. Botto y R. A. Alsogaray. 2005. Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop Entomol* 34:113-119
- López, E. 1991. Polilla del tomate: Problema crítico para la rentabilidad del cultivo de verano. *Empresa y Avance Agrícola* 1: 6–7
- López, S. N., F. Arce Rojas, V. Villalba Velásquez y C. L. Cagnotti. 2012. Biology of *Tupiocoris cucurbitaceus* (Hemiptera: Miridae), a predator of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato crops in Argentina. *Biocontrol, Science and Technology* 22: 1107- 1117
- Lukhtanov, V. A. 2000. Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera 464 (Insecta). *J Zoolog Syst Evol Res* 38:73-79
- Luna, M.G., N.E. Sánchez y P.C. Pereyra. 2007. Parasitism of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) by *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae) under Laboratory Conditions. *Environmental Entomology* 36 (4): 887-893.
- Luna, M. G., V. Wada y N. E. Sánchez. 2010. Biology of *Dineulophus pthorimaeae* (Hymenoptera: Eulophidae), and field interaction with *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato. *Annals of the Entomological Society of America* 106(6): 936-942.
- Luna, M. G., V. I. Wada, J. La Salle y N. E. Sánchez. 2011. *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae), a Newly Recorded Parasitoid of the Tomato Moth, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), in Argentina. *Neotrop Entomol* 40: 412-414.
- Makee, H. y G. Saour. 1997. Inherited effects in F₁ progeny of partially sterile male *Pthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Econ Entomol* 90: 1097-1101

- Makee, H y G. Saour. 2003. Noninherited sterility in irradiated *Pthorimaea operculella* females. J Appl Entomol 127: 489-493
- Makee, H., N. Tafesh y F. Marec. 2008. Analysis of radiation-induced W chromosome aberrations in the codling moth, *Cydia pomonella* (L.), by Xuroescence in situ hybridization techniques. J pest S 81: 143-151
- Mangan, R. L. 2005. Population suppression in support of the sterile insect technique. In: Dyck, V. A., J. Hendrichs, A. S. Robinson (eds.) Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management Chap 4.2. Springer, Netherlands, pp. 407-425
- Mannion, C. M., J. E. Carpenter y H. R. Gross. 1994. Potential of the combined use of inherited sterility and a parasitoid, *Archytas marmoratus* (Diptera: Tachinidae), for managing *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Environ Entomol 23:41-46
- Mannion, C. M., J. E. Carpenter y H. R. Gross. 1995. Integration of inherited sterility and a parasitoid, *Archytas marmoratus* (Diptera: Tachinidae), for managing *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): Acceptability and suitability of hosts. Environ Entomol 24: 1679-1684.
- Mansour, M. 2010. Effects of gamma radiation on the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, eggs and acceptability of irradiated eggs by *Trichogramma cacoeciae* females. J Pest S 83: 243-249
- Marcano, R. 1995. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo y la reproducción de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bol. Entomol. Venez. 10(1): 69-75.
- Marec, F. 1996. Synaptonemal complexes in insects. Int. J. Insect Morphol. Embryol. 25: 205-233
- Marec, F. y W. Traut. 1993. Analysis of structural rearrangements of Lepidoptera chromosomes using the centrifugation spreading technique, pp. 243–250. In Proceedings: Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques. FAO/IAEA International Symposium, 19–23 October 1992, Vienna, Austria. STI/PUB/909. IAEA, Vienna, Austria.

- Marec, F., I. Kollárová y J. Pavelka. 1999. Radiation- induced inherited sterility combined with a genetic sexing system in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Ann Entomol Soc Am* 92: 250-259
- Marec, F., A. Tothova, K. Sahara, y W. Traut. 2001. Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera). *Heredity* 87: 659-671.
- Mastrangelo, T., A. G. Parker, A. Jessup, R. Pereira, D. Orozco-Dávila, A. Islam, T. Dammalage y J. M. M. Walder. 2010. A new generation of X ray irradiators for insect sterilization. *J Econ Entomol* 103: 85-94
- Mastro, V. C. 1993. Gypsy-moth F1 sterility program: current status. In: *Proceedings of the Symposium: Radiation induced F1 sterility in Lepidoptera for area wide control*. FAO/IAEA, 9-13 September 1991, Arizona, pp. 125-129
- Mastro, V. C. y C. P. Schwalbe. 1988. Status and potential of F1 sterility for control of noxious Lepidoptera pp. 15-40. In *Proc. Symp.: Modern Insect Control: Nuclear Techniques and Biotechnology*. IAEA/FAO, Vienna, Austria, 16-20 November 1987. International Atomic Energy Agency, Vienna
- Maung, N. 2001. Potential use of F1 sterility and the parasitoid *Cotesia plutellae* to control diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *In Proc. FAO/IAEA Final Research Coordination Meeting, "Evaluation of Population Suppression by Irradiated Lepidoptera and Their Progeny"*, 28-30 May 1998. Penang, Malaysia, IAEA-D4-RC-561
- Medeiros, M. A., G. L. Villas Boas, O. A. Carrijo, N. Makishima y N. J. Vilela. 2005. Manejo integrado da traça-do-tomateiro em ambiente protegido. *Embrapa hortaliças. Circular Técnica*, n. 36, 10p
- Mehta, K y A. Parker. 2011. Characterization and dosimetry of a practical X-ray alternative to self-shielded gamma irradiators. *Radiat Phys Chem* 80: 107-113
- Mezquiriz, N. 2001. Control de la polilla del tomate (*Tuta absoluta*). *Bol. Hort. UNLP* 28: 4-8.

- Miranda, M. M. M., M. C. Picanço, J. C. Zanuncio y R. N. C. Guedes. 1998. Ecological life table of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Biocontrol Sci Tech* 8: 597-606
- Miranda, M. M. M., M. C. Picanço, J. C. Zanuncio, L. Bacci y E. M. da Silva. 2005. Impact of integrated pest management on the population of leafminers, fruit borers, and natural enemies in tomato. *Ciencia Rural* 35:204–208
- Mollá O, H. Montón, P. Vanaclocha, F. Beitia y A. Urbaneja. 2009. Predation by the mirids *Nesidiocoris tenuis* and *Macrolophus pygmaeus* on the tomato borer *Tuta absoluta*. *IOBC/WPRS Bull* 49:209–214
- Murakami, A. y H. T. Imai. 1974. Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma* 47: 167-178
- Murray, T. J., T. M. Withers y S. Mansfield. 2010. Choice versus no-choice test interpretation and the role of biology and behavior in parasitoid host specificity tests. *Biol Control* 52:153-159
- Nguyen Thi, Q. H. y T. T. Nguyen Thanh. 2001. Radiation-induced F₁ sterility in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): potential for population suppression in the field. *Fla Entomol* 84: 199-208
- Nilsson, N. O., C. Lofstedt y L. Davring. 1988. Unusual sex chromosome inheritance in six species of small ermine moths (*Yponomeuta*, Yponomeutidae, Lepidoptera). *Hereditas* 108: 259-265
- Nokkala, S. 1987. Cytological characteristics of chromosome behaviour during female meiosis in *Sphinx ligustri* L. (Sphingidae, Lepidoptera). *Hereditas* 106: 169-17
- North, D. T. 1967. The cytogenetic basis of radioresistance in lepidopteran species, *Trichoplusia ni* (Abstr.). *Radiat. Res.* 31: 615
- North, D. T. 1975. Inherited sterility in Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 20: 167-182
- North, D. T. y G. G. Holt. 1969. Population suppression by transmission of inherited sterility to progeny of irradiated cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Can Entomol* 101: 513-520

- North, D. T. y G. G. Holt. 1971. Inherited sterility and its use in population suppression of Lepidoptera, pp. 87-97. In: Proceedings of the Symposium Application of Induced Sterility for Control of Lepidoptera Populations, FAO/IAEA, Viena, 1970
- Ohashi, D. V. y J. D. Urdampilleta. 2003. Interacción entre insectos perjudiciales y benéficos en el cultivo de tabaco de Misiones, Argentina. RIA, 32: 113-124.
- Oliveira, C. M., V. C. Andrade, W. R. Maluf, I. P. Neiva y G. M. Maciel. 2012. Resistance of tomato strains to the moth *Tuta absoluta* imparted by allelochemicals and trichomas density. Ciênc agrotec Lavras 36: 45-52
- Oliveira, F. A., D. J. H. da Silva, G. L. D. Leite, G. N. Jham y M. Picanco. 2009. Resistance of 57 greenhouse-grown accessions of *Lycopersicon esculentum* and three cultivars to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Sci Hortic 119: 182–187
- Osanai, M., H. Kasuga y T. Aigaki. 1987. Physiological-role of apyrene spermatozoa of *Bombyx mori*. Experientia 43: 593-596.
- Ostergen, G., R. Morris y T. Wakoning. 1958. A study in *Hyacinthus* on chromosome size and breakability by X-rays. Hereditas 44: 1-17
- Ostriakova-Varshaver, V. P. 1937. The bee moth, *Galleria mellonella*, as a new object for genetic investigations. II. Cytogenetic analysis of sterility initiated by X-rays in males. Biologicheskii Zhurnal 6: 816-836
- Parra, J. R. P. y R. A. Zucchi. 2004. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. Neotrop Entomol 33:271-281
- Pereyra, P. C. y N. E. Sánchez. 2006. Effect of two Solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotrop Entomol 35: 671-676
- Pfeiffer, D. G., R. Muniappan, Dienaba Sall , Paterne Diatta , A. Diongue y E. O. Dieng. 2013. First Record of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Senegal. Florida Entomologist 96:661-662
- Pintureau, B., M. Gerding y E. Cisternas E. 1999. Description of three new species of Trichogrammatidae (Hymenoptera) from Chile. Can Entomol 131:53-63.

- Polack, A. y M. Mitidieri. 2002. Producción de tomate diferenciado. Protocolo preliminar de manejo integrado de plagas y enfermedades. Información para extensión. Protección Vegetal N°20. Ed. INTA San Pedro. 16p.
- Povolny, D. 1987. Gnorimoschemini of southern South America. The *Scrobipalpuloid* genera (Insecta, Lepidoptera, Gelechiidae). Zoological Museum University of Copenhagen. Streenstrupia, 13(1): 1-91.
- Pratissoli, D. y J. R. P. Parra. 2000. Fertility life table of *Trichogramma pretiosum* (Hym., Trichogrammatidae) in eggs of *Tuta absoluta* and *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) at different temperatures. J Appl Ent 124:339-342
- Proshold, F. I., H. R. Gross, y J. E. Carpenter. 1998. Inundative release of *Archytas marmoratus* (Diptera: Tachinidae) against the corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in whorlstage corn. J. Entomol. Sci. 33: 241-255
- Proverbs, M. D. 1962. Progress on the use of induced sexual sterility for the control of the codling moth *Carpocapsa pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae). P. Entomol Soc Ont 92: 5-11
- Proverbs, M. D., J. R. Newton y D. M. Logan. 1978. Suppression of codling moth, *Laspeyresia pomonella* (Lepidoptera: Olethreutidae), by release of sterile and partially sterile moths. Can Entomol 110: 1095-1102
- Quiroz, C. E. 1978. Utilización de trampas con hembras vírgenes de *S. absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae) en estudios de dinámica de población. Rev. Agric. Téc. de Chile. 38(3): 94-97.
- Rázuri, V. y E. Vargas. 1975. Biología y comportamiento de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae) en tomatara. Rev. Peruana de Ent. 18 (1): 84-89.
- research to Weld implementation. Springer, Dordrecht, pp 113–117
- Riquelme, A. H. 1993. Control integrado de plagas en tomate. Manuales Agro de Cuyo., EEA INTA Luján de Cuyo, Mendoza.
- Riquelme Virgala, M. B. 2009. Evaluación del parasitoide oófago *Trichogrammatoidea bactrae* Nagaraja, 1979 (Hymenoptera, Trichogrammatidae) como agente de control biológico de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera, Gelechiidae) en

- cultivo de tomate en invernadero. Tesis de doctorado. Buenos aires. pp. 168
- Riquelme Virgala, M. B. y E. N. Botto. 2003a. Dispersión y persistencia de *Trichogrammatoidea bactrae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) en cultivo de tomate bajo cubierta. XXV Congreso Nacional de Entomología. Talca, Chile. 26-28 de noviembre
- Riquelme Virgala, M. B. y E. N. Botto. 2003b. Manejo integrado de la polilla del tomate, "*Tuta absoluta*" con énfasis en el empleo de parasitoides oófagos. (ISBN 978-3-8454-8098-5) Editorial académica española. www.ingimage.com-t02e79159, www.eaepublishing.com 156 pp.
- Rishi, S., G. Sahni, y K. K. Rishi. 1999. Inheritance of unusual sex chromosome evidenced by AA^WZ trivalent in *Trabala Vishnu* (Lasiocampidae, Lepidoptera). Cytobios 100: 85-94.
- Robinson, R. 1971. Lepidoptera genetics. Pergamon, Oxford, England
- Romeis, J., T. G. Shanower y C. P. W. Zebitz. 1999. Why *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) egg parasitoids of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) fail on chickpea. B Entomol Res 89: 89–95.
- Rothman, S. y B. Tonelli. 2010. El cultivo del tomate. Cátedra de Horticultura. FCA UNER. pp. 31
- Salas, J. 1995. *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) su presencia en la region Centro Occidental de Venezuela. Agron Trop 45:637–645
- Salas, J. 2001. Insectos plagas del tomate. Manejo integrado. Maracay, Ven., Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara (Serie B-No. 1), 102 pp
- Salazar, E. R. y J. M. Araya. 1997. Detección de resistencia a insecticidas en la polilla del tomate. Simiente 67: 8–22.
- Sánchez, N. E., P. C. Pereyra y M. G. Luna. 2009. Spatial patterns of parasitism of the solitary parasitoid *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae) on the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Environmental Entomology 38 (2): 365-374.

- Saour, G. 2004. Parasitization of potato tuber moth eggs (Lep., Gelechiidae) from irradiated adults by *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) and control of moth population with combined releases of sterile insect and egg parasitoid. JEN 128:681-686
- Saour, G. y H. Makee. 1997. Radiation induced sterility in male potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lep., Gelechiidae). J Appl Entomol 121: 411–415.
- Seth, R. K., y S. E. Reynolds. 1993. Induction of inherited sterility in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) by substerilizing doses of ionizing radiation. Bull. Entomol. Res. 83: 227-235
- Seth, R. K. y V. P. Sharma. 2001a. Inherited sterility by substerilizing radiation in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae): Bio-efficacy and potential for pest suppression. Fla Entomol 84: 183-193
- Seth, R. K., y V. P. Sharma. 2001. Growth, development, reproductive competence and adult behavior of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on different diets. In Proc. FAO/IAEA Final Research Coordination Meeting, "Evaluation of Population Suppression by Irradiated Lepidoptera and Their Progeny", 28-30 May 1998. Penang, Malaysia, IAEA-D4-RC-561.
- Silberglied, R. E., J. G. Shepherd y J. L. Dickinson. 1984. Eunuchs- the role of apyrene sperm in Lepidoptera. Am. Nat. 123: 255-265.
- Simmons, G., J. Carpenter, M. Suckling, M. Addison, A. Dyck, y M. J. B. Vreysen. 2009. Improved quality management to enhance the efficacy of the sterile insect technique for lepidopteran pests. J Appl Entomol 134: 261-273
- Siqueira, H. A., R. N. Guedes, M. C. Picanc_o. 2000. Insecticide resistance in Populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric For Entomol 2:147–153
- Smith, S. M. 1996. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. Annu Rev Entomol 41:375–406
- Snow, J. W., J. R. Young, W. J. Lewis y R. L. Jones. 1972. Sterilization of adult fall armyworms by gamma irradiation and its effects on competitiveness. J. Econ. Entomol. 65: 1431-1433.

- Sparrow, A. H., R. C. Sparrow, K. H. Thompson y L. A. Schairer. 1965. The use of nuclear and chromosomal variables in determining and predicting radiosensitivities. *Radiat Bot* 5:101-132
- StatPoint. 2011. Statistical software. StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, USA
- StatSoft. 2000. Statistica for Windows. Computer program manual. StatSoft Inc., Tulsa, USA
- Stern, V. M., R. F. Smith, R. van den Bosch y K. S. Hagen. 1959. The integrated control concept. *Hilgardia* 29: 81-101.
- Suckling, D. M. y G. Karg. 2000. Pheromones and semiochemicals. In: Rechcigl, J.; Rechcigl, N. ed. *Biological and Biotechnical Control of Insect Pests*. CRC Press. Pp. 63-99
- Suckling, D. M., A. M. Barrington, A. Chaggan, A. E. A. Stephens, G. M. Burnip, J. G. Charles y S. L. Wee. 2007. Eradication of the Australian Painted Apple Moth *Teia anartoides* in New Zealand: Trapping, Inherited Sterility, and Male Competitiveness. En: M. J. B. Vreysen, A. S. Robinson y J Hendrichs. *Area-Wide Control of Insects Pests*. Chapter 7. 603-613
- Suomalainen, E. 1969. On the sex chromosome trivalent in some Lepidoptera females. *Chromosoma* 28:298-308
- Sutrisno, S., M. S. Hoedaya, D. Sutardi y A. Rahayu. 1993. Radiation induced F1 sterility in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), and tropical armyworm, *Spodoptera lituria* F. In: *Proceedings of the symposium Radiation induced F1 sterility in Lepidoptera for area wide control*. FAO/IAEA, 9-13 September 1991, Arizona, pp. 23-36. STI/PUB/929. IAEA, Vienna, Austria.
- Tabone, E., C. Bardon, N. Desneux y E. Wajnberg. 2010. Parasitism of different *Trichogramma* species and strains on *Plutella xylostella* L. on greenhouse cauliflower. *J Pest Sci* 83: 251–256.
- Tezze, A. A. y E. N. Botto. 2004 Effect of cold storage on the biological quality of *Trichogramma nerudai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biol Control* 30:11-16.

- Tobías, C. A. 1952. The dependence of some biological effects of radiation on the rate of energy loss. In: Proceedings of the Symposium on Radiobiology. J. Wiley & Son, New York, pp. 357-392
- Torres, J. B., W. S. Evangelista, R. Barras y R. N. C. Guedes. 2002. Dispersal of *Podisus nigrispinus* (Het., Pentatomidae) nymphs preying on tomato leafminer: effect of predator release time, density and satiation level. *J Appl Entomol* 126:326–33
- Torrilla de Bearzi, N. M. 1979. La polilla del tomate *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick). *Rev. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 10: 39-40.
- Tothová, A. y F. Marec. 2001. Chromosomal principle of radiation-induced F1 sterility in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Genome* 44:172-184
- Traut, W. 1977. A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complexes in female and male meiosis of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genetica* 47: 135–142.
- Traut, W. 1986. A genetic linkage study of W-chromosome-autosome fusions, breakage, and kinetic organization of chromosomes in *Ephestia* (Lepidoptera). *Genetica* 69: 69–79.
- Traut W. y F. Marec. 1997. Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Res* 5:283-29
- Trottin-Caudal, Y., V. Baffert, J.-M. Leyre y N. Hulas. 2012. Experimental studies on *Tuta absoluta* (Meyrick) in protected tomato crops in France: biological control and integrated crop protection. *EPPO Bulletin*, 42: 234–240
- Urbaneja, A., H. Montón y O. Mollá. 2009. Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *J. Appl. Entomol.* 133: 292–296
- Urbaneja, A., J. González-Cabrera, J. Arnó y R. Gabarra. 2012. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Manag Sci* 68: 1215-1222
- van Alphen, J. J. y M. A. Jervis. 1996. Foraging behaviour. In: *Insect natural enemies. Practical approaches to their study and evaluation*. Ed. By Jervis M, Kidd N, Chapman and Hall, London, 62 pp

- Van Driesche, R. G. y T. S. Bellows. 1996. Biological Control. Chapman & Hall. 539 p.
- Van Driesche, R. G. y T. J. Murray. 2004. Overview of testing schemes and designs used to estimate host ranges. In: Van Driesche RG, Reardon R (eds) Assessing host ranges for parasitoids and predators used for classical biological control: a guide to best practice. Chapter 7. FHTET, USA, pp. 68-89
- Van Steenwyk, R. A., T. J. Henneberry, G. R. Ballmer, W. W. Wolf y V. Sevacherian. 1979. Mating competitiveness of laboratory –cultured and sterilized pink bollworm for use in a sterile moth release program. J Econ Entomol 72:502-505
- Vargas, H. C. 1970. Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Idesia 1:75–110
- Viscarret, M. M., C. A. Conte y L. Z. Carabajal Paladino. 2012. Rearing of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) on X-ray irradiated larvae of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Biocontrol Sci Tech 22: 1429-1441
- Vivan, L. M., J. B. Torres, A. F. D. L. Veiga y J. C. Zanuncio. 2002. Predatory behavior and food conversion of *Podisus nigrispinus* preying on tomato leafminer. Pesqui Agropecu Bras 37:581–587
- Vivan, L. M., J. B. Torres y A. F. S. L. Veiga. 2003 Development and reproduction of a predatory stinkbug, *Podisus nigrispinus*, in relation to two different prey types and environmental conditions. Biocontrol 48:155–168
- Walter, G. H. 2003. Insect Pest Management and Ecological Research. Cambridge University Press. 387 p.
- Wang, H. S., Q. R. Liu, D. G. Lu, E. D. Wang, W. Kang, X. H. Liu y Y. J. Li. 2002. Radiation-induced substerility of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) integrated with the release of *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) for area-wide control. In Proceedings: Evaluation of population, suppression by irradiated

- Lepidoptera and their progeny, FAO/IAEA Final Research Coordination Meeting, 28-30 May 1998. Penang, Malaysia, IAEA-D4-RC-561.
- White, L. D., R. B. Hutt, H. R. Moffitt, R. G. Winterfeld, L. V. Lynn, A. E. Clift y L. G. Schoenleber. 1976. Codling moth: Effects of releasing irradiated mixed sexes or females or males only on reproductive potential of a native population. *J EconEntomol* 69: 155-160
- Wolf, K. W. 1994. The unique structure of lepidopteran spindles. *Int. Rev. Cytol.* 152: 1-48
- Wolf, K. W. 1996. The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. *Int J Insect Morphol Embryol* 25:37-62
- Wolf, K. W. y W. Traut. 1991. Cytology of Lepidoptera. VII. The restructuring of eupyrene prophase I spermatocytes and its relationship to meiotic chromosome and spindle organization in *Ephestia kuehniella* Z. *Protoplasma* 165: 51–63.
- Wolf, K. W., K. Novák y F. Marec. 1997. Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers. *Heredity* 79:135-143
- Wong, T. T. Y., M. M. Ramadan, J. C. Herr y D. O. McInnis. 1992. Suppression of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) population with concurrent parasitoid and sterile fly releases in Kula, Maui, Hawaii. *Journal of Econ Entomol* 85: 1679-1681.
- Yusef, M. V. 2014. Desarrollo de la Técnica del Insecto Estéril para el control de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) mediante la utilización de radiación gamma. Tesis de Doctorado. Universidad de San Martín, provincia de Buenos Aires, Argentina
- Zhang, W. Q. y J. E. Cossentine. 1995. *Trichogramma platneri* (Hym.: Trichogrammatidae): host choices between viable and nonviable codling moth, *Cydia pomonella*, and three-lined leafroller, *Pandemis limitata* (Lep: Tortricidae) eggs. *J Biocontrol* 40:457-466
- Zhang, W. Q. y S. A. Hassan. 2000. Life table characteristics of four candidate species of the genus *Trichogramma* to control the diamondback moth

Plutella xylostella (L.). In: Hassan, S.A. (Ed.), Egg Parasitoid News 12. IOBC, p. 14

Zucchi, R. A. y R. B. Querino. 2000. Towards a database for the *Trichogramma* species, their hosts and plant associations in the South America. In: Proceedings of the XXI International Congress of Entomology, Abstract Book I, session 05, Brazil, August 20–26, pp. 201

APÉNDICE

Publicación de los datos presentados en el capítulo II en una revista internacional