Escuela
Internacional
de Doctorado

M^a DEL ROSARIO
MARTÍNEZ
AGUIRRE

T
E
S
I
S

D
O
C
T
O
R
A
L

A
Ñ
O

20
17

Universidad
Politécnica
de Cartagena

Universidad
Politécnica
de Cartagena

Campus
de Excelencia
Internacional

*RESISTENCIA A EMAMECTINA
BENZOATO EN Tuta absoluta (Meyrick)
(Lepidoptera: Gelechiidae)*

*Técnicas Avanzadas en Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario*

Autora: M^a del Rosario Martínez Aguirre

Director: D. Pablo Bielza Lino

Cartagena 2017

**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS**

D. Pablo Bielza Lino Director de la Tesis doctoral “Resistencia a emamectina benzoato en *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)”

INFORMA:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D^a. M^a del Rosario Martínez Aguirre, dentro del Programa de Doctorado Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (TAIDA), dando mi conformidad para que sea presentada ante el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento en la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ☐ Ciencias
- ☐ Ciencias Sociales y Jurídicas
- ☒ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 15 de marzo de 2017

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Fdo.: Pablo Bielza Lino

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

D. Francisco Artés Hernández Presidente/a de la Comisión Académica del Programa
Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (TAIDA)

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “Resistencia a emamectina benzoato en *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)”, ha sido realizada, dentro del mencionado Programa de Doctorado, por D.^a M^a del Rosario Martínez Aguirre bajo la dirección y supervisión del Dr. Pablo Bielza Lino.

En reunión de la Comisión Académica de fecha 13/03/2017, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización del Director de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ☐ Ciencias
☐ Ciencias Sociales y Jurídicas
☒ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 15 de marzo de 2017

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA

Francisco de Asis|Artes|Hernandez

Fdo: Francisco Artés Hernández

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

AGRADECIMIENTOS

En el momento en el que decidí realizar la tesis doctoral desconocía por completo todo lo que implicaba. Ha sido una ardua y agridulce tarea prolongada en el tiempo. En todo este trayecto me han acompañado muchas personas y es por ello que merecen mi reconocimiento y les doy las gracias.

En mi primer lugar agradecer a mi director de tesis D. Pablo Bielza, por darme la oportunidad de hacer el doctorado en su grupo de investigación. Por transmitirme su conocimiento y pasión por la ciencia. Así como guiarme, aconsejarme y siempre tener una palabra de ánimo.

A los compañeros de laboratorio Carolina, Ana, Inma, Amador, Enrique, Virginia y Eli por animarme y ofrecer su ayuda cuando comencé a trabajar y continuar con el doctorado. A Lidia García, compañera de laboratorio con la que he trabajado codo con codo seis años y medio, por ser tan disciplinada y responsable.

Agradecer a toda mi familia en general ya que han estado atentos al desarrollo de la tesis hasta el último momento, deseando que algún día tuviera su fin.

A mis padres y hermano porque me han ayudado tanto psicológicamente como a pie de campo, haciendo bioensayos de selección conmigo hasta bien entrada la noche y cultivando plantas de tomate.

A Joaquín por acompañarme los fines de semana al laboratorio y ayudarme. Así como soportar mi carácter en esos momentos y aún así animarme.

Y por último, agradecer el ánimo por parte de los compañeros de trabajo, amigos, profesores... cada palabra ha sido importante para mí.

Gracias a todos.

RESUMEN

Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), comúnmente conocida como la polilla del tomate, está presente en España desde 2006. Esta plaga es el principal problema del cultivo del tomate por los devastadores daños que causa.

El control de tuta se basa en muchos casos en el uso de plaguicidas. El uso abusivo de los insecticidas ha provocado fallos en el control de tuta en diversas áreas de cultivo del mundo. El número de materias activas autorizadas en el mercado tiende a reducirse considerablemente con el paso del tiempo. Por ello, es aconsejable seguir las recomendaciones de la etiqueta de los productos, alternar las materias activas y realizar de forma adecuada los tratamientos. De esta manera se disminuye el riesgo del desarrollo de resistencias. Recientemente han aparecido nuevas materias activas en el mercado, y ya se comienzan a ver fallos en la eficacia del control de tuta con esos nuevos insecticidas.

En consecuencia, es importante conocer el estado de la susceptibilidad de poblaciones de campo de tuta a compuestos disponibles en el mercado. En este trabajo se recolectaron varias poblaciones de campo de tuta del Mediterráneo para conocer su susceptibilidad a emamectina, metaflumizona, azadiractina, lambda cihalotrín y metil clorpirifos.

Los resultados obtenidos muestran que la susceptibilidad de las poblaciones mediterráneas de tuta a emamectina, metaflumizona, azadiractina y metil clorpirifos es bastante elevada, no viéndose comprometida la eficacia del control de la plaga con dichos compuestos. Sus concentraciones letales 50 fueron considerablemente más bajas que la dosis de campo recomendada en cada insecticida. A pesar de no existir un riesgo actualmente, sí es posible que lo haya a largo plazo debido al comportamiento observado en algunas de las poblaciones estudiadas, las cuales han sido capaces de desarrollar tolerancia respecto a la población más sensible disponible en el laboratorio, aunque no presentan factores de resistencia elevados. Sin embargo, para el compuesto lambda cihalotrín, las poblaciones muestran concentraciones letales 50 por encima de la dosis de campo, observándose un factor de resistencia de hasta 30 en una de las poblaciones frente a lambda cihalotrín. Tuta sí ha desarrollado resistencia a este insecticida.

Un tiempo después se volvieron a recolectar poblaciones de campo de tuta para analizar su susceptibilidad a los mismos insecticidas, y comprobar la evolución de la resistencia de tuta con el paso del tiempo. Estos ensayos, en general no muestran una evolución positiva de la resistencia frente a los cinco insecticidas.

En una buena estrategia de manejo de una plaga, es importante conocer el mejor momento en el que realizar el tratamiento insecticida, es decir, en qué momento del ciclo del insecto es más eficaz el producto o más sensible la plaga. Por ello, se realizó un estudio con los cinco insecticidas anteriormente nombrados en larvas en segundo estadio (dato correspondiente a la línea base de susceptibilidad de once poblaciones de campo de tuta del Mediterráneo), y de cuarto estadio en una población representativa (población "Mixta", mezcla de siete poblaciones de campo). En los datos correspondientes a estos bioensayos, tuta muestra una sensibilidad similar en larvas de segundo y cuarto estadio frente a emamectina, metaflumizona y azadiractina. Se observan diferencias en la susceptibilidad de las larvas de segundo y cuarto estadio frente al insecticida lambda cihalotrin, siendo las larvas de cuarto estadio cuatro veces más resistentes que las de segundo estadio; y en el insecticida metil clorpirifos, donde las larvas de segundo estadio son cinco veces menos susceptibles que las de cuarto estadio.

Numerosos estudios han demostrado la capacidad que tiene tuta para desarrollar resistencia a diferentes materias activas, comprometiendo la eficacia del control químico. Para mantener bajo control una plaga, es necesario conocer los posibles mecanismos de resistencia que puede desarrollar el insecto, así como el efecto que tiene esta resistencia en otros insecticidas. Por ello, en este trabajo se seleccionó una población susceptible de campo (Águilas) para la resistencia a emamectina. Se realizaron diecinueve selecciones y se obtuvo una población 86 veces más resistente a emamectina (E.b. S20) que al inicio del estudio. El mecanismo de resistencia metabólico que le confiere la resistencia a esta población de tuta, viene dado principalmente por la actividad enzimática de las P450 monooxigenasas, teniendo un papel secundario las esterasas.

Obtenida la población de tuta resistente a emamectina (E.b. S20), es importante conocer si esa resistencia también afecta a otros compuestos aunque esa población no haya sido tratada antes con otros productos. La población seleccionada de tuta a emamectina en el laboratorio (E.b. S20) no muestra resistencia cruzada con spinosad, indoxacarb, clorantniliprol, ciantraniliprol, metaflumizona, lambda cihalotrin y azadiractina. Sin embargo, no sucede esto con la diamida flubendiamida, para la cual sí se observa resistencia cruzada. Por otro lado, en los resultados de metil clorpirifos se observa una leve resistencia cruzada negativa.

Además, se estudió el efecto de la exposición a concentraciones subletales de un insecticida en la evolución de la resistencia. En este estudio se ha comprobado si el efecto subletal de emamectina o imidacloprid en tuta provoca el desarrollo resistencia a emamectina. Una población del laboratorio de tuta (Mixta) ha estado expuesta a una

concentración subletal de emamectina o imidacloprid durante varias generaciones. La exposición a concentraciones subletales no favoreció la evolución de la resistencia, frente a los tratamientos sin exposición a dosis subletales.

El desarrollo de resistencia lleva asociado un gasto energético, es decir, el insecto tiene que invertir parte de su energía en metabolizar el tóxico para sobrevivir. Este gasto de energía es conocido como *fitness cost*. Para conocer si realmente afecta el desarrollo de resistencia a tuta, se ha estudiado el ciclo de vida de una población de tuta sensible a emamectina (Mixta) y otra resistente (E.b. S20). Los resultados muestran que la población sensible, en general, completa su ciclo en un periodo de tiempo más corto que la población resistente al mismo producto.

Por último, se quiso conocer la heredabilidad de la resistencia de emamectina en tuta. Se realizaron cruces recíprocos entre la población resistente a emamectina (E.b. S20) y una sensible (Mixta), y las descendencias fueron bioensayadas. Los resultados de los ensayos muestran que la resistencia a emamectina en tuta es heredada autosómicamente, no va ligada al sexo y es recesiva.

ABSTRACT

Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), commonly known as the tomato leaf miner, arrived in Spain in 2006. This pest has become the main problem of tomato crops because of the devastating damages caused.

In many cases the control of tuta is based on the use of pesticides. The abusive use of the insecticides has caused control failures of tuta in several crop areas in the world. The number of active ingredients authorized in the market tends to be reduced considerably. Therefore, it is advisable to follow the recommendations of the product label, to alternate the active ingredients, and to do the treatments properly. In this way the risk of developing resistance can be reduced. Recently new active ingredients have appeared in the market, and there are already failures in the efficacy of tuta control with these new insecticides.

Accordingly, it is important to know the state of the susceptibility of tuta field populations to compounds available in the market. In this work, several Mediterranean tuta field populations were collected to determine their susceptibility to emamectin, metaflumizone, azadirachtin, lambda cyhalothrin and chlorpyrifos methyl.

The results show that the susceptibility of the Mediterranean tuta populations to emamectin, metaflumizone, azadirachtin and chlorpyrifos methyl is quite high, not being compromised the effectiveness of these compounds. Their lethal concentrations 50 were considerably lower than the recommended field dose in each insecticide. Although there is no risk at present, it is possible that there is a risk in the future due to the behaviour observed in some of the populations studied, which have been able to develop tolerance for the most sensitive population available in the laboratory, although they do not have high resistance rates. However, populations show lethal concentrations 50 above the field dose for lambda cyhalothrin compound, with a resistance rate of up to 30-fold of one of the populations. Tuta has developed resistance to this insecticide.

In the following year, tuta field populations were collected to analyze their susceptibility to the same insecticides, and to verify the evolution of the tuta resistance over time. The bioassays made later do not show a positive evolution of resistance against the five insecticides.

It is important to know the best time to apply the insecticide treatment in a good pest management strategy, at what time in the insect cycle the product is most effective or the pest is most sensitive. Therefore, a study was carried out with the five insecticides previously named in larvae at second stage, and at fourth stage of a representative

population (population "Mixta", a mixture of seven field populations). The dates show that tuta has a similar sensitivity at second and fourth instar larvae against emamectin, metaflumizone and azadirachtin. Differences were observed in the susceptibility of second and fourth instar larvae to lambda cyhalothrin insecticide, fourth-instar larvae is four times more resistant than second-stage larvae; and in the insecticide chlorpyrifos methyl, where the second stage larvae are five times less susceptible than the fourth stage larvae.

Numerous studies have demonstrated the ability of tuta to develop resistance to different active ingredients, and this has compromised the effectiveness of chemical control. To keep a pest under control, it is necessary to know the possible mechanisms of resistance that can develop the insect, as well as the effect of this resistance on other insecticides. Thus, in this work we selected a susceptible field population (Aguilas) for resistance to emamectin. Nineteen selections were made and the population obtained was 86-fold more resistant to emamectin (E.b. S20) than the unselected strain. The mechanism of metabolic resistance that confers resistance to emamectin is mainly due to the enzymatic activity of the P450 monooxygenases, with a secondary role of the esterases.

Obtained the emamectin resistant tuta population (E.b. S20), it is important to know whether this resistance also affects other compounds even though that population has not previously been treated with other products. The population selected to emamectin in the laboratory (E.b. S20) does not show cross-resistance to spinosad, indoxacarb, chlorantraniliprole, cyantraniliprole, metaflumizone, lambda cyhalothrin and azadirachtin. However, this is not the case with the diamide flubendiamide, for which cross resistance is observed. On the other hand, the results of chlorpyrifos methyl show a slight negative cross-resistance.

In addition, we studied the effect of exposure to sublethal doses of an insecticide in the evolution of resistance. In this study we analyzed whether the sublethal effect of emamectin or imidacloprid in tuta causes the development of resistance to emamectin. A laboratory population of tuta (Mixed) was exposed to a sublethal concentration of emamectin or imidacloprid for several generations. Exposure to sublethal doses did not enhance the development of resistance, compared to treatments without exposure to sublethal doses.

The development of resistance has associated an energy use, the insect has to invest part of its energy in metabolizing the toxic to survive. This energy use is known as *fitness cost*. To know if the development of resistance affects tuta, the life cycle of a sensitive population (Mixta) and a resistant population to emamectin (E.b. S20) has

been studied. The results show that the sensitive population completes its cycle in a shorter period of time than the resistant population to emamectin.

Finally, we wanted to know the heritability of emamectin resistance in tuta. Reciprocal crosses were made between the emamectin-resistant population (E.b. S20) and a sensitive population (Mixta), and the offspring were bioassayed. The results show that resistance to emamectin in tuta is autosomally inherited, does not link to sex and recessive.

ÍNDICE GENERAL

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick 1917).....	1
1.1.1.- Enclave taxonómico y sinonimias.....	1
1.1.2.- La familia Gelechiidae.....	1
1.1.3.- Morfología.....	2
1.1.4.- Distribución geográfica.....	9
1.1.4.1.- Llegada.....	9
1.1.4.2.- Establecimiento y propagación.....	10
1.1.5.- Hospedantes, daños y distribución en la planta.....	14
1.1.5.1.- Hospedantes.....	14
1.1.5.2.- Distribución en la planta y daños.....	16
1.1.6.- Ecología.....	17
1.2.- Control.....	19
1.2.1.- Control biológico.....	21
1.2.2.- Control químico.....	26
1.3.- Resistencia a insecticidas.....	26
1.3.1.- Definición.....	26
1.3.2.- Mecanismos de resistencia.....	26
1.3.2.1.- Resistencia por comportamiento.....	27
1.3.2.2.- Resistencia por penetración reducida.....	27
1.3.2.3.- Resistencia metabólica.....	27
1.3.2.4.- Resistencia en el punto de acción.....	28
1.3.3.- Resistencias cruzadas.....	28

1.4.- Resistencia a insecticidas en <i>Tuta absoluta</i>.....	28
1.4.1.- Mecanismos de resistencia a insecticidas en <i>Tuta absoluta</i>	31
1.4.2.- Estrategias de manejo de la resistencia en tuta.....	33
1.5.- Insecticidas estudiados.....	33
1.5.1.- Emamectina benzoato.....	34
1.5.2.- Azadiractina.....	38
1.5.3.- Metaflumizona.....	39
1.5.4.- Lambda cihalotrín.....	40
1.5.5.- Metil clorpirifos.....	41
1.6.- Materias activas autorizadas contra tuta.....	42
1.7.- Bibliografía.....	43
2.- OBJETIVOS.....	57
3.- MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES.....	58
3.1.- Material vegetal.....	58
3.2. Jaulas de cría.....	58
3.3.- Poblaciones de <i>Tuta absoluta</i>.....	59
3.4.- Insecticidas y sinergistas.....	60
3.5.- Cría de las poblaciones de <i>Tuta absoluta</i>.....	64
3.6.- Bioensayos.....	64
3.6.1.- Sincronización de la oviposición.....	64
3.6.2.- Bioensayo de susceptibilidad	64
3.6.2.1.- Preparación de las soluciones insecticidas.....	65
3.6.2.2.- Tratamiento de las hojas.....	65
3.6.2.3.- Lectura del bioensayo.....	67
3.6.3- Bioensayo de selección.....	68

3.6.4.- Bioensayo de sinergistas.....	69
3.7.- Análisis de datos.....	69
3.8.- Bibliografía.....	69
4.- SUSCEPTIBILIDAD BASAL DE POBLACIONES MEDITERRÁNEAS DE <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae) A EMAMECTINA BENZOATO, METAFLUMIZONA, AZADIRACTINA, LAMBDA CIHALOTRÍN Y METIL CLORPIRIFOS.....	71
4.1.- Introducción.....	71
4.2.- Material y Métodos.....	72
4.2.1.- Poblaciones de insectos.....	72
4.2.2.- Insecticidas.....	72
4.2.3.- Bioensayos.....	72
4.2.4.- Análisis estadístico.....	72
4.3.- Resultados y discusión.....	73
4.3.1.- Susceptibilidad a emamectina benzoato.....	73
4.3.2.- Susceptibilidad a metaflumizona.....	76
4.3.3.- Susceptibilidad a azadiractina.....	78
4.3.4.- Susceptibilidad a lambda cihalotrín.....	79
4.3.5.- Susceptibilidad a metil clorpirifos.....	81
4.3.6.- Susceptibilidad en función del estadio larvario.....	83
4.4.- Conclusiones.....	85
4.4.1.- Susceptibilidad a emamectina benzoato.....	85
4.4.2.- Susceptibilidad a metaflumizona.....	85
4.4.3.- Susceptibilidad a azadiractina.....	85
4.4.4.- Susceptibilidad a lambda cihalotrín.....	85
4.4.5.- Susceptibilidad a metil clorpirifos.....	85

4.4.6.- Susceptibilidad en función del estadio larvario.....	86
4.5.- Bibliografía.....	86
5.- SELECCIÓN DE UNA POBLACIÓN DE <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae) RESISTENTE A EMAMECTINA BENZOATO Y MECANISMOS DE RESISTENCIA IMPLICADOS.....	90
5.1.- Introducción.....	90
5.2.- Material y métodos.....	91
5.2.1.- Cría de la población.....	91
5.2.2.- Bioensayo de selección.....	92
5.2.3.- Bioensayo de susceptibilidad.....	92
5.2.4.- Bioensayo de sinergistas.....	92
5.2.5.- Análisis estadístico.....	92
5.3.- Resultados y discusión.....	92
5.3.1.- Selección de una población resistente.....	93
5.3.2.- Mecanismos de resistencia.....	97
5.4.- Conclusiones.....	101
5.5.- Bibliografía.....	101
6.- RESISTENCIAS CRUZADAS A EMAMECTINA BENZOATO EN <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae).....	105
6.1.- Introducción.....	105
6.2.- Material y métodos.....	105
6.2.1.- Bioensayo.....	105
6.2.2.- Insecticidas.....	106
6.2.3.- Análisis estadístico.....	107
6.3.- Resultados y discusión.....	107
6.4.- Conclusiones.....	110

6.5.- Bibliografía.....	110
7.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SUBLETAL EN LA EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA EN <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae).....	112
7.1.- Introducción.....	112
7.2.- Material y métodos.....	113
7.2.1.- Cría.....	114
7.2.2.- Bioensayos de susceptibilidad.....	114
7.2.3.- Bioensayos de selección.....	115
7.2.4.- Insecticidas.....	115
7.2.5.- Análisis estadístico.....	115
7.3.- Resultados y discusión.....	115
7.3.1.- Línea Control.....	116
7.3.2.- Línea Subletal emamectina.....	117
7.3.3.- Línea Selección emamectina.....	117
7.3.4.- Línea Subletal emamectina + selección emamectina.....	118
7.3.5.- Línea Subletal imidacloprid + selección emamectina.....	119
7.3.6.- Susceptibilidad de las líneas.....	120
7.4.- Conclusiones.....	123
7.5.- Bibliografía.....	123
8.- EFECTO DE LA RESISTENCIA A EMAMECTINA BENZOATO EN EL CICLO DE VIDA DE <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae).....	126
8.1.- Introducción.....	126
8.2.- Material y métodos.....	126
8.2.1.- Determinación de los estadios.....	126
8.2.2.- Análisis estadístico.....	128

8.3.- Resultados y discusión.....	128
8.4.- Conclusiones.....	130
8.5.- Bibliografía.....	130
9.- HERENCIA DE LA RESISTENCIA EN <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae).....	132
9.1.- Introducción.....	132
9.2.- Material y métodos.....	132
9.2.1.- Bioensayos de cruces recíprocos.....	132
9.2.2.- Análisis estadístico.....	135
9.2.3.- Análisis de la herencia.....	136
9.3.- Resultados y discusión.....	136
9.3.1.- Herencia de la resistencia.....	136
9.3.2.- Grado de dominancia (D_{LC}).....	137
9.3.3.- Dominancia efectiva (D_{ML}).....	138
9.4.- Conclusiones.....	139
9.5.- Bibliografía.....	139

ÍNDICE DE FIGURAS

1.- INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Ciclo biológico de tuta (Márquez, 2013).....	2
Figura 1.2. Huevo de tuta.....	3
Figura 1.3. Larva de tuta (Koppert Biological Systems).....	3
Figura 1.4. Larva de tuta. Detalle de la implantación de setas espiraculares de protórax (Se) (González, 1989).....	3
Figura 1.5. Larva de primer estadio (L1) (INIA La Platina, Chile).....	4
Figura 1.6. Larva de segundo estadio (L2) (INIA La Platina, Chile).....	4
Figura 1.7. Larva de tercer estadio (L3) (INIA La Platina, Chile).....	4
Figura 1.8. Larva de cuarto estadio (L4) (http://archives.eppo.org).....	4
Figura 1.9. A) Galerías en hojas ocasionadas por tuta donde se observan las heces en un extremo. B) Ataque severo de tuta. C) Galería sinuosa ocasionada por <i>Lyriomiza</i> (Antonio Monserrat, 2010).....	5
Figura 1.10. Pupa de la polilla del tomate (García-Marí).....	5
Figura 1.11. Adulto de Tuta (Dra. Sangmi Lee).....	6
Figura 1.12. Características morfológicas de la polilla del tomate (Brambila <i>et al.</i> , 2010).....	6
Figura 1.13. Características morfológicas de la polilla del tomate: a) palpo labial prominente y curvo; b) escamas amplias; c) antenas largas y filiformes (Brambila <i>et al.</i> , 2010).....	7
Figura 1.14a. Genitalia del macho de tuta.....	8
Figura 1.14b. Genitalia del macho de tuta.....	8
Figura 1.15a. Genitalia de la hembra de tuta.....	8
Figura 1.15b. Ovipositor central.....	8
Figura 1.16. Años en los que <i>Tuta absoluta</i> fue detectada por primera vez en los países de Europa y áreas del Mediterráneo. La información proporcionada se basa en una recopilación de informes de los servicios	

de protección de plantas de los países que han sido invadidos por <i>T. absoluta</i> y de la Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO) (Desneux <i>et al.</i> , 2010).....	12
---	----

Figura 1.17. Distribución prevista en función de los Índices Ecoclimáticos (IE) de <i>Tuta absoluta</i> en los países de Europa y norte de África. Los puntos indican el valor de los IE, con el incremento del tamaño de dichos puntos aumenta su el valor del IE. Cuanto mayor sea el valor del IE, más adecuado es el clima en ese lugar (IE~ 10: las especies podrían sobrevivir, 30: muy favorable, Sutherst <i>et al.</i> , 2007). Los parámetros biológicos de <i>Tuta absoluta</i> usados en el modelo son de Marcano (1995), Betancourt <i>et al.</i> , (1996) y Barrientos <i>et al.</i> , (1998). La distribución potencial de <i>T. absoluta</i> está basada en el establecimiento en Europa (a principios de 2008) y en su presencia en el sur de América. La información de Sudamérica fue incluida (más de 150 localizaciones de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela fueron usadas durante el proceso de ajuste de parámetros) (Desneux <i>et al.</i> 2010).....	13
--	----

Figura 1.18. Modo de acción “ Activación del Canal de Cloro”	35
---	----

Figura 1.19. Reservorio de sustancia activa.....	36
---	----

Figura 1.20. Efecto de la emamectina sobre la plaga desde su ingesta.....	37
--	----

Figura 1.21. Efecto ovo-larvicida de la emamectina.....	37
--	----

Figura 1.22. Ensayos realizados en varios cultivos hortícolas contra diferentes lepidópteros.....	38
--	----

Figura 1.23. Flor y hoja del árbol del Neem (Agrorganics, 2013).....	39
---	----

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 3.1. Jaula completa.....	59
--	----

Figura 3.2. Detalle de las dos bandejas que sujetan la funda de nital.....	59
---	----

Figura 3.3. Estanterías con las jaulas en el laboratorio.....	59
--	----

Figura 3.4. Adultos de tuta en la esquina de la jaula.....	61
---	----

Figura 3.5. Affirm.....	61
--------------------------------	----

Figura 3.6. Alverde.....	61
Figura 3.7. Align.....	61
Figura 3.8. Karate Zeon.....	62
Figura 3.9. Reldan E.....	62
Figura 3.10. PBO.....	62
Figura 3.11. DEF.....	63
Figura 3.12. DEM.....	63
Figura 3.13. Agitador magnético con los vasos.....	65
Figura 3.14. Hojas tratadas con sus peciolo en viales con agua, sobre gradillas en el interior de la campana.....	66
Figura 3.15. Envase con el foliolo tratado seco y algodón humedecido en el peciolo.....	66
Figura 3.16. Envase con las larvas en su interior, tapadera agujereada y rotulado.....	67
Figura 3.17. Disposición de los envases de todos los tipos de bioensayos	69

6.- RESISTENCIAS CRUZADAS A EMAMECTINA BENZOATO EN *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Figura 6.1. Spintor 480 SC.....	106
Figura 6.2. Steward.....	106
Figura 6.3. Altacor.....	106
Figura 6.4. Benevia.....	106
Figura 6.5. Fenos.....	107

7.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SUBLETAL EN LA EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA EN *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Figura 7.1. Confidor 20 LS.....	115
--	-----

8.- EFECTO DE LA RESISTENCIA A EMAMECTINA BENZOATO EN EL CICLO DE VIDA DE *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Figura 8.1. Foliolos con huevos de tuta enumerados, algodón saturado en agua en el peciolo, en el interior de un envase plástico translúcido con aireación en la tapa..... 127

Figura 8.2. Individuos individualizados en foliolos de tomate con hidratación en el peciolo..... 127

9.- HERENCIA DE LA RESISTENCIA EN *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Figura 9.1. Crisálidas extraídas de la población sensible y resistente, agrupadas individualmente..... 133

Figura 9.2. Pupa recién formada para sexar (foto de la izquierda), detalle del abdomen de una pupa de tuta (foto de la derecha) ambas en la lupa..... 133

Figura 9.3. Parte final del abdomen de la hembra (foto de la izquierda) y del macho (foto de la derecha)..... 133

Figura 9.4. Pupas macho de la población sensible en una placa petri con algodón, pupas hembra de la población resistente en un envase transparente con algodón en su base y dos plantas de tomate en el interior de una jaula de cría..... 134

Figura 9.5. Pupas vacías, pupas con el adulto dentro que no ha emergido y pupas deformadas..... 135

Figura 9.6. Detalle de los huevos de tuta en los tricomas del tronco de la planta de tomate de uno de los cruces..... 135

ÍNDICE DE TABLAS

1.- INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Enemigos naturales de tuta encontrados en la cuenta mediterránea (Desneux <i>et al.</i> , 2010).....	22
--	----

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Nombre y procedencia de las poblaciones de tuta	60
Tabla 3.2. Insecticida, materia activa y la correspondiente dosis de campo (ppm).....	63

4.- SUSCEPTIBILIDAD BASAL DE POBLACIONES MEDITERRÁNEAS DE *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) A EMAMECTINA BENZOATO, METAFIUMIZONA, AZADIRACTINA, LAMBDA CIHALOTRÍN Y METIL CLORPIRIFOS

Tabla 4.1. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a emamectina benzoato.....	75
Tabla 4.2. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia respecto a la línea base, pendiente y de cuatro poblaciones de campo a emamectina	75
Tabla 4.3. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a metaflumizona.....	77
Tabla 4.4. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia respecto a la línea base, pendiente y error y fecha de tres poblaciones de campo a metaflumizona.....	77
Tabla 4.5. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a azadiractina.....	78
Tabla 4.6. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de tres poblaciones de campo a azadiractina.....	79
Tabla 4.7. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a lambda cihalotrín.....	81
Tabla 4.8. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de tres poblaciones de campo a lambda cihalotrín.....	81

Tabla 4.9. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a metil clorpirifos.....	82
Tabla 4.10. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de tres poblaciones de campo a metil clorpirifos.....	83
Tabla 4.11. Producto, estadio larvario, concentración letal 50 y sus límites fiduciales y el factor de resistencia.....	84
5.- SELECCIÓN DE UNA POBLACIÓN DE <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae) RESISTENTE A EMAMECTINA BENZOATO Y MECANISMOS DE RESISTENCIA IMPLICADOS	
Tabla 5.1. Selección y concentración de emamectina en la selección de la selección precedente.....	93
Tabla 5.2. Selección, concentración de emamectina benzoato a la que se selecciona, datos de los ensayos (larvas totales, vivas, muertas, porcentaje de mortalidad) y concentración de emamectina benzoato a la que se tratan las plantas de cría.....	95
Tabla 5.3. Selección, concentración letal 10, 50 y 90 con sus respectivos límites fiduciales (95% confianza) y sus factores de resistencia, de los bioensayos de susceptibilidad a emamectina.....	96
Tabla 5.4. Resultados de los bioensayos de E.b. S20 a emamectina y con sinergistas y de Águilas a emamectina, concentración letal 50 con sus límites y pendiente con su error.....	99
6.- RESISTENCIAS CRUZADAS A EMAMECTINA BENZOATO EN <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae)	
Tabla 6.1. Insecticida, población sensible (Águilas) y resistente (E.b. S20) a emamectina, concentración letal 50 con los límites fiduciales (95% confianza), pendiente y su error, de los bioensayos realizados con la población sensible y seleccionada a los diferentes insecticidas.....	109
7.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SUBLETAL EN LA EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA EN <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae)	
Tabla 7.1. Esquema explicativo de la cría y selección de las cinco líneas.....	114
Tabla 7.2. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea Control.....	116
Tabla 7.3. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea SubE.....	117

Tabla 7.4. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea SelE.....	118
Tabla 7.5. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea SubE+SelE.....	119
Tabla 7.6. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea SubI+SelE.....	120
Tabla 7.7. Resultados de los bioensayos de susceptibilidad en las 5 líneas (concentración letal 50 en ppm con sus límites, factor de resistencia y pendiente con su error).....	122
8.- EFECTO DE LA RESISTENCIA A EMAMECTINA BENZOATO EN EL CICLO DE VIDA DE <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae)	
Tabla 8.1. Promedio de duración ($\pm$ error) de los diferentes estadios de tuta en la población sensible y resistente a emamectina.....	129
9.- HERENCIA DE LA RESISTENCIA EN <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae)	
Tabla 9.1. Número de pupas macho y hembra de la población sensible y resistente y el número de adultos emergidos.....	134
Tabla 9.2. Nombre de la población, concentración letal 50 y sus límites (95% confianza), factor de resistencia y pendiente con su error de los ensayos realizados con emamectina benzoato.....	137
Tabla 9.3. Datos de la mortalidad corregida a varias concentraciones de la combinación de los cruces recíprocos (pooled), de la población sensible y de la resistente	138
Tabla 9.4. Datos de la dominancia efectiva de la combinación de los cruces recíprocos (pooled) a diferentes concentraciones.....	138

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- *Tuta absoluta* (Meyrick 1917)

Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), es un microlepidóptero cuyo nombre común varía en función del idioma: en español es conocida como palomilla del tomate, cogollero del tomate, gusano minador del tomate, oruga minadora de hoja y tallo, perforador de las hojas del tomate, polilla del tomate, polilla perforadora y tuta. En inglés se denomina “tomato borer”, “south american tomato moth”, “tomato leaf miner”, “south american tomato pinworm”, en francés “mineuse de la tomate” y en portugués “traça-do-tomateiro” (SENASICA, 2013).

1.1.1.- Enclave taxonómico y sinonimias

Tuta absoluta (Meyrick) se describió originalmente como *Phthorimaea absoluta* por el entomólogo inglés E. Meyrick en 1917, de un ejemplar colectado en la localidad de Huancayo, Perú (López, 2003).

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Gelechiidae

Género: *Tuta*

Especie: *Tuta absoluta*

Después la plaga fue llamada como *Gnorimoschema absoluta* (Clarke, 1962) en 1917, *Scrobipalpula absoluta* (Povolny) en 1964 y *Scrobipalpuloides absoluta* (Povolny) en 1987, para finalmente ser descrita bajo el género *Tuta* como *Tuta absoluta* por Povolny en 1994 (Barrientos *et al.*, 1998).

1.1.2.- La familia Gelechiidae

La familia Gelechiidae es una de las familias de lepidópteros con más cantidad de especies. Repartidas en 550 géneros se ubican las 4.600 especies encontradas en todo el

mundo, estando 1550 de ellas descritas en la región Paleártica (García-Marí y Vercher, 2010).

Las orugas de esta familia se alimentan de la parte interna de diversos órganos de las plantas, como tallos, hojas, frutos, tubérculos o semillas. Los adultos tienen de 3 a 6 mm de largo, alas grisáceas más o menos oscuras, estrechas y con flecos, y palpos labiales largos y recurvados hacia arriba (García-Marí y Vercher, 2010).

1.1.3.- Morfología

A lo largo del ciclo biológico de tuta, este microlepidóptero pasa por cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1.1)

Figura 1.1. Ciclo biológico de tuta (Márquez, 2013).

A continuación se describe cada estado de desarrollo.

➤ Huevo

El color de los huevos es blanco-cremoso recién puesto, tornándose anaranjado conforme se aproxima la eclosión y son de forma ovalada (Figura 1.2). Miden 0,4 mm de largo y 0,2 mm de diámetro (Vargas, 1970). Segovia (1997) indica que mayoría de los

huevos son puestos en las plantas que se encuentran ubicadas en los bordes de los invernaderos y, dentro de la misma planta prefieren la parte superior de la misma, es decir, en brotes y hojas jóvenes. Las hembras son capaces de llegar a poner entre 40 y 50 huevos a lo largo de su vida (Apablaza, 1992), los cuales son puestos de forma individual. En campo, un 73 % de los huevos son puestos en hojas, un 21 % son depositados cerca de las nervaduras, depresiones y márgenes de los tallos y un 6% en frutos verdes, nunca en frutos maduros (Estay, 2000). Cabe destacar que en los frutos, cerca del 90% de los huevos son depositados en los sépalos (Estay, 2000).

Figura 1.2. Huevos de tuta.

➤ Larva

El estado de larva comprende 4 estadios larvarios bien definidos y diferentes en tamaño y color (Vargas, 1970; Fernández y Montagne, 1990a; Estay, 2000)

La larva de tuta es eruciforme con 5 pares de pseudópodos o propatas (Quiroz, 1976), presenta una cabeza oscura con una mancha lateral que se extiende desde los ocelos hasta el margen posterior (Figura 1.3). Carece de placa dorsal en el protórax, en su lugar tiene una banda oscura oblicua que no cubre la línea media dorsal (Figura 3b), presenta setas anteriores al espiráculo protorácico separadas en un grupo de dos, mientras que la tercera está aislada junto al margen anterior del espiráculo y carece también de placa basal (Figura 1.4) (Estay, 2000). La forma cilíndrica levemente aplastada dorsalmente se mantiene a lo largo de los cuatro estadios larvarios (López, 2003).

Figura 1.3. Larva de tuta (Koppert Biological Systems, www.flickr.com).

Figura 1.4. Larva de tuta. Detalle de la implantación de setas espiraculares de protórax (Se) (González, 1989).

Larva 1

Color: al inicio es blanco-crema, a medida que se alimenta y desarrolla adquiere un tono verde claro. Próxima a la muda se vuelve blanco-crema porque deja de comer y vacía los intestinos (López, 2003).

Longitud: entre 0,9 mm (Notz, 1992) y 1,6 mm (Vargas, 1970), aproximadamente.

Figura 1.5. Larva de primer estadio (L1) (INIA La Platina, Chile).

Larva 2

Color: gris blanquecino al inicio y pasa a verde claro a medida que se alimenta. Al final del período adquiere de nuevo un color blanco-crema (López, 2003).

Longitud: aproximadamente 2,8 mm (González, 1989).

Figura 1.6. Larva de segundo estadio (L2) (INIA La Platina, Chile).

Larva 3

Color: gris blanquecino al principio y a media que se desarrolla pasa al verde claro, intensificándose gradualmente. Adquiere tonalidad blanquecina hacia el final del período (López, 2003).

Longitud: puede alcanzar los 4,7 mm (González, 1989).

Figura 1.7. Larva de tercer estadio (L3) (INIA La Platina, Chile).

Larva 4

Color: verde-claro, aparece una mancha longitudinal rojiza dorsal (Quiroz, 1976). La cabeza se torna color café y la sutura epicraneal está bien marcada. El escudo protorácico es visible, con una línea semicircular oscura en la parte posterior (López, 2003).

Longitud: entre 7,5 mm (Notz, 1992) y 7,7 mm (Vargas, 1970).

Figura 1.8. Larva de cuarto estadio (L4) (<http://archives.eppo.org>).

Cuando la larva cambia de estadio, la mayoría de las veces sale de la galería en que se encuentra para atacar otras hojas aumentando así el daño en la planta (Estay y Bruna, 2002).

Una característica importante que la separa de otros minadores, es que las larvas depositan los excrementos en un solo extremo de la galería (Figura 9A), a diferencia de *Lyriomiza* que las dispersa a lo largo de la galería (Figura 1.9C) (Monserrat, 2010).

Figura 1.9. A) Galerías en hojas ocasionadas por tuta donde se observan las heces en un extremo. B) Ataque severo de tuta. C) Galería sinuosa ocasionada por *Lyriomiza* (Antonio Monserrat, 2010).

➤ Pupa

La pre-pupa es el período en que la larva deja de alimentarse y empiezan a tejer un capullo y al mismo tiempo van acortándose en longitud (Fernández y Montagne, 1990b). Las observaciones realizadas por varios autores (Fernández y Montagne, 1990b; García *et al.*, 1982) indican que este insecto pupa básicamente en las hojas, pero se ha observado también que pupan ligeramente bajo la superficie del suelo o sobre la superficie del mismo (Vercher *et al.*, 2009).

La pupa recién formada es verde, tornándose café al avanzar el desarrollo. Presenta dimorfismo sexual en base a la ubicación de los poros genitales (Quiroz, 1976). La pupa hembra es de mayor tamaño que la del macho midiendo 4,67 y 4,27 mm de largo y 1,37 y 1,23 mm de ancho, respectivamente (JA, 2010). El estado de pupa dura entre 7-21 días. La pupa recién formada es de color verde, tornándose marrón oscuro próximo a la emergencia del adulto (Figura 1.10) (Cáceres, 2007).

Figura 1.10. Pupa de la polilla del tomate.

➤ Adulto

Los adultos alcanzan hasta 7 mm de longitud y 10-11 mm de envergadura.

El primer par de alas es de color gris oscuro con manchas pardas y el segundo par de alas es gris brillante (Estay y Bruna, 2002) (Figura 1.11).

Figura 1.11. Adulto de tuta (Dra. Sangmi Lee).

Las antenas de *T. absoluta* son filiformes (en forma de collar) y largas, con anillos de color café claro y oscuro alternados (Figura 1.12), siendo las antenas más largas en los machos (Coelho y França, 1987).

Figura 1.12. Características morfológicas de la polilla del tomate (Brambila *et al.*, 2010).

Los palpos maxilares vestigiales y los palpos labiales son gruesos, aguzados, largos y vueltos hacia arriba. El palpo labial presenta en el tercer segmento un gran anillo negro en el primer tercio distal y otro en el ápice del segmento (Figura 1.13). El abdomen es de color café cremoso y es más grueso en las hembras que en los machos (Quiroz, 1976; González, 1989).

Figura 1.13. Características morfológicas de la polilla del tomate: a) palpo labial prominente y curvo; b) escamas amplias; c) antenas largas y filiformes (Brambila *et al.*, 2010).

Los adultos suelen permanecer escondidos entre las hojas durante el día (Fernández y Montagne, 1990a). La vida media es de 10 a 15 días en las hembras y de 6 a 7 días en los machos (Estay y Bruna, 2002). Una misma hembra puede poner de 40 a 150 huevos durante su vida (Estay y Bruna, 2002). Sin embargo, Vercher *et al.* (2010) observaron que pueden llegar a poner hasta más de 250 huevos por hembra, ya que la hembra es capaz de copular varias veces a lo largo de su vida. Los huevos son depositados bien de forma individual o agrupados hasta un máximo de cinco (Fernández y Montagne, 1990b).

Características morfológicas de la genitalia del adulto de tuta.

Macho

La genitalia del macho se caracteriza por:

- (a) uncus en forma de campana y ancho hacia el ápice
- (b) valva digitada y setosa apicalmente, margen interno convexo medialmente
- (c) tegumen ensanchado basalmente
- (d) gnathos ancho con ápice redondeado
- (e) vinculum ancho y bien desarrollado con un saccus ancho y alargado y
- (f) aedeagus con un ciego prominente (Figura 1.14a y b) (Angulo y Olivares, 2011).

Figura 1.14a. Genitalia del macho de tuta
(www.dissectiongroup.co.uk).

Figura 1.14b. Genitalia del macho de tuta.

Hembra

Figura 1.15a. Genitalia de la hembra de tuta (www.dissectiongroup.co.uk).

La hembra de tuta se caracteriza por tener su genitalia con el conducto seminal en pleno, no en la unión con la bolsa copulatriz, cuerpo bursal cónico como embudo y casi dos tercios tan largo como la bolsa copulatriz (Figura 1.15a y b) (González, 1989).

Figura 1.15b. Ovipositor central.

1.1.4.- Distribución geográfica

El proceso de invasión biológica puede dividirse en tres fases: llegada, establecimiento y propagación (Mack *et al.*, 2002).

1.1.4.1.- Llegada

Ámbito geográfico antes de la invasión de los países de la cuenca mediterránea

Investigaciones recientes han mostrado que tuta es probablemente originaria de Chile (Guillemaud *et al.*, 2015). Desde comienzos de 1980 se registró como una plaga en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (Barrientos *et al.*, 1998; Estay, 2000). Esta especie se encuentra normalmente en cultivos al aire libre hasta 1.000 metros de altura sobre el nivel del mar, pero ha sido encontrada en invernaderos y al aire libre, ambos en cultivos de tomate a 2.600 y 1.900 metros sobre el nivel del mar, respectivamente en Colombia (Desneux *et al.*, 2010); el holotipo fue recolectado en Perú a 3.500 metros (Povolny, 1975). Se cree que el comercio agrícola entre continentes ha facilitado la rápida propagación de la plaga (Cáceres, 1992). Por ejemplo, el comercio agrícola entre Chile y Argentina introdujo *T. absoluta* en la provincia de Mendoza (Argentina) en 1964 (Bahamondes y Mallea, 1969). Antes de su llegada a Europa, tuta estaba exclusivamente registrada en Sudamérica y en la Isla de Pascua (Ripa *et al.*, 1995). Sin embargo, hay un registro sin confirmar de un ataque de esta plaga a *Solanum lyratum* en Japón (Clarke, 1962). Teniendo en cuenta que no hay registros recientes disponibles en Japón, es posible que la plaga no se estableciera o que la información fuera errónea (Desneux *et al.*, 2010).

Intercepción y medidas contra la expansión

A pesar de su denominación inicial como una plaga clave (EPPO 2005), tuta no estuvo en la lista de la Directiva de Sanidad Vegetal 2000/29/EC. Consecuentemente, los terceros países que importaban tomates no sometían el producto a inspecciones de sanidad vegetal antes de entrar y moverse dentro de la comunidad europea. Esta omisión podría haber causado la introducción de tuta en Europa, el cual fue registrado en la provincia de Castellón de la Plana a finales de 2006 (Urbaneja *et al.*, 2007).

La propagación de tuta ha podido verse facilitada por el comercio agrícola, basándose en experiencias ocurridas en Sudamérica. A pesar de la presencia de organismos fitosanitarios bien organizados en toda Europa, las medidas de contingencia resultaron ineficaces para detener la propagación de dicha plaga a través de los continentes. Por ejemplo, a pesar de las intercepciones continuas de tuta por la Agencia de Investigación de Alimentación y Medio Ambiente Británica (British Food and

Environment Research Agency, FERA) desde 2006 a 2009, y posterior seguimiento intensivo de los centros de envasado de tomates y medidas de control reglamentarias en los lugares infestados, la plaga se registró en un cultivo de tomate británico en julio de 2009. Del mismo modo, el Servicio de Protección Vegetal de los Países Bajos registró *T. absoluta* en un embalaje de tomate en 2008 (Potting, 2009). Y el servicio fitosanitario de Rusia informó de la presencia de tuta en la región de Kaliningrado en los envíos de tomate procedentes de España. Todo esto indica claramente que tuta ha podido ser introducida en nuevos países de Europa y de la cuenca mediterránea mediante frutos de tomate procedentes de áreas contaminadas (Desneux *et al.*, 2010).

Sin embargo, en cortas y medias distancias, la propagación natural parece ser el mayor riesgo. La expansión de la plaga en España ha sucedido principalmente por medios naturales (Desneux *et al.*, 2010). Las corrientes de aire parecen ser especialmente favorables para la expansión (aunque la habilidad de tuta para volar permanece dudosa). El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y el Servicio de Inspección Animal y Sanidad Vegetal (APHIS) están constantemente actualizando la lista de países que importan productos que están regulados por tuta. Las órdenes federales fueron emitidas en febrero y mayo de 2009 (Bech, 2009) que imponen restricciones severas en los frutos de tomate procedentes de países infestados (Albania, Argelia, Francia, Grecia, Italia, Marruecos, Países Bajos, Portugal, España, Suiza y Túnez). USDA-APHIS también prohíben la entrada de *Solanum* sp., *Datura* spp. y *Nicotiana* spp., como plantas potencialmente hospedadores de tuta procedentes de los países anteriormente mencionados (Desneux *et al.*, 2010).

1.1.4.2.- Establecimiento y propagación

Invasión de tuta

En España la plaga se detectó por primera vez en invernaderos de tomate, en el invierno de 2006 - 2007 en Torreblanca (Castellón). Meses antes, se cree que se habían visto daños de esta plaga, pero fueron causados por otra especie parecida perteneciente a la misma familia, la polilla de la patata *Phthorimaea operculella*. En Valencia, Alicante y en las Islas Baleares (Ibiza) se volvió a observar la plaga (2007). Desde que se detectó, tuta causó considerables daños en hojas y frutos, comportándose como una plaga muy voraz y alcanzando niveles poblacionales elevados en el cultivo del tomate. También se observó en berenjenas y en solanáceas espontáneas (*Solanum nigrum* L.). El establecimiento de la plaga en la zona mediterránea era de suponer una vez conocidas sus preferencias climáticas, vista la celeridad de su expansión en los primeros meses y

sus hospedantes, pasando a ser considerada una de las plagas más importantes en España en el cultivo del tomate (García-Marí y Vercher, 2010).

El proceso de invasión en España fue el siguiente: se detectó la presencia de tuta en 2006 por primera vez en la provincia de Castellón (España) en cultivo de tomate. Posteriormente, en 2007, se observó en varias zonas de la provincia de Valencia y en la isla de Ibiza (Urbaneja *et al.*, 2007). A finales de 2007 se descubrió en Murcia, Cataluña y Andalucía (Almería). Las primeras capturas en la Región de Murcia de tuta fueron en agosto de 2007, aunque hasta finales de septiembre de ese mismo año no se observaron los primeros daños en plantaciones de tomate de Águilas. Se propagó por Aragón, Navarra, Castilla La Mancha, Madrid, Extremadura, Castilla y León y País Vasco en 2008. Y finalmente alcanzó las Islas Canarias y se propagó por el resto de la Península (La Rioja, Galicia, Cantabria y Asturias) en 2009 (García-Marí y Vercher, 2010).

Como ya se ha mencionado, no se sabe con seguridad cómo ha llegado a Europa pero es conocido que los fenómenos naturales pueden dispersar plagas así como las propias actividades del hombre (movilización y comercialización de plantas y frutos), propiciando la dispersión de tuta a largas distancias (Barrientos *et al.*, 1998) como ya se ha explicado anteriormente y se ha justificado basándose en lo ocurrido en Sudamérica y otros países europeos, a pesar de los controles realizados a la mercancía de tomate importada.

En la Región de Murcia, se cree que la transmisión por medio de material vegetal de trasplante no ha tenido especial importancia en la rápida expansión que se ha producido, ya que en esta región el control de semilleros es riguroso (Monserrat, 2009).

A Europa y África se ha expandido desde España a gran velocidad, avanzando progresivamente pero con rapidez a países limítrofes. Esto hace considerar la posibilidad de que la expansión se haya llevado a cabo principalmente por el vuelo de los adultos, incluso a las islas del mediterráneo muy lejos del continente. En su expansión hacia el norte se piensa que puede haber influido, además, el transporte comercial de frutos de tomate contaminados (García-Marí y Vercher, 2010).

En 2008 y 2009, tuta fue registrada en cultivos de tomate en Italia, Francia, Grecia, Portugal, Marruecos, Argelia y Túnez (Potting, 2009). A continuación se muestra la secuencia de expansión de plaga en los diferentes países nombrados. En la primavera de 2008 se detectan los primeros focos en invernaderos de tomate en la región de Mostaganem (Argelia), en cultivo de tomate al aire libre en la región de Nador (Marruecos) (García-Marí y Vercher, 2010).

En otoño de 2008, ya está presente en invernaderos y al aire libre en varias regiones importantes en el cultivo del tomate en Italia (Liguria, Sicilia, Sardeña, Calabria, Campania), así como en Cerdeña y en la isla de Córcega. En 2009, tuta va más lejos invadiendo el centro y nordeste de Italia. Esta plaga se encontró ocasionalmente mezclada con poblaciones de otra polilla Gelechiidae invasiva *Keiferia lycopersicella* (Walshingham) (Sannino y Espinosa, 2009). En 2008 también se observa en cultivos de tomate al aire libre en la región de Akkouda en Túnez (García-Marí y Vercher, 2010). A finales de 2008, tuta fue originalmente encontrada en la isla de Corsica y en varias áreas de la Riviera francesa, y se amplió su área geográfica de distribución en 2009 a la región de Provence-Alpes-Côte d'Azur (Francia) y al suroeste Languedoc-Roussillon (Germain *et al.*, 2009). Recientemente ha alcanzado dos regiones de la costa Atlántica (Decoin, 2010). En Grecia, en 2009, esta especie estuvo presente en el continente (Prevesa, Axaia, Trifilia) y en Creta (Roditakis *et al.*, 2010). La plaga fue inicialmente registrada en varios lugares en Portugal en 2009. Además, tuta ha sido registrada en algunos países europeos con climas más fríos. En enero de 2009 se detecta en Holanda, en trampas de feromonas instaladas en una estación de embalaje de tomates procedentes de España. En la primavera de 2009, se localiza en invernaderos de tomates en Holanda y aparece por primera vez en Reino Unido en una estación de embalaje de tomates procedentes de España e Italia. También se localiza en la isla de Malta. En julio de 2009 se observa en un invernadero de tomates del Reino Unido, así como en Suiza. En septiembre de 2009 se identifica en Alemania, en noviembre en Chipre llegando incluso a finales de 2009 a la región de Kaliningrado (Rusia) (García-Marí y Vercher, 2010). También se localiza en invernaderos de tomate en Rumanía, y en invernaderos y cultivos al aire libre en Bulgaria (EC Report 2009), en Turquía (Kiliç, 2010), en Lituania y en el Medio Oriente (Bahrain, Kuwait) (Figura 1.16)

Figura 1.16. Años en los que *Tuta absoluta* fue detectada por primera vez en los países de Europa y áreas del Mediterráneo. La información proporcionada se basa en una recopilación de informes de los servicios de protección de plantas de los países que han sido invadidos por *T. absoluta* y de la Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO) (Desneux *et al.*, 2010).

Similitud climática

La comparación climática es una herramienta útil para evaluar si las especies introducidas podrían llegar a establecerse en una nueva región geográfica (Mack *et al.*, 2002). Las áreas de la cuenca mediterránea presentan condiciones climáticas similares a las áreas donde tuta existe en el sur de América, particularmente en la parte sur de Brasil, Uruguay, mayoría de los territorios argentinos y parte de Chile. En particular, temperaturas bajas constituyen un factor limitante para la supervivencia de tuta (Notz, 1992). Sin embargo, el establecimiento de esta especie a grandes latitudes se considera improbable en Europa (Potting, 2009). Basándose en el cálculo de los índices ecoclimáticos, se ha podido elaborar un mapa de la idoneidad de los climas de la cuenca mediterránea para el establecimiento de tuta en condiciones de campo (Figura 1.17). La distribución de la plaga (Figura 1.16) indica que la estimación basada en índices climáticos podría ser demasiado conservadora y el rango geográfico de la especie en Europa podría ser mayor de lo esperado. Sin embargo, hay que destacar que no se han considerado en el modelo climático ni los cultivos protegidos ni las poblaciones transitorias. Por lo tanto, en el norte de Europa la plaga podría no sobrevivir en el campo todo el año, pero sí podría permanecer durante ciertos periodos, por ejemplo en los meses de verano. También podrían ser capaces las poblaciones de establecerse permanentemente dentro de los invernaderos si éstos están disponibles durante todo el año (Desneux *et al.*, 2010).

Figura 1.17. Distribución prevista en función de los Índices Ecoclimáticos (IE) de *Tuta absoluta* en los países de Europa y norte de África. Los puntos indican el valor de los IE, con el incremento del tamaño de dichos puntos aumenta su el valor del IE. Cuanto mayor sea el valor del IE, más adecuado es el clima en ese lugar (IE~ 10: las especies podrían sobrevivir, 30: muy favorable, Sutherst *et al.*, 2007). Los parámetros biológicos de tuta usados en el modelo son de Marcano (1995), Betancourt *et al.* (1996) y Barrientos *et al.* (1998). La distribución potencial de tuta está basada en el establecimiento en Europa (a

principios de 2008) y en su presencia en el sur de América. La información de Sudamérica fue incluida (más de 150 localizaciones de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela fueron usadas durante el proceso de ajuste de parámetros) (Desneux *et al.*, 2010).

Potencial para futuras propagaciones

Se cree que el tomate es la planta hospedadora más adecuada para tuta y tiene mejor calidad nutricional que la de la patata (Pereyra y Sánchez, 2006), y el cultivo del tomate podría ser un factor determinante para el establecimiento de esta plaga en Europa y países de la cuenca mediterránea. Nueve países mediterráneos (Turquía, Egipto, Italia, España, Grecia, Marruecos, Portugal, Túnez, Argelia) son considerados productores clave de tomate (datos 2008 de la Organización de Alimentos y Agricultura, Naciones Unidas), proporcionando así un gran recurso alimenticio para tuta en dichas regiones. Por otra parte, la presencia de cultivos en invernaderos puede extender significativamente la disponibilidad de hospedadores en regiones con climas templados (como en el norte de Europa). Además, las patatas también son conocidas como hospedadores para tuta (Campos, 1976; Cisneros y Mujica, 1998). Si tuta continuara propagándose usando de hospedadores a plantas de esta familia, su extensión por Europa no sólo se restringiría a regiones en las cuales se cultiva tomate. Actualmente la literatura carece de estudios que tengan datos de poblaciones de tuta creciendo en estos hospedadores alternativos (sobre todo en las malas hierbas que se encuentran en toda Europa). Como ya se ha dicho, el comercio de tomate entre las regiones de Europa parece ser el actual método principal de expansión de largo alcance para propagar esta especie (Desneux *et al.*, 2010). Sin embargo, como ciertas especies de lepidópteros tienen una considerable capacidad de dispersión (Chen *et al.*, 1989; Fitt, 1989; Feng *et al.*, 2005), esta especie también coloniza nuevas áreas a través del vuelo (activo) o a través de las corrientes de aire (pasivo) (Desneux *et al.*, 2010).

1.1.5.- Hospedantes, daños y distribución en la planta

1.1.5.1.- Hospedantes

Conocer en qué especies vegetales se refugia esta plaga, dentro y fuera de los cultivos, ayuda a comprender el ciclo de vida y la dinámica de las poblaciones.

Es bien sabido que el hospedante preferente es el tomate (*Solanum lycopersicum*), en el cual realiza la puesta en la mayor parte de órganos aéreos (Guilardon *et al.*, 2001) y alimentándose de la hoja y del fruto completa el ciclo (Barrientos *et al.*, 1998; Estay, 2000). Otro hospedante importante, aunque aparentemente menos atractivo que el tomate, es la berenjena (*Solanum melongena* L.), puesto que tuta puede desarrollarse

también en otras solanáceas cultivadas. Dado que las larvas no entran en los frutos de la berenjena y el daño en hojas suele ser limitado, no causa daños económicos importantes. También ataca a la patata (*Solanum tuberosum* L.), en algunos sitios se encuentran los cultivos afectados, con cierto nivel de daño en hojas puesto que solo atacan la parte aérea no impidiendo directamente el desarrollo del tubérculo. Sin embargo, cuando las larvas se alimentan de la hoja puede disminuir indirectamente el rendimiento de la patata y, esto junto a condiciones climáticas apropiadas, tuta puede convertirse en una plaga para el cultivo de patata (Pereyra y Sánchez, 2006)

Otros cultivos afectados de moderada importancia son (Van der Blom *et al.*, 2011):

- Falso tomatillo del diablo (*Solanum nigrum*). Hospedante muy atractivo para tuta, tanto en zonas agrícolas como en zonas más retiradas. Planta silvestre muy común.
- Cenizo (*Chenopodium murale*). Mala hierba muy común. En invernaderos con altas poblaciones de tuta, se encuentran plantas con larvas en las hojas. Fuera de los invernaderos no es frecuente encontrar plantas afectadas.
- Gandul (*Nicotiana glauca*). Únicamente se ha observado plantas afectadas por tuta dentro de invernaderos con altas infestaciones en tomate. Parece ser un hospedante anecdótico.
- Judía (*Phaseolus vulgaris*). Se ha observado incidencia de larvas en judía solo en sitios con altas poblaciones de tuta procedente de tomate.

Dentro de los hospedadores alternativos y de baja importancia se encuentran el tomatillo (*Lycium chinense* Bertero), estramonio (*Datura stramonium* L.) (Estay, 2001; Larrain, 1987a), *Solanum muricatum* (pepino dulce), *Datura ferox* (chamico), *Lycopersicon hirsutum* (tomatillo silvestre), *Solanum elaeagnifolium* (trompillo) y *Capsicum* sp. (NAPPO, 2012; CABI, 2013)

En adición a los anteriores hospedadores, mencionar que se han encontrado casos en invernaderos de Sicilia de aguaymantoouchuva (*Physalis peruviana*) (Tropea Garzia, 2009) y también ha sido encontrada en Italia en judía (*Phaseolus vulgaris*) (EPPO, 2009) y *Lycium* sp. y *Malva* sp. (Caponero, 2009).

Esto indica que tuta tiene una amplia gama de hospedadores secundarios, la mayoría son plantas pertenecientes a la familia de las solanáceas.

1.1.5.2.- Distribución en la planta y daños

Coelho y França (1987) indican que tuta oviposita en las hojas en un 97% de los casos. Haji (1997) observa que esta plaga muestra una clara preferencia por ovipositar en hojas superiores, mientras que Leite *et al.* (1995) encuentran un mayor porcentaje de puesta en las hojas medias. Otros autores observan que la mayoría de la puesta la realizan en las hojas (73%) y sólo un 6% en frutos verdes, principalmente en los sépalos (Vercher *et al.*, 2009).

Sin embargo, al someter a las hembras a condiciones forzadas, por ejemplo, plantas sin hojas, frágiles y con un alto nivel de plaga, las hembras pueden ovipositar sobre la superficie de los frutos verdes, pero no en los maduros (Estay, 2003)

Se ha estudiado la preferencia de puesta y de alimentación de larvas en distintas variedades de tomate y los resultados constatan que no hay diferencias en cuanto a la puesta, pero sí en la alimentación de las larvas. Prefiriendo los tomates de la variedad Raf antes que los del tipo cherry y variedad kumato (Vercher *et al.*, 2010).

La distribución de la oviposición en la superficie foliar puede verse afectada por la variedad y el grado de desarrollo de la planta. Así, Torres *et al.* (2001) observan que en plantas pre-reproductivas, la puesta se produce generalmente en la zona apical de la planta, prefiriendo el envés. Por el contrario, cuando la planta se encuentra en estado post-reproductivo, las hembras prefieren poner los huevos tanto en la zona media como en la apical, y respecto a los foliolos, tanto en el haz como en el envés.

Tras la eclosión de los huevos, las larvas penetran en las hojas, tallos y frutos de la planta de tomate, donde se alimentan y desarrollan (Apablaza, 1992). Se introducen entre las dos epidermis de las hojas y conforme avanzan se van alimentando del mesófilo formando las características galerías de la tuta, las cuales son zonas translúcidas (Fernández y Montagne, 1990a). Es obvio que este daño afecta a la capacidad fotosintética de la planta y, como consecuencia disminuye la productividad. El daño causado en los tallos merma el desarrollo general de la planta y origina necrosis. La preferencia de este fitófago es la de atacar por el extremo peduncular a los frutos en estado inmaduro. Las galerías que realizan las tutas provocan deformaciones y facilitan el ataque de agentes patógenos en el fruto, favoreciendo pudriciones. Todo esto conlleva que el fruto sea inservible comercialmente (Ripa *et al.*, 1992; Apablaza, 1992). A veces, la larva sale de un fruto para introducirse en otro, dentro de un mismo racimo (López, 1991). Las pérdidas de cosecha por ataque de tuta están en el rango de 80-100% (Apablaza, 1992).

Las larvas se encuentran distribuidas preferiblemente en el estrato medio de la planta (Haji, 1997; Leite *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2001).

Las pupas se distribuyen a lo largo de toda la planta (más en las hojas que en los frutos) así como en el suelo (Coelho y França, 1987; Torres *et al.*, 2001).

1.1.6.- Ecología

Tuta es una plaga con gran capacidad de adaptación a un amplio rango de temperaturas y que en condiciones ambientales adecuadas, es capaz de completar su ciclo en menos de un mes (Vercher *et al.*, 2010).

El insecto se desarrolla tanto en zonas tropicales como en climas subtropicales y templados (Barrientos *et al.*, 1998). Su desarrollo a temperaturas elevadas puede verse mermado, así Betancourt *et al.* (1996) indican que a temperatura constante de 35°C las larvas no completan su desarrollo, pero sí lo hacen a temperaturas variables de entre 25-35 °C. Tuta se desarrolla perfectamente entre los 12 °C y los 30 °C, adaptando la duración de su ciclo a las condiciones ambientales, de tal manera que a 12°C tarda casi cuatro meses en completar su ciclo, a 30 °C lo hace en tan sólo 20 días (Vercher, *et al.*, 2010) y a 19,7 °C 39,8 días (Barrientos *et al.*, 1.998).

Según la fase de desarrollo y el autor los umbrales de desarrollo varían, pero para el ciclo completo, se puede dar un promedio de unos 8 °C de temperatura umbral y una integral térmica de 460-490 °D (Betancourt *et al.*, 1.996; Barrientos *et al.*, 1.998; Estay y Bruna, 2002). Con esta información se calcula que el número de generaciones que se podrían dar en España al año es de 13 (Vercher *et al.*, 2010).

Otro factor a tener en cuenta es el corto tiempo que pasa desde que la hembra de tuta emerge de la pupa hasta que oviposita. Los estudios de Vercher *et al.* (2010) indican que las hembras, tras emerger de la crisálida, tienen un periodo medio de pre-cópula de $21,5 \pm 1$ horas. Se acoplan una vez al día y son capaces de aparearse seis veces en toda su vida, con una duración de apareamiento de 4-5 horas cada uno. El periodo de pre-oviposición de la hembra es de 1,2 días. De este modo, desde que una hembra de tuta sale de la pupa hasta que realiza la puesta pasan entre dos o tres días. Además, la mayoría de los huevos los pone a los 3-5 días de la cópula, preferentemente al atardecer y al amanecer, cuando los adultos están más activos. Otros autores afirman que la puesta más prolífica se lleva a cabo el séptimo días tras la primera cópula, poniendo el 76% de los huevos en ese momento, con un máximo de 260 huevos por hembra (Uchôa-Fernandes *et al.*, 1995).

La elevada capacidad de multiplicación que tiene esta plaga, también puede venir explicada por el comportamiento de los adultos, los cuales están activos al amanecer y al atardecer, principalmente. Estudios realizados por Hickel y Vilella (1991) indican que las hembras llevan a cabo su llamamiento para el acoplamiento al inicio del amanecer y éste dura unas dos horas, y los machos tienen su pico de actividad una hora después de que las hembras inicien este llamamiento.

Capturas según el horario de funcionamiento.

Los ensayos realizados por Van der Blom *et al.* (2011) en Almería, activando trampas de luz en tres franjas horarias diferentes: atardecer (18:30 – 22:30h), media noche (23:00 – 3:00) y amanecer (3:30 – 7:30), indican que la máxima cantidad de polillas se capturan en las horas previas al amanecer y la menor cantidad a media noche. Los investigadores también observan diferentes comportamientos entre machos y hembras. La cantidad de hembras capturadas no difiere mucho entre las horas posteriores al atardecer y las horas previas al amanecer, pero sí es menor a media noche. En cambio, la cantidad de machos capturados es muy superior al amanecer.

Adicionalmente, se debe considerar la extraordinaria capacidad de búsqueda que tienen los adultos de tuta, que son atraídos hacia las plantas de tomate por unas sustancias volátiles que éstas emiten (Junta de Andalucía, 2010; Monserrat, 2010).

En España, la polilla del tomate está activa todo el año, capturándose adultos desde enero a diciembre ininterrumpidamente. Las zonas costeras de producción de tomate de Murcia se caracterizan por tener una climatología muy favorable durante todo el año, con inviernos muy suaves que permiten la producción de tomates de gran calidad en cualquier época. En verano, los ciclos de la plaga se completan con una gran rapidez, en poco más de tres semanas, y tan solo se ha detectado un momento de una fuerte reducción de las poblaciones en algunas zonas, coincidiendo con una “ola de calor”, durante la que se superaron temperaturas de 42°C con muy bajas humedades, lo que pudo afectar a la viabilidad de huevos y larvas (Monserrat, 2009).

Supervivencia de la plaga - Efecto de la solarización sobre tuta

Cuando tuta ha pasado por sus cuatro estadios larvarios y está próxima a pupar, parte de la población pupa en la planta y el resto, con ayuda de un hilo de seda, se deja caer al suelo para buscar refugio y crisalidar. Este fenómeno provoca la “contaminación de los suelos”, de los que pueden estar emergiendo adultos de la plaga durante varias semanas, que se van apareando, para continuar con las puestas y propagación de la plaga (Monserrat, 2009).

Una vez levantada una plantación de tomate afectada por tuta y retirados todos los restos vegetales, el tiempo de supervivencia de esta plaga en el terreno puede variar entre 4 y 6 semanas (5 a 15 días en pupa, desde que la larva alcanza el suelo, más unos 15 a 25 días en adulto, los cuales se irán apareando, para finalmente quedar mayoritariamente, hembras fecundadas, más longevas que los machos), pudiéndose prolongar este período, si las temperaturas son bajas. Si hay restos vegetales, especialmente frutos contaminados sobre el terreno, a esas 4-6 semanas, habría que sumarles de 1 a 4 adicionales, durante las cuales continúa habiendo riesgo de propagación (Monserrat, 2009).

Estudios realizados por Van der Blom *et al.* (2011) en invernaderos de Almería concluyen que la solarización durante una semana en el mes de mayo (previamente arrancado el cultivo) es suficiente para controlar más del 95% de tuta que se encuentra en el suelo. Y con dos semanas de solarización se conseguiría un control del 100%.

Van der Blom *et al.* (2011) también llevaron a cabo estudios sobre la altura a la que se mueven los adultos de tuta dentro del invernadero. Para ello colocaron trampas de luz a tres alturas diferentes y evaluaron las capturas. De los resultados se puede concluir que la mayor cantidad de polillas adultas se atrapa a poca distancia del suelo (0,2 metros); la segunda mayor cantidad justo por encima de la cabeza de la planta (2 metros) y la menor cantidad a media altura (1,20 metros).

Sin embargo, Monserrat (2009) indica que, a pesar de no haber realizado ninguna experiencia ni controles directos sobre el efecto que las trampas de luz (tanto blanca como ultravioleta) pueden tener sobre el control de la polilla del tomate, dichas trampas en campo atraen bastante a los adultos de tuta, tanto machos como hembras. Además, aporta que estas trampas no serían capaces de eliminar a muchas de las hembras, antes de que éstas hubieran realizado la oviposición sobre las plantas más cercanas a la trampa. Asimismo, atraen a numerosos individuos del exterior, si no están perfectamente cerradas las parcelas, lo que incrementa todavía más, la presión de plaga.

1.2.- Control

Tuta es una plaga importante en el cultivo de tomate en el sur de Europa y norte de África. La aparición de tuta ha estimulado un amplio uso de insecticidas por parte de los productores de tomate lo cual puede causar multitud de efectos secundarios no deseados (Weisenburger, 1993; Desneux *et al.*, 2007). Además, el uso abusivo de insecticidas puede provocar la creación de resistencia en la plaga. La propagación de tuta en toda la producción de tomate en el sur de Europa y la falta de opciones para la

gestión eficaz de la misma, provoca la necesidad urgente de estrategias de manejo de producción integrada de la plaga (Monserrat 2009, 2010).

Las estrategias de manejo de plagas pueden incluir diferentes combinaciones de las medidas de control culturales, biotecnológicas, biológicas y químicas, limitando así, el impacto de los cultivos invadidos por tuta. Para comenzar, hay que partir de una parcela limpia llevando a cabo solarización o biosolarización del terreno. Como medidas culturales se puede optimizar la estructura de los invernaderos, usar doble puerta, evitar plantas hospedadoras alternativas (eliminar reservorios) y eliminar órganos infestados (de cualquier cultivo) (Desneux *et al.*, 2010). Hay que recordar que los adultos de tuta son atraídos por las kairomonas que emite el tomate y tienen una gran capacidad de búsqueda, pudiendo entrar fácilmente por las pequeñas aberturas que puedan quedar en las estructuras. Como medida preventiva y suplemento a dichas medidas de higiene, la colocación de trampas cromotrópicas puede contribuir a eliminar los adultos que pudieran haber quedado. Además, la planta del semillero debe ir limpia de plaga (Monserrat, 2010). A continuación, se comienzan rigurosos protocolos de muestreo que combinan la observación directa (registro de daños directos) con la captura con feromonas para conocer la abundancia de adultos (Desneux *et al.*, 2010). Las trampas con feromona sexual de la hembra de tuta pueden ayudar en mayor o menor medida en función de las condiciones en las que se utilicen, pero no atraen individuos a la parcela. Sin embargo, el uso de trampas luminosas sí puede atraer individuos y que éstos (tuta y otros lepidópteros) entren en las instalaciones y las trampas no siempre van a eliminar a los individuos. Como suplemento a otras estrategias para retardar la evolución de la población de la polilla del tomate se pueden usar las trampas de agua para captura masiva de machos (Monserrat, 2010).

Cuando aparece tuta en las trampas de feromonas, es aconsejable iniciar los tratamientos preventivos con *Bacillus thuringiensis* y ocasionalmente se pueden realizar sueltas de míridos depredadores. Como apoyo a esta estrategia, también se pueden hacer sueltas del parasitoide de huevos *Trichogramma achaeae* (Cabello *et al.*, 2009b). Dentro de las estrategias de manejo de producción integrada, el control biológico puede ser una herramienta clave ya que los enemigos naturales endémicos pueden ayudar a mantener esta plaga bajo control (Desneux *et al.*, 2010).

Los tratamientos fitosanitarios son otra herramienta que habrá que utilizar en algún momento para controlar las poblaciones de tuta. La compatibilidad de los compuestos con la fauna auxiliar y la presión de plaga, son condiciones esenciales para controlar la evolución de la plaga a lo largo de todo el ciclo de cultivo. Conocer en qué momento y

condiciones se ha de hacer cada tratamiento es esencial para realizar un uso adecuado de los productos fitosanitarios. Se pueden establecer dos momentos de aplicación que dependen del estado de la plaga en la parcela: tratamientos “preventivos” cuando hay una presencia importante de adultos, los cuales podrían estar poniendo huevos sobre el cultivo, sin observar todavía larvas. Y tratamientos “específicos” o de choque, donde las galerías tienen presencia de larvas activas. Normalmente van dirigidos contra larvas de primer y segundo estadio, aunque hay productos que son eficaces hasta larvas de tercer estadio, incluso larvas de cuarto estadio (Monserrat, 2010).

1.2.1.- Control biológico

Cuando aparece una nueva plaga, para llevar a cabo su control biológico se pueden importar los enemigos naturales desde la zona de origen o estudiar los enemigos naturales autóctonos para comprobar si se pueden adaptar a esta nueva plaga (Cabello, 2009c), acelerando el proceso natural.

Se presenta un gran problema respecto a importar los enemigos naturales puesto que la zona de origen de tuta no está aclarada (Cabello *et al.*, 2009a). El depredador *Nabis punctipennis* y los parasitoides de huevos *Trichogramma pretiosum*, *T. fasciatum* y *T. rojasi* son citados como enemigos naturales de tuta, así como un registro importante de parasitoides de larvas y entomopatógenos (Cabello *et al.*, 2009b).

En la península ibérica se han destacado y estudiado dos especies de ectoparasitoides de larvas del género *Bracon* y un parasitoide de huevos, *Trichogramma achaeae*. También se han evaluado como depredadores un nábido, *Nabis pseudoferus* y dos míridos, *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*. Además, la incidencia por virus de la granulosis, Gvta, es cada vez mayor (Cabello *et al.*, 2009b).

Las especies de *Trichogramma* que se han empleado para el control de lepidópteros plaga en masas forestales y en cultivos al aire libre como organismos de control biológico (OCB), no han tenido un éxito comparable en cultivos de invernaderos. Por el contrario, *T. brassicae* y *T. evanescens* utilizadas en Europa, han sido más exitosas. *T. achaeae* se adapta mejor a dichas condiciones de invernadero (Kabiri *et al.*, 2010).

En la Tabla 1.1 se muestran los enemigos naturales que se encontraron de forma espontánea en la cuenca mediterránea cuando tuta llegó al Mediterráneo.

Tabla 1.1. Enemigos naturales de tuta encontrados en la cuenca mediterránea (Desneux *et al.*, 2010).

Orden	Familia	Especie	Estadio preferente	Referencia bibliográfica
Parasitoide				
Hymenoptera	Eulophidae	<i>Necremmus artynes</i> (Walker)	L ₂ -L ₃	Mollá <i>et al.</i> (2008), Gabarra y Arnó (2010)
		<i>Hemiptarsenus zilahisebessi</i> Erdös	L ₂ -L ₃	Gabarra y Arnó (2010)
	Braconidae	Braconidae sp.	-	Mollá <i>et al.</i> (2008), Gabarra y Arnó (2010)
	Trichogrammatidae	<i>Trichogramma achaeae</i> Nagaraja & Nagarkatti	Huevos	Cabello <i>et al.</i> (2009b)
		<i>Trichogramma</i> sp.	Huevos	Mollá <i>et al.</i> (2008), Gabarra y Arnó (2010)
Depredador				
Hemiptera	Miridae	<i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter	Huevos y larvas jóvenes	Mollá <i>et al.</i> (2009), Arnó <i>et al.</i> (2009), Urbaneja <i>et al.</i> (2009)
		<i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur)	Huevos y larvas jóvenes	Mollá <i>et al.</i> (2009), Arnó <i>et al.</i> (2009), Urbaneja <i>et al.</i> (2009)
		<i>Dicyphys marrocannus</i> Wagner	Huevos y larvas jóvenes	Mollá <i>et al.</i> (2010)
	Nabidae	<i>Nabis (Nabis) pseudoferus ibericus</i> Remane	Larvas	Cabello <i>et al.</i> (2009a)
Hymenoptera	Vespidae	Undetermined species	Larvas	Mollá <i>et al.</i> (2008)
Acari	Phytoseiidae	<i>Amblyseius swirskii</i> Athias-Henriot	Huevos (en berenjena)	Mollá <i>et al.</i> (2010)
		<i>Amblyseius cucumeris</i> (Oudemans)	Huevos (en berenjena)	Mollá <i>et al.</i> (2010)

De los ensayos de semi-campo realizados por Cabello *et al.* (2009a) se obtuvo que ambas especies, *T. achaea* y *N. pseudoferus*, tienen un elevado potencial como agentes de control, presentando valores de eficacia del 91,74% para el parasitoide y 92-96% para el depredador. Por otro lado, no se dispone de la información suficiente de la biología y ecología de los nábidos, lo cual plantea problemas para su establecimiento y permanencia en el cultivo (Cabello *et al.*, 2009a). Para el control de otras plagas como es el pulgón, sí que está mostrando resultados satisfactorios, pero para el control de tuta es mejor la utilización de parasitoides. Esto puede ser debido por los menores costes de producción y utilización (Cabello *et al.*, 2010).

En trabajos donde se aplicó *T. achaea* como OCB principal, la eficacia del parasitoide se situó entre el 86,7 y 97,5% medida por la Tasa Marginal de Ataque (TMA) (Cabello *et al.*, 2009b). Sin embargo, cuando se empleó *N. tenuis*, su eficacia fue del 28,6 al 33,3% de depredación de huevos de la plaga, en ciclo de primavera-verano (Cabello, 2009a) y menos de la mitad (13,7%) en tomate de ciclo de invierno; con valores del 19,7% en la parte alta de la planta, respecto a sólo 7,7% en la parte media.

Sin embargo, Mollá *et al.* (2009) afirman que *Nesidiocoris tenuis* Reuter y *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) son capaces de controlar las poblaciones de tuta cuando dichos enemigos naturales están correctamente establecidos en el cultivo. Además, Urbaneja *et al.* (2009) y Arnó *et al.* (2009) a partir de ensayos de laboratorio, demostraron que ambos depredadores son capaces de consumir un alto número de huevos de tuta y por el contrario, el consumo de larvas de lepidóptero es bastante escaso. Arnó *et al.* (2009) concluyeron que si hay 4,5 míridos o más por planta, el nivel de daño en el cultivo permanece por debajo del 4%. Todo esto ayuda a la confirmación de lo que ya afirmaba Monserrat (2009), para que se dé un buen control de tuta las poblaciones de míridos han de estar bien establecidas en el cultivo. Además, *N. tenuis* es una herramienta fundamental para el control de otras plagas como mosca blanca o trips (Urbaneja *et al.*, 2008; Arnó *et al.*, 2009).

Para controlar tuta y *Bemisia* en invernaderos de tomate, Belda *et al.* (2010) consideran que la estrategia pretrasplantees una buena alternativa. Ésta consiste en liberar 0,25 parejas/planta de *N. tenuis* 5 días antes del trasplante. Los autores afirman que se puede ejercer un control eficaz de ambas plagas debido al elevado nivel poblacional desde el inicio del ciclo del cultivo. Además, dicho tratamiento también podría controlar otras plagas ya que *N. tenuis* depreda arañas rojas, diversas especies de orugas y minador.

A pesar de todo lo dicho, en campo se observan simultáneamente grandes poblaciones de *N. tenuis* y graves daños de tuta, lo cual hace dudar de la eficacia de este mírido (Van der Blom *et al.*, 2011).

Aparte de los míridos, ácaros depredadores como *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot y *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae), se consideran prometedores para depredar huevos de tuta (Desneux *et al.*, 2010).

En América del Sur (zona de origen de tuta), los parasitoides son los enemigos naturales más empleados para el control biológico de esta plaga. En España, larvas de tuta parasitadas por el eulófido *Necremnus artynes* han sido encontradas por Molla *et al.* (2008).

El ectoparasitoide de microlepidópteros, *Necremnus artynes*, que parasita principalmente el tercer estadio larvario de tuta, tarda 16 días de huevo a adulto a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. *H. zilahisebessi* es un ectoparasitoide que ataca larvas de dípteros y lepidópteros minadores y se encontró parasitando larvas de *L. trifolii* y *L. bryoniae* en Andalucía en invernaderos de sandía, tomate y melón (Cabello *et al.*, 1994) y en cultivos de gerbera y tomate en Cataluña sobre *L. trifolii* (Haro, 1996). La duración de desarrollo de huevo a adulto cuando parasita a tuta a 25°C es de 15 días. Puesto que la duración de desarrollo de huevo a adulto de tuta a las mismas condiciones de temperatura es de 23 días, cabe resaltar que a temperatura elevada se desarrollan más rápidamente que la plaga ambos parasitoides (Gabarra y Arnó, 2010).

En 2014 ya se habían descubierto 41 taxones de parasitoides de larvas y pupas de tuta, de 6 familias diferentes en los países del Mediterráneo (Gabarra *et al.*, 2014). Hasta el momento, *Necremnus tutae* Ribes & Bernardo (Hymenoptera: Eulophidae), antes conocido como *N. sp. nr. artynes* y recientemente clasificado como una especie nueva es el parasitoide más importante (Gebiola *et al.*, 2015). *N. tutae* es un ectoparasitoide idiobionte y se encuentra en casi todos los países Mediterráneos y su cría, para la venta commercial no ha tenido éxito. Las hembras de este ectoparásito, paralizan a las larvas de tuta y ponen huevos su lado, desarrollándose sus larvas al lado de la tuta muerta, formando la pupa dentro de la misma galería. Es fácil el reconocimiento en campo de estos Eulophidae ya que las larvas de tuta, una vez son parasitadas mueren dentro de las galerías. Además de ser parasitoides, las hembras de *N. tutae* se alimentan de las larvas de tuta (host feeding), aumentando así el control de la polilla del tomate (Van der Blom *et al.*, 2016). Incluso en ocasiones puede causar más mortalidad depredando que parasitando, esto es así porque se ha observado que *N. tutae* prefiere parasitar

larvas de tercer estadio y alimentarse como depredador de larvas de segundo estadio (Calvo *et al.*, 2013).

González-Cabrera *et al.* (2010) afirman que formulados comerciales basados en *Bacillus thuringiensis* pueden ser una buena alternativa para el control de tuta ya que se han usado para controlar otros insectos plaga con éxito. Para el caso de tuta, diversos estudios llevados a cabo en la zona de origen demostraron que *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki (Btk) puede ser muy efectivo contra varios estadios larvarios de la polilla del tomate, lo cual puede verse favorecido usando genotipos resistentes al ataque de la plaga (Giustolin *et al.*, 2001). Los ensayos llevados a cabo tanto en laboratorio, invernadero, como en cultivos al aire libre han evidenciado que *Bacillus thuringiensis* es eficaz en el cultivo de tuta. Las L1 fueron las más susceptibles, siendo la sensibilidad menor en el segundo y tercer estadio larvario. Además, los autores añaden que este método de control se podría combinar con otro más específico de huevos, como puede ser el uso de parasitoides o depredadores (González-Cabrera *et al.*, 2010). En la cuenca mediterránea se han obtenido resultados prometedores en laboratorio, invernaderos y cultivo al aire libre de tomate en Valencia con formulados a base de *Bacillus thuringiensis*. Los compuestos que se estudiaron redujeron hasta en un 90% los daños (González-Cabrera *et al.*, 2010).

Asimismo, estudios llevados a cabo con aislados naturales de Chile demostraron que la efectividad de los compuestos comerciales se puede mejorar seleccionando adecuadamente las cepas de Bt usadas como ingrediente activo (Niedmann y Meza-Basso, 2006).

Además, la apropiada expresión de la toxina Cry1Ab en otras especies de *Bacillus* (las cuales tienen la capacidad de colonizar el filoplano de las hojas), insinúa que existe la posibilidad de una reducción en el número de aplicaciones insecticidas. Esto es debido a que dichas especies se mantienen en el filoplano durante 45 días y por tanto, el nivel de toxina que se mantiene de forma “natural” sería imposible alcanzarlo con los formulados habituales (Theoduloz *et al.*, 2003).

Un método de lucha compatible con el control biológico para el control de tuta es la confusión sexual. Tras ciertos estudios realizados, Navarro Llopis *et al.* (2010) concluyeron que para alcanzar la confusión sexual en tuta es esencial el aislamiento de los invernaderos, no realizar tratamientos específicos para esta plaga, que la carga de la feromona mínima sea de 40g/ha y que la emisión de dicha feromona se dé en todo el proceso, desde el inicio de las capturas de adultos en trampas delta hasta el final del ensayo.

Los hongos entomopatógenos, tales como *Beauveria bassiana* también pueden ser agentes prometedores para el control de tuta en cultivos al aire libre en combinación con Bt (Torres Gregorio *et al.*, 2009).

1.2.2.- Control químico

Las larvas de tuta se mantienen la mayor parte de su vida en el interior de las galerías, por tanto se encuentran resguardadas de los insecticidas (Ripa *et al.*, 1992). Así que para que tenga efecto el producto con el que se trata el cultivo, debe ser de acción translaminar y de contacto (Larrain, 1987), tener efecto residual y actuar por ingestión (Urbaneja *et al.*, 2007). Así, el estado larvario estará bajo control conforme se va alimentando del tejido vegetal ya tratado (López, 1991). Como ya se ha comentado, los adultos ponen la mayoría de los huevos en el envés de las hojas y esta parte no suele quedar bien tratada con los insecticidas. Esto junto con los tricomas que posee la planta de tomate, evitan una correcta impregnación de la misma. Por tanto, es esencial que el tratamiento cuente con el volumen necesario junto con un mojante apropiado (Urbaneja *et al.*, 2007).

1.3.- Resistencia a insecticidas

1.3.1.- Definición

Los productos químicos usados para el control de plagas que dañan cultivos y plantas ornamentales son apreciadas herramientas. Pero la eficacia de esta valiosa herramienta se puede ver disminuida a causa de un proceso de selección conocido como resistencia a insecticidas. Dicha resistencia consiste en un cambio heredable en la susceptibilidad de una población de una plaga, el cual es observado cuando un producto no controla la plaga como es esperado siguiendo las instrucciones de la etiqueta del producto para la plaga y cultivo en cuestión. La creación de resistencias a un acaricida o insecticida se produce cuando se utiliza mal un producto o se lleva a cabo un uso abusivo para controlar la plaga. La consecuencia de este hecho es la selección de poblaciones resistentes a ese insecticida o acaricida (IRAC¹, 2017).

1.3.2.- Mecanismos de resistencia

Se conocen cuatro tipos de mecanismos de resistencia en plagas.

¹Insecticide Resistance Action Committee. Grupo de trabajo fundado en 1984, constituido por las empresas productoras de fitosanitarios con el fin de evitar o retrasar la aparición de cepas de insectos o ácaros resistentes a los insecticidas y acaricidas, dictando las directrices de empleo de estos productos.

1.3.2.1.- Resistencia por comportamiento

La resistencia por comportamiento, en realidad no se puede considerar una resistencia como tal porque consiste en un cambio en el comportamiento de los insectos. Éstos evitan entrar en contacto con el insecticida y sobreviven a diferencia de los susceptibles. Por tanto, esta resistencia es llamada pseudoresistencia ya que si los insectos resistentes tuvieran contacto directo con el insecticida en vez de sortear el producto, morirían. Este tipo de resistencia no genera grandes problemas de resistencia en el campo (Bielza, 2010).

1.3.2.2.- Resistencia por penetración reducida

Los individuos que poseen este tipo de resistencia, tienen modificada la cutícula y por tanto la penetración del insecticida se ve reducida. Como consecuencia, disminuye la cantidad de insecticida que entra en el cuerpo del insecto. En caso contrario, los insectos susceptibles poseen una cutícula normal y el insecticida penetra sin problemas alcanzando el punto de acción y matando al insecto. Por tanto, a los insectos que poseen este tipo de resistencia no les penetra la cantidad suficiente de insecticida a través de la cutícula para matarlo (Bielza, 2010).

1.3.2.3.- Resistencia metabólica

Este tipo de resistencia es la más común en campo y es la que genera la mayor parte de problemas de resistencia. Al igual que sucede con las plantas y animales, los ácaros e insectos también poseen varios sistemas enzimáticos que detoxifican las toxinas que entran en su cuerpo. Además, estas enzimas también pueden metabolizar y degradar los insecticidas. En un insecto susceptible, cuando el insecticida penetra en su cuerpo, los enzimas de detoxificación metabolizan las moléculas del insecticida. Pero al poseer un sistema de detoxificación básico, los enzimas no son capaces de degradar todas las moléculas alcanzando algunas el punto de acción y provocando la muerte del insecto. Por el contrario, un insecto resistente tiene un sistema de detoxificación mejorado que degrada todas o la mayoría de las moléculas del insecticida, sobreviviendo al tratamiento insecticida. Esto es así porque posee más enzimas de detoxificación y/o nuevas enzimas modificadas que son más eficaces y con mayor afinidad por el compuesto insecticida (Bielza, 2010).

Existen tres sistemas enzimáticos responsables de la resistencia a insecticidas: las P450 monooxigenasas (Oxidadas de Función Múltiple, OFM), las esterasas y las glutatión S-transferasas (GST) (Bielza, 2010).

1.3.2.4.- Resistencia en el punto de acción

Esta es considerada la resistencia más importante ya que le da al insecto un elevado nivel de resistencia. Cada insecticida tiene un lugar de acción donde actúa provocando su efecto plaguicida, poseen un punto de acción en el insecto. Tras el tratamiento, el insecticida llega al punto de acción del insecto, se acopla y provoca su efecto mortal. Los insectos que tienen este tipo de resistencia tienen modificado el punto de acción, es un cambio genético que evita que la molécula del insecticida se acople y por tanto no se da ningún efecto del insecticida (Bielza, 2010).

Las resistencias más importantes son la metabólica y la del punto de acción (Bielza, 2010). Alternando insecticidas con diferentes modos de acción, se puede evitar el desarrollo de este tipo de resistencia.

1.3.3.- Resistencias cruzadas

Cuando una plaga desarrolla resistencia a un producto, es frecuente que dicha resistencia también afecte negativamente a otros compuestos químicamente relacionados. Esto se debe a que los compuestos que se encuentran dentro de un subgrupo químico, comparten el mismo modo de acción. Por lo tanto, hay un alto riesgo de que la resistencia que se ha desarrollado confiera automáticamente resistencia cruzada a los compuestos que se encuentran dentro del mismo subgrupo. Este es el concepto de resistencia cruzada y sucede dentro de una familia de insecticidas o acaricidas químicamente relacionados. Esto se suele dar cuando hay resistencia en el punto de acción. Sin embargo, si el mecanismo de resistencia es metabólico, también puede afectar a otros insecticidas aunque pertenezcan a distintos modos de acción o grupos químicos ya que pueden ser degradados por un mismo sistema enzimático (IRAC, 2017).

1.4.- Resistencia a insecticidas en *Tuta absoluta*

El control de tuta se basa en gran medida en el control químico mediante insecticidas tales como organofosforados, piretroides, indoxacarb, spinosad, emamectina benzoato y diamidas. Diversos estudios han demostrado que esta plaga tiene gran potencial para desarrollar resistencia a muchas clases de insecticidas e ingredientes activos, los cuales comprometen la eficacia del control químico (Siqueira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2011, 2015, 2016; Haddi *et al.*, 2012; Roditakis *et al.*, 2013a, 2015; Campos *et al.*, 2014).

Se conocen diversos casos de resistencia de tuta a insecticidas en diferentes países de Sudamérica a causa del uso descontrolado y prolongado de los mismos. Se ha localizado resistencia a piretroides y organofosforados en Chile (Larraín, 1986; Salazar

y Araya, 1997, 2001), a organofosforados en Bolivia (Moore, 1983), a cartap, abamectina, permetrina y metamidofos en Brasil (Siqueira *et al.*, 2000, 2001) y a abamectina y piretroides en Argentina (Lietti *et al.*, 2005). En consecuencia, es imprescindible fijar umbrales de tratamiento que ayuden a disminuir los problemas de resistencias y el efecto de los plaguicidas, junto con el control biológico (Vercher *et al.*, 2010).

Los piretroides son una importante clase de insecticidas sintéticos ampliamente usados para el control de muchos artrópodos plaga, incluyendo tuta, como resultado de su rápida acción, alta actividad insecticida y baja toxicidad en mamíferos (Rinkevich *et al.*, 2013). Esta clase de insecticidas se registraron por primera vez en Brasil en 1980 para el control de tuta (Morais y Filho, 1982). La primera resistencia creada por tuta al piretroide permetrín fue en el año 2000 en poblaciones de Brasil (Siqueira *et al.*, 2000). Desde entonces, la resistencia a bifentrin y deltametrin en poblaciones del mismo país ha sido descrita (Silva *et al.*, 2011). Hasta la fecha, las dosis recomendadas en las etiquetas de los productos de permetrín, deltametrín y alfa-cipermetrín, controlan totalmente las poblaciones de tuta de un estudio realizado con poblaciones de tuta de diferentes zonas de Brasil (Silva *et al.*, 2011; Gontijo *et al.*, 2013).

Debido a las pérdidas de efectividad en tuta de los organofosforados y piretroides, los cuales se han utilizado durante años en Chile (Salazar y Araya, 1997, 2001), se introdujeron insecticidas con nuevos modos de acción como es el caso de spinosad, el cual fue registrado en Chile en 2007 (SAG, 2011). Debido a su único modo de acción tiene un elevado poder insecticida contra larvas de lepidópteros (Cleveland *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009). Sin embargo, algunas especies han desarrollado resistencia a este compuesto (Shelton *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2007; Sayyed *et al.*, 2008).

En Brasil sucedió algo similar a finales de los 90 y principios del año 2000. El problema de desarrollo de resistencia condujo a que se registraran y usaran a gran escala nuevos insecticidas, incluyendo reguladores de crecimiento, indoxacarb, clorfenapir, espinosinas y diamidas (Guedes y Picanço, 2012; MAPA 2014; Guedes y Siqueira, 2012).

Hay estudios que muestran que algunos lepidópteros pueden desarrollar resistencias rápidamente a spinosad. Como es en el caso de una población de Brasil (Iraquara) de tuta, la cual fue seleccionada en laboratorio a spinosad y en la séptima generación la población ya mostraba un aumento de 5.000 veces en el nivel de resistencia, más de 18.000 veces respecto a la población sensible de referencia (Campos *et al.*, 2014); lo

mismo sucedió en una población de Portugal de tuta, la cual fue seleccionada en laboratorio durante once generaciones y se obtuvo un factor de resistencia a spinosad de 277 (Berger *et al.*, 2016).

Las diamidas es una familia de insecticidas relativamente nueva en el mercado para el control de las plagas que se alimentan de los cultivos, en concreto de las larvas de los lepidópteros (Nauen, 2006; Jeanguenat, 2013). La diamida flubendiamida (Tohnishi *et al.*, 2005; Hirooka *et al.*, 2007) fue introducida en 2006, seguida de las diamidas antranílicas clorantraniliprol y ciantraniliprol (Lahm *et al.*, 2007, 2009). Flubendiamida y clorantraniliprol son altamente efectivas contra un amplio rango de lepidópteros plaga a bajas dosis de aplicación, presentan baja toxicidad para mamíferos, un perfil medioambiental favorable y puede ser usado en programas de producción integrada (Tohnishi *et al.*, 2005; Lahm *et al.*, 2007). Ciantraniliprol no se encuentra autorizado todavía en España.

Roditakis *et al.*, (2015) obtuvieron resultados muy interesantes de resistencia a dos diamidas, clorantraniliprol y flubendiamida, en poblaciones de Grecia e Italia. Los factores de resistencia observados más elevados para clorantraniliprol y flubendiamida en las poblaciones italianas, respecto a la población sensible, son 2414 y 1742, respectivamente. Hay que destacar la elevada resistencia que muestran estas poblaciones de tuta italianas a las diamidas nombradas. En las poblaciones de Grecia los factores de resistencia más altos son 14 para clorantraniliprol y de 11 para flubendiamida (Roditakis *et al.*, 2015).

Dos años más tarde, Roditakis *et al.* (2017) estudiaron la susceptibilidad de tres poblaciones de laboratorio, cinco poblaciones de campo tomadas de Italia, Grecia, España y Brasil y una población seleccionada a clorantraniliprol originaria de Italia. Los factores de resistencia de las poblaciones de campo varían entre 8 (población española) hasta más de 3000 (población de Brasil). La población seleccionada a clorantraniliprol durante 4 generaciones muestra un ratio de resistencia de 4 veces respecto a su progenitor (Roditakis *et al.*, 2017). Este bajo factor de resistencia puede ser debido a que la población ya era bastante resistente y no se puede seleccionar mucho más puesto que no quedan más individuos sensibles en la población.

También se ha observado el desarrollo de resistencia de tuta a indoxacarb. Roditakis *et al.* (2016b) estudiaron la susceptibilidad a este compuesto en una población sensible de tuta y dos de campo, una de Italia y otra de Grecia. Los factores de resistencia que muestran son de 11 para la población italiana y de 23 para la griega (respecto a la sensible de laboratorio). Una vez realizadas dos selecciones en la población griega, este

factor aumenta considerablemente mostrando un factor de 1794 (Roditakis *et al.*, 2016b).

1.4.1.- Mecanismos de resistencia a insecticidas en *Tuta absoluta*

Se conoce que en la resistencia al cartap, el principal mecanismo de resistencia de tuta podría ser el de las P450 monooxigenasas (inhibe el citocromo P450 monooxigenasas), teniendo en cuenta que pueden tener un papel secundario tanto las esterasas como las glutatión S-transferasas (GST). En el estudio realizado por Siqueira *et al.* (2000) se ensayaron siete poblaciones brasileñas y en la mayoría, el sistema enzimático de las P450 monooxigenasas disminuyó la susceptibilidad al cartap a través del butóxido de piperonilo (PBO).

Un año más tarde, Siqueira *et al.* (2001) realizaron un estudio con abamectina y seis poblaciones de campo más una sensible de referencia de tuta de Brasil. Al bioensayar las poblaciones con los sinergistas, se observó reducción de la resistencia al aplicar el butóxido de piperonilo, lo que sugiere que hay una actividad elevada de las P450 monooxigenasas en este insecto, confiriéndole un mecanismo de resistencia a abamectina. El sinergista DEF suprime la resistencia totalmente de cuatro poblaciones y parcialmente en dos de ellas, lo cual aporta que las esterasas también están implicadas en el mecanismo de resistencia en estas poblaciones brasileñas de tuta (Siqueira *et al.*, 2001).

En varios insectos, la resistencia metabólica a piretroides ha sido asociada con elevados niveles del citocromo P450 monooxigenasas (P450s), carboxilesterasas (CEs) y glutatión S-transferasas (GSTs) (Low *et al.*, 2007; Ranson *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2015).

En otros insectos se ha demostrado que la elevada expresión de esterasas, confiere niveles moderados de resistencia a los piretroides (Li *et al.*, 2007).

Reyes *et al.* (2012) aportan que el mecanismo más ampliamente distribuido en poblaciones chilenas resistentes a spinosad de tuta está relacionado con el sistema enzimático P450 monooxigenasas. Este mecanismo ya ha sido relacionado con la resistencia a spinosad en otros lepidópteros (Wang *et al.*, 2006, 2009). Por otro lado, los ensayos con las poblaciones chilenas resistentes a spinosad con DEF y DEM muestran que la actividad de las glutatión S-transferasas y esterasas tienen un papel secundario en la resistencia de tuta a spinosad (Reyes *et al.*, 2012).

Sin embargo, en otros estudios realizados con los sinergistas no se encuentran diferencias significativas entre los bioensayos de la población resistente de tuta a

spinosad con y sin sinergista. Esto sucede en una población de tuta de Portugal resistente a spinosad al bioensayarla con el sinergista PBO (Berger *et al.*, 2016), y en una población de Brasil de tuta resistente al mismo insecticida al bioensayarla con los sinergistas PBO y DEF (Campos *et al.*, 2014). Estos resultados muestran que tales sistemas enzimáticos tienen un papel mínimo en la resistencia a spinosad, alejándose de la teoría de Reyes *et al.* (2012).

A pesar de ser relativamente nuevas en el mercado las diamidas, ya se vienen observando resistencias de tuta a estos insecticidas. Roditakis *et al.* (2017) estudiaron el mecanismo de resistencia involucrado en una población de Italia resistente a flubendiamida y clorantraniliprol. Para ello bioensayaron con ambas diamidas los sinergistas PBO, DEF y DEM. Los resultados muestran que hay un impacto bastante limitado de estos mecanismos de detoxificación en la resistencia. Tan sólo se observa la posible presencia de un mecanismo de resistencia a través de las esterasas para clorantraniliprol en particular. Por ello, Roditakis *et al.*, (2017) indican que existe claramente la presencia de un mecanismo de resistencia adicional.

Es importante conocer que el insecticida indoxacarb se metaboliza en su forma activa (responsable del efecto tóxico) dentro del insecto, es un pro-insecticida. La activación de este insecticida la realizan algunas esterasas, por tanto el mecanismo de resistencia a piretroides es causado por un incremento de la actividad de las esterasas, que a la vez también producen una mayor tasa de activación de indoxacarb (Gunning y Devonshire, 2002).

Para conocer el papel de las enzimas de detoxificación en la resistencia a indoxacarb, Roditakis *et al.* (2016b) bioensayaron el efecto de los sinergistas en la eficacia de indoxacarb frente a la población sensible. La inhibición de las enzimas metabólicas citocromo P450s y carboxilesterasas por PBO y DEF (pero no DEM) provocó un ligero aumento la toxicidad de indoxacarb (hasta 4 veces). Los niveles de actividad de las carboxilesterasas fueron significativamente mayores en la población resistente a indoxacarb, en comparación con la población sensible, mientras que no hubo aumento significativo en la actividad observada en GSTs o P450s en la población resistente, en comparación con la susceptible.

Hasta el momento, la información que se dispone de resistencias de tuta a indoxacarb es de poblaciones de Grecia, Italia, Israel, España y Brasil en las que se ha observado niveles bajos de resistencia (<30) (Roditakis *et al.*, 2013b, 2016a; Silva *et al.*, 2016; Bielza *et al.*, 2016).

Respecto a emamectina y metaflumizona poco se conoce de los mecanismos de resistencia de tuta.

1.4.2.- Estrategias de manejo de la resistencia en tuta

En primer lugar, para establecer una estrategia eficaz de manejo de la resistencia, es imprescindible saber qué mecanismos de resistencia pueden afectar a cada insecticida. Sin embargo, muchas veces y en concreto cuando se estudia una plaga y/o producto prácticamente nuevo, no se conocen con exactitud los mecanismos de resistencia que pueden estar involucrados, lo cual sucede con tuta (Bielza, 2010).

En un principio, para diseñar una estrategia es imprescindible alternar insecticidas con diferente modo de acción, evitando usar productos del mismo modo de acción en generaciones subsiguientes de la plaga. Se puede dar el caso de que en algunos productos sea mejor aplicarlos 2 ó 3 veces sucesivas para aumentar su eficacia. Esto ocurre en tuta con insecticidas que tienen un alto nivel de control contra los primeros estados larvarios, pero no tanto en estados más desarrollados. Por ejemplo, este caso se puede dar con productos tales como azadiractina o *Bacillus thuringiensis*. Por lo general, para el resto de productos, es mejor no realizar aplicaciones sucesivas. En el caso de realizar una aplicación (o dos consecutivas) con un insecticida con un modo de acción determinado sobre una generación de tuta, es indispensable no repetir ninguna aplicación con ningún producto que tenga ese mismo modo de acción hasta que hayan pasado dos generaciones (dejar al menos una generación sin exponer a ese modo de acción) (Bielza, 2010).

Cualquier estrategia de manejo de la resistencia debe estar englobada dentro de un protocolo de control integrado de plagas para que sea exitosa. Lo mejor sería evitar la creación de resistencia a los insecticidas utilizando conjuntamente varios métodos de control. Por tanto, para un adecuado control de tuta es necesario usar convenientemente medidas culturales (mallas, higiene, limpieza...) y biotécnicas (feromonas,...). Además, el control biológico será el principal aliado para evitar el desarrollo de resistencias así como controlar las poblaciones de tuta. Por ello, es muy importante analizar la compatibilidad de los insecticidas con los enemigos naturales a la otra de diseñar la estrategia de control de la plaga (Bielza, 2010).

1.5.- Insecticidas estudiados

A continuación se muestran los 5 insecticidas principales de este estudio.

1.5.1.- Emamectina benzoato

Emamectina es un insecticida desarrollado por Syngenta, utilizado en el control químico de numerosos lepidópteros plaga, entre ellos la polilla del tomate (López *et al.*, 2010). Su nombre comercial es Affirm, formulado en gránulos solubles en agua y contiene un 0,855% de emamectina.

Este producto se encuentra en el grupo de compuestos conocidos como avermectinas. Éstas derivan de un microorganismo llamado *Streptomyces avermitilis*, que está de forma natural en el suelo. Emamectina es una avermectina de segunda generación, la cual ha sido diseñada concretamente con una importante actividad contra lepidópteros (Syngenta, 2016). Se encuentra dentro del grupo 6 de la clasificación de IRAC “Glutamate-gated channel (GLUCL) allosteric modulators” junto abamectina, milbectina y lepimectina (IRAC, 2017).

Características de emamectina benzoato (Syngenta Agro, 2010):

- Alta eficacia a bajas dosis de materia activa contra tuta.
- Eficacia muy elevada en el control de insectos masticadores, en concreto en orugas de lepidópteros debido a su acción translaminar.
- Actúa en todos los estadios larvarios, por tanto posee flexibilidad en el momento de la aplicación.
- Cumple los requisitos de las cadenas de alimentación ya que tiene mínimo residuo y corto plazo de seguridad.
- Posee dos modos de acción y no se han encontrado resistencias cruzadas con otros modos de acción, lo cual es ideal en estrategias antirresistencias.
- Es compatible en programas de producción integrada debido a la rápida degradación en la superficie de la hoja, limitando así su actividad sobre artrópodos beneficiosos y polinizadores.
- El riesgo para el aplicador es mínimo, al igual que para el consumidor y el medio ambiente, siempre que se aplique conforme a las recomendaciones de la etiqueta.

Modo de acción

Emamectina tiene una elevada potencia insecticida contra lepidópteros (x2000 sobre *Spodoptera spp.* valores EC50), teniendo una alta eficacia en el control de orugas de

lepidópteros a dosis muy bajas. Es sintetizada en cinco pasos a partir de la abamectina y actúa básicamente por ingestión y en menor escala por contacto (Syngenta Agro, 2010).

Emamectina posee dos modos de acción fisiológicos. Por un lado, se une irreversiblemente a los receptores de GABA en la sinapsis inhibida y por otro se une a los receptores H del glutamato en la superficie del músculo. Esto produce un continuo e irreversible flujo de iones Cloro que van hacia el interior de los tejidos musculares, anulando constantemente las contracciones de los músculos, manifestado visualmente como parálisis. Este modo de acción es único para el control de orugas de lepidópteros y se llama “Activación del Canal de Cloro” (Figura 1.18) (Syngenta Agro, 2010).

Figura 1.18. Modo de acción “Activación del Canal de Cloro”.

Movilidad en la planta

Hecho el tratamiento, el producto se transloca rápidamente y se forma un reservorio de sustancia activa que permite un control persistente, evitando el lavado por la lluvia y la degradación por la luz solar (Figura 1.19) (Syngenta Agro, 2010).

Figura 1.19. Reservorio de sustancia activa.

En cultivos protegidos, emamectina es segura para los artrópodos beneficiosos y polinizadores cuando las aplicaciones se hacen entre 24 y 36 horas antes de la suelta de los mismos. Esto es así porque lo que queda en la superficie vegetal se degrada rápidamente restringiendo el contacto de artrópodos beneficiosos (López *et al.*, 2010).

Compatibilidad con auxiliares y polinizadores

Como ya se ha dicho, gracias al rápido movimiento translaminar y a la fotodegradación de la emamectina sobre la planta, ésta no tiene toxicidad sobre las abejas a largo plazo y, sólo con la medida de evitar las aplicaciones con el pecoreo activo es suficiente. Respecto a los *Bombus terrestris*, las aplicaciones son seguras siempre que se cierren y cubran las colmenas previamente a la aplicación y abrirlas 5 horas después (Syngenta Agro, 2010).

Las aplicaciones son inocuas para las poblaciones de *Nesidiocoris tenuis* cuando éstas se liberan 24 horas después de realizar la aplicación. Sobre poblaciones ya establecidas, se reducen los niveles de *Nesidiocoris* pero éstos se empiezan a recuperar 4-7 días después de la misma (Syngenta Agro, 2010).

En general, emamectina es selectivo para la mayoría de los artrópodos beneficiosos cuando éstos se liberan 24-72 horas después de la aplicación en invernaderos.

Respecto a los artrópodos beneficiosos al aire libre, dos aplicaciones foliares a 7 días de intervalo no impactan significativamente sobre los niveles poblacionales de ninfas y adultos de *Orius*, ni sobre adultos de *Chrysoperla*, *Scymnus* y *Coccinella* (Syngenta Agro, 2010).

Efecto sobre la plaga

Una vez hecho el tratamiento, las orugas dejan de alimentarse entre 1 y 4 horas, entre las 12-24 horas no pueden moverse y se mantienen paralizadas de forma irreversible y,

finalmente, mueren entre 48 y 96 horas. Este modo de acción evita las mordeduras tras el tratamiento aunque la oruga no muera pasados algunos días (Figura 1.20) (Syngenta Agro, 2010).

Figura 1.20. Efecto de la emamectina sobre la plaga desde su ingestión.

Control de todos los estados larvarios

Debido a la actividad de ingestión que posee emamectina, le permite tener un efecto larvicida, es decir, controlar todos los estadios larvarios desde la eclosión hasta el final de desarrollo. También posee un efecto ovo-larvicida contra las larvas neonatas presentes dentro del huevo. Esto es debido a la absorción directa de la sustancia activa dentro del huevo o al alimentarse del corión durante la eclosión. Sin embargo, en las aplicaciones anteriores a las puestas de huevos, emamectina no tiene ningún efecto insecticida (Figura 1.21) (Syngenta Agro, 2010).

Figura 1.21. Efecto ovo-larvicida de la emamectina.

Experimentación en campo

En la figura 1.22 se puede observar un resumen de los ensayos realizados en diferentes cultivos hortícolas y contra varios lepidópteros, hay una elevada eficacia (84-99%) y se observa una importante consistencia de los resultados en comparación con los diferentes estándares utilizados (37-99%) (Syngenta Agro, 2010).

Figura 1.22. Ensayos realizados en varios cultivos hortícolas contra diferentes lepidópteros.

Prevención del desarrollo de resistencias

IRAC define la resistencia a insecticidas como “un cambio heredable en la sensibilidad de una población de una plaga”.

La probabilidad de desarrollar poblaciones resistentes a emamectina es baja, ya que su sustancia activa actúa en dos sitios específicos en el sistema nervioso de los insectos, sin embargo, es recomendable el seguimiento de una estrategia para el manejo del fenómeno de las resistencias (López *et al.*, 2010).

1.5.2.- Azadiractina

Azadiractina es encuadrada por IRAC en el grupo UN, ya que es un compuesto de modo de acción desconocido o multisitio (IRAC, 2017).

El principio activo de este insecticida de origen vegetal es extraído de las semillas de los frutos del árbol *Azadirachta indica* A. Juss (Figura 1.23). Altera el equilibrio hormonal de los insectos, en concreto en la producción y regulación de la ecdisoma,

impidiendo así el desarrollo de la muda y el crecimiento de los insectos. Esto provoca daños sobre todo en los estados juveniles. También actúa como repelente alimentario e inhibidor de la alimentación una vez que los insectos han ingerido el producto (Gutiérrez, 2010). Además, puede provocar confusión sexual, hacer inviables los huevos y esterilizar adultos. Actúa tanto por contacto como por ingestión (Agrororganics, 2013).

Figura 1.23. Flor y hoja del árbol del Neem (Agrororganics, 2013).

Este producto se utiliza con carácter preventivo para el control de orugas, minadores, mosca blanca y trips, aplicado correctamente es un instrumento adecuado para el establecimiento de auxiliares y manejo de resistencias. Varios ensayos muestran datos interesantes en el control preventivo de larvas neonatas de tuta (Gutiérrez, 2010).

1.5.3.- Metaflumizona

Metaflumizona pertenece a la familia química de las semicarbazonas. Posee una gran actividad frente a plagas de insectos clave (lepidópteros, coleópteros, himenópteros, isópteros y dípteros). Sobre los lepidópteros actúa principalmente por ingestión, con una limitada actividad de contacto. Sin embargo, sobre los coleópteros muestra una excelente actividad tanto por ingestión como por contacto (Araújo, 2010).

Cuando un insecto ingiere este producto, el ingrediente activo bloquea el flujo de iones de sodio a través de los canales específicos del sistema nervioso central de los insectos, provocando la supresión de la transmisión del impulso nervioso. Como consecuencia, el insecto entra en parálisis relajada, deja de alimentarse a los 15 minutos a partir de la ingestión, deja de moverse y muere en las siguientes 24-72 horas. Es un proceso, que una vez iniciado, es irreversible. Una vez que el insecto entra en parálisis, cesa su alimentación a la vez que se detiene el daño en el fruto y planta (Araújo, 2010).

Metaflumizona actúa bloqueando los canales de sodio sin necesidad de un paso metabólico previo para su bioactivación, solo es necesario que el insecto ingiera la sustancia. Esta característica le diferencia de otras materias activas con mecanismos de acción parecidos, por tanto, el IRAC ha creado un nuevo subgrupo para ella, el 22B. De momento no se conocen resistencias cruzadas positivas con los otros insecticidas del mercado (piretroides, neonicotinoides...). Por tanto, usado en rotación con otras materias activas con diferentes modos de acción, puede ser una herramienta útil para la gestión de resistencias y la integración en una estrategia de control de tuta (Araújo, 2010).

Características principales de Alverde, formulado comercial de metaflumizona (Araújo, 2010):

- Eficaz y seguro porque provoca el cese de la alimentación en pocas horas de larvas y adultos (en el caso del escarabajo de la patata).
- Tiene acción a varias temperaturas. Es más efectivo a altas temperaturas ya que el insecto ingesta más velozmente en menos tiempo tanto el fruto, planta o el ingrediente activo. Por tanto, se convierte en un producto apto tanto para cultivos al aire libre como bajo invernadero.
- Pequeño impacto sobre artrópodos, insectos beneficiosos y polinizadores. Además, tiene baja toxicidad sobre mamíferos y abejas.
- Alta resistencia al lavado ya que dicho producto se une a las ceras epicuticulares de las hojas.
- Debido a su naturaleza lipofílica, penetra fácilmente en las capas cerosas y la cutícula que existen en las superficies de las hojas, confiriéndole una elevada resistencia al lavado por la lluvia

1.5.4.- Lambda cihalotrin

Lambda cihalotrin es un piretroide sintético que actúa tanto por contacto como por ingestión. Posee un elevado efecto de choque y una buena persistencia. No es sistémico y actúa sobre el sistema nervioso del insecto alterando el flujo de iones mediante la membrana nerviosa. Dicho piretroide tiene una elevada liposolubilidad, lo cual hace que tenga una gran capacidad de penetración en el insecto. Esto es así ya que tanto la piel como el sistema digestivo de los insectos están forrados por el mismo tipo de tejido, en el cual los lípidos juegan un papel estructural fundamental. Se ha podido comprobar que estos compuestos (los piretroides) tienen un grupo α -ciano, lo cual provoca un aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana nerviosa durante la excitación. Una vez el insecto entra en contacto con el producto comienza la fase de

agitación, seguida de su parálisis y consiguiente muerte. Además, provoca repelencia evitando así que el cultivo vuelva a ser habitado por las plagas (Terralia, 2016).

Es más eficaz sobre los adultos en coleópteros y diferentes estados larvarios en lepidópteros y dípteros. Lo cual tiene una ventaja indirecta, manteniendo un control preventivo de los virus transmitidos por los vectores plaga (Terralia, 2016).

Entre las numerosas plagas que controla destacan: arañas rojas (*Tetranychus spp*), orugas (*Helicoverpa spp. Spodoptera spp...*), pulgones, trips, moscas blancas... en cultivos de cereal, coliflor, frutales de hueso y pepita, lechugas, patata, tomate, pimiento, cítricos... (Terralia, 2016).

Es fotodegradable en poco tiempo e insoluble en agua. No hay riesgo de contaminación de acuíferos porque es prácticamente inmóvil en el suelo. Su vida media es inferior a 14 días en suelos limosos, de 28-56 días en arcillo-limosos y de tres semanas en suelos aerobios, donde se degrada por vía hidrolítica y oxidativa, dando lugar a productos que se mineralizan a CO₂. Además se puede disipar por vía microbiana, aunque si la temperatura del suelo se encuentra por encima de los 5°C o la humedad es bastante baja, su eficiencia disminuye (Terralia, 2016).

No es fitotóxico en los cultivos ni la temperatura afecta a su eficacia. No se lava con la lluvia ya que al ser lipofílico se retiene fácilmente sobre los cultivos. Se debe evitar la contaminación de las aguas porque puede ser peligroso para los crustáceos en época de reproducción (Terralia, 2016). Es extremadamente tóxico en peces y abejas y ligeramente tóxico a aves.

1.5.5.- Metil clorpirifos

Metil clorpirifos es un organofosforado no sistémico, situado en el grupo 1B de la clasificación de IRAC. Su nombre comercial es RELDAN E y fue descubierto y desarrollado por Dow AgroSciences (Martín, 2008).

Metil clorpirifos tiene como característica principal su triple modo de acción. Actúa por ingestión, contacto e inhalación, con un marcado efecto de choque y mediana persistencia. Además, es muy eficaz controlando plagas de complicado acceso ya que posee una potente acción de vapor. Interfiere en la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa (Martín, 2008).

Los trabajos experimentales realizados y las aplicaciones comerciales, demuestran que RELDAN E tiene un efecto de ligero a moderado sobre la mayoría de los depredadores beneficiosos. Generalmente, el producto reduce ligeramente el nivel de la población, la

cual se recupera rápidamente en el plazo de una semana tras del tratamiento. Esta cualidad hace que sea un producto apto en determinados cultivos y condiciones en sistemas de producción integrada (Martín, 2008).

1.6.- Materias activas autorizadas contra tuta

En este apartado se muestran las materias activas de formulados con autorizaciones de uso contra tuta en tomate, las cuales son azadiractina, metomilo, organofosforados, piretrinas, spinosad, abamectina, emamectina, *Bacillus thuringiensis*, indoxacarb y clorantraniliprol.

Los tratamientos de azadiractina tienen un plazo de seguridad de 5-7 días y se suelen hacer en secuencias de 2-4 tratamientos por cultivo, sobre todo en plantas pequeñas sobre las que se puede realizar un tratamiento dirigido. Las aplicaciones deben realizarse al atardecer y con caldos ligeramente acidificados ya que es un producto muy fotodegradable. Este insecticida también afecta a otras plagas y puede dañar los auxiliares si los tratamientos son muy reiterados, es recomendable dejar unos días desde el tratamiento hasta la introducción de los enemigos naturales. Los tratamientos con azadiractina se hacen normalmente en secuencias de varias aplicaciones, es de carácter más “preventivo” (eclosión de huevos y larvas de primer estadio) (Monserrat, 2016).

Las materias activas metomilo (MoA 1A), insecticidas organofosforados (MoA 1B) y piretrinas (MoA 3) son altamente incompatibles con auxiliares (Monserrat, 2016).

Al realizar tratamientos con spinosad (MoA 5), es recomendable alternar con diferentes materias activas y no debe utilizarse más de una vez en la misma generación (dejar 4-6 semanas entre tratamientos, dependiendo de la temperatura, para asegurar que no se aplica sobre la misma generación) (Monserrat, 2016).

Los tratamientos con abamectina (MoA 6) contra la polilla del tomate deben realizarse preferentemente en las primeras fases del cultivo, antes de llevar a cabo las introducciones de auxiliares (no si se han realizado las sueltas en los semilleros). Cuando las fases del cultivo están más avanzadas, una vez los móridos están instalados, los tratamientos se suelen realizar conjuntos también contra ácaros. Este producto ataca principalmente a larvas muy jóvenes (Monserrat, 2016).

Otra materia activa del mismo grupo que abamectina, es la emamectina, la cual es incompatible con los enemigos naturales y tiene baja persistencia en el cultivo, por tanto no afecta a nuevas introducciones de la plaga. En este caso alcanza hasta larvas

en tercer estadio y no debe de realizarse más de una aplicación por ciclo de cultivo (Monserrat, 2016).

Para tratamientos preventivos, eclosión de huevos y larvas de primer estadio se puede usar *Bacillus thuringiensis* (MoA 11A). Este producto sí es compatible con los enemigos naturales. Tiene muy poca persistencia activa y necesita una buena preparación del caldo y que se haga una buena aplicación. Aconsejable además, que el caldo esté ligeramente acidificado. Se deben realizar aplicaciones con la variedad de *Bacillus thuringiensis* que actúe mejor para tuta. No deben realizarse más de tres tratamientos seguidos con ninguna cepa (Monserrat, 2016).

Una materia activa con una compatibilidad moderada con míridos es indoxacarb (MoA 22A). En las plantaciones más desarrolladas tienen rangos de eficacia menores debido a las condiciones de dosificación. En este mismo grupo se encuentra metaflumizona (MoA 22B). (Monserrat, 2016).

Y por último la diamida clorantraniliprol (MoA 8), compatible con los míridos. Esta materia activa es eficaz contra huevos y en toda la fase larvaria de tuta, tienen una alta persistencia activa. Se deben de hacer máximo dos tratamientos en todo el ciclo de cultivo, normalmente son consecutivos. Es recomendable dejar una generación sin tratar (dejar 8-10 semanas) antes de realizar una aplicación con otro producto del mismo grupo (Monserrat, 2016).

1.7.- Bibliografía

Agrogarnics, 2013. <http://www.agrorganics.com/es/blog/2013/07/12/aceite-de-neem-y-azadiractina/>. Acceso enero 2017.

Ahmad, M., Arif, M.I. y Ahmad, Z. 2003. "Susceptibility to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan". Crop Prot. 22: 39-544.

Angulo, O. A. y Olivares, T. 2011. "Protocolo de identificación de *Tuta absoluta* (Meyrick 1917): Lepidoptera: Gelechiidae". Universidad de Concepción, Chile. Pag. 5 (sin publicar).

Araújo, A. 2010. "Alverde®: la solución BASF para el control de *Tuta absoluta*". Phytoma. 217: 21-22.

Argentine, J. A., Clark, J. M. y Lin, H., 1992. "Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of Colorado potato beetle". Pest Biochem Physiol. 44: 191- 207

- Arnó, J., Sorribas, R., Prat, M., Montse, M., Pozo, C., Rodriguez, D., Garreta, A., Gómez, A. y Gabarra, R. 2009. "*Tuta absoluta*, a new pest in IPM tomatoes in the northeast of Spain". IOBC/WPRS Bull 49: 203-208
- Apablaza, J. 1992. "La polilla del tomate y su manejo". Tattersal 79: 12-13.
- Bahamondes, L.A. y Mallea, A.R. 1969. "Biología en Mendoza de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), especie nueva para la República Argentina". RevFac Cs Agrarias 15: 96-104.
- Barrientos, Z.R., Apablaza, H.J., Norero, S.A. y Estay, P.P. 1998. "Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". Ciencia e Investigación Agraria 25: 133-137.
- Bech, R.A. 2009. "Federal Order for tomatoes from countries where *Tuta absoluta* is known to occur Plant Protection and Quarantine". USDA-APHIS, 3.
- Belda, J.E., Calvo, F.J. y Giménez, A. 2010. "Estrategia para el control biológico de *Tuta absoluta* en tomate mediante sueltas de *Nesidiocoris tenuis* en pre-trasplante". Phytoma 217: 48-52.
- Berger, M., Puinean, A.M., Randall, E., Zimmer, C.T., Silva, W.M., Bielza, P., Field, L.M., Hughes, D., Mellor, I., Hassani-Pak, K., Siqueira, H.A., Williamson, M.S. y Bass, C. 2016. "Insecticide resistance mediated by an exon skipping event". Mol Ecol. 25: 5692-5704.
- Betancourt, C.M., Scatoni, I.B. y Rodríguez, J.J. 1996. "Influencia de la temperatura sobre la reproducción y el desarrollo de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". Rev Bras Biol. 56: 661-670.
- Bielza, P. 2010. "La resistencia a insecticidas en *Tuta absoluta* (Meyrick)". Phytoma 217: 103-106.
- Bielza, P., Garcia-Vidal, L. y Martinez-Aguirre, M.R. 2016. "Case study 4: *Tuta absoluta* - insecticide resistance management of this invasive species". In: XXV International Congress of Entomology, 25 -30 September, Orlando, FL, US. pag. 3783.
- Cabello, T., Gallego, J.R., Fernández, F.J., Soler, A., Beltrán, D., Parra, A. y Vila, E. 2009a. "The damsel bug *Nabis pseudoferus* (Hem.: Nabidae) as a new biological control agent of the South American tomato pinkworm, *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae), in tomato crops of Spain". IOBC/WPRS Bull 49:219-223

- Cabello, T., Gallego, J.R., Fernández, F.J. Vila, E., Soler, A. y Parra, A. 2010. "Aplicación de parasitoides de huevos en el control de *Tuta absoluta* en España". *Phytoma* 217: 53-59.
- Cabello, T., Gallego, J.R., Vila, E., Soler, A., Del Pino, M., Carnero, A., Hernández-Suárez, E. y Polaszek, A. 2009. "Biological control of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae), with releases of *Trichogramma achaeae* (Hym.; Trichogrammatidae) in tomato greenhouses of Spain". *IOBC/WPRS Bull* 49: 225-230.
- Cabello, T., Jaimez, R. y Pascual, F. 1994. "Distribución espacial y temporal de *Liriomyza* spp. y sus parasitoides en cultivos hortícolas de invernadero en el sur de España". *Bol San Veg Plagas* 20: 445-455.
- CABI. 2013. "Distribución Mundial de *Tuta absoluta*". *Crop Protection* (CABI), UK. <http://www.cabi.org/cpc/?compid=1&dsid=49260&loadmodule=datasheet&page=868&site=161>. Acceso abril de 2013.
- Cáceres, S. 1992. "La polilla del tomate en Corrientes. Biología y control". Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista, INTA. Pag 19.
- Cáceres, S. 2007. "Manejo de la polilla del tomate en Corrientes". Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista. Hoja de divulgación n° 32.
- Calvo, F.J., Soriano, J.D., Bolckmans, K. y Belda, J.E. 2013. "Host instar suitability and life-history parameters under different temperature regimes of *Necremnus artynes* on *Tuta absoluta*". *Biocontr Sc y Tecn.* 23: 803-815.
- Campos, F., Krupa, D. A. y Dybas, R. A., 1996. "Susceptibility of populations of two-spotted spider mites (Acari: Tetranychidae) from Florida, Holland, and the Canary Islands to abamectin and characterization of abamectin resistance". *J Econ Entomol.* 89: 594- 601
- Campos, M.R., Rodrigues, A.R., Silva, W.M., Silva, T.B., Silva, V.R., Guedes, R.N. y Siqueira, H.A. 2014. "Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance". *Plos One.* 9: e103235.
- Campos, M.R., Silva, T., Silva, W.M., Silva, J E. y Siqueira, H A. 2015. "Susceptibility of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Brazilian populations to ryanodine receptor modulators". *Pest Manag Sci.* 71: 537-544.

- Campos, R.G. 1976. "Control químico delminador de hojas y tallos de la papa (*Scrobipalpula absoluta*, Meyrick) en el valle del Cañete". Rev Per Entomol 19: 102-106.
- Caponero, A. 2009. "Solanacee, rischio in serre. Resta alta l'attenzioneallatignola del pomodoronellecoltureprotette". Colture Protette 10: 96-97.
- Chen, R.L., Bao, X.Z., Drake, V.A., Farrow, R.A., Wang, S.Y., Sun, Y.J. y Zhai, B.P. 1989. "Radar observations of the spring migration into northeastern China of the oriental armyworm moth, *Mythimna separata*, and other insects". Ecol Entomol 14: 149-162.
- Christie, P. T. y Wright, D. J. 1990. "Activity of abamectin against larval stages of *Spodoptera littoralis* Boisduval and *Heliothis armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) and possible mechanisms of differential toxicity". Pest Sci. 29: 29- 38.
- Cisneros, F., y Mujica, N. 1997. "The leafminer fly in potato: plant reaction and natural enemies as natural mortality factors". CIP (Peru) Program report. 98: 129-140.
- Clarke, J.F. 1962. "New species of microlepidoptera from Japan".Entomol News 73: 91-102
- Cleveland, C.B. Mayes, M.A. y Cryer, S.A. 2002. "An ecological risk assessment for spinosad use on cotton". Pest Manag Sci. 58: 70-84.
- Coelho, M.C.F. y F.H. França. 1987. "Biología, quetotaxia de larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro". Pesquisa Agropecuária Brasileira. 22: 129-135.
- Decoin, M. 2010. "Tomate, *Tuta absolutatouche* à l'Atlantique". Phytoma 631: 44-45.
- Desneux, N.,Decourtye, A. y Delpuech, J.M. 2007. "The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods". Annu Rev Entomol. 52: 81-106.
- Desneux, N., Wajnberg, E., A.G., Wyckhuys ,K., Burgio, G., Arpia, S., Narváez-Vasques, C.A., González-Cabrera, J., Catalán, D., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T. y Urbaneja, A. 2010. "Biological invasion of European tomato crops by *Tutaabsoluta*: ecology, greographic expansion and prospects for biological control". J Pest Sci. 83: 197-215.
- EC Report. 2009. "Summary report of the meeting of the standing committee on plant health" D. 411880, 19-20 Oct 2009, p 5.
- EPPO 2005. "Data sheets on quarentine pests: *Tuta absoluta*". OEPP/EPPO Bul 35: 434 - 435.

- EPPO 2009. "EPPO Reporting service-Pest & Diseases". N° 8, Paris, 2009-08-01
- Estay, P. 2000. "Polilla del tomate. *Tuta absoluta*". INIA La Platina. 89-99. <http://alerce.inia.cl/docs/Informativos/Informativo09.pdf>. Acceso 2 febrero 2010.
- Estay, P. 2001. Primer curso "Manejo integrado de plagas y enfermedades en tomate". Santiago, INIA La Platina. 122 p. (Serie actas N° 12).
- Estay, P. 2003. "Manejo Integrado de plagas del tomate en Chile; Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en tomate". Instituto de Investigaciones Agropecuarias. INIA-La Platina.
- Estay, P., y Bruna, A. 2002. "Insectos, ácaros y enfermedades asociadas al tomate en Chile". INIA.
- Feng, H.Q., Wu, K.M., Ni, Y.X., Cheng, D.F. y Guo, Y.Y. 2005. "High-altitude windborne transport of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in mid-summer in northern China". J Insect Behav. 18: 335-349.
- Fernandez, S. y Montagne, A. (1990a). "Biología del minador del tomate, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae)". Bol Entomol Venez. 5: 89-99.
- Fernandez, S., y Montagne, A. (1990b). "Preferencia de oviposición de las hembras y duración, crecimiento y sobrevivencia de las larvas de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) en diferentes Solanaceas". Bol Entomol Venez. 5: 100-106.
- Fitt, G.P. 1989. "The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems". Annu Rev Entomol. 34: 17-52
- Gabarra, R. y Arnó, J. 2010. "Resultados de las experiencias de control biológico de la polilla del tomate en cultivo de invernadero y aire libre en Cataluña". Phytoma 217: 66-68.
- Gabarra, R., Arnó, J., Lara, L., Verdú, M.J., Ribes, A., Beita, F., Urbaneja, A., Tellez, M.M., Mollá, O. y Ruidavets, J. 2014. "Native parasitoids associated with *Tuta absoluta* the tomato production areas of the Spanish Mediterranean Coast". Bio Control 59: 45-54.
- García-Marí, F., Espul, J.C., 1982. "Bioecología de la polilla del tomate (*Scrobipalpula absoluta*) en Mendoza, República Argentina". Rev Invest Agropecuarias, INTA (Argentina) XVII: 135-146.

- García-Marí, F. y Vercher, R. 2010. "Descripción, origen y expansión de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". Phytoma. 127: 16-20
- Gebiola, M., Bernardo, U., Ribes, A. y Gibson, G.A.P. 2015. "An integrative study of *Necremnus* Thomson (Hymenoptera: Eulophidae) associated with invasive pests in Europe and North America: taxonomic and ecological implications". Zool J Linn Soc 173: 352-423.
- Germmain, J.F., Lacordaire, A.I., Cocquempot, C., Ramel, J.M. y Oudard, E. 2009. "Un nouveauravageur de la tomate en France: *Tuta absoluta*". PHM-RevueHorticole 512: 37-41
- Giustolin, T.A., Vendramim, J.D., Alves, S.B., Vieira, S.A. y Pereira, R.M. 2001. "Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep: Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*". J Appl Entomol. 125: 551-556.
- Gontijo, P.C., Picanço, M.C., Pereira, E.J., Martins, J.C., Chediak, M. y Guedes, R.N. 2013. "Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*". Ann Appl Biol. 162: 50-59.
- González-Cabrera, J., Mollá, O., Montón, H. y Urbaneja, A. 2010. "Control biológico de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) con *Bacillus thuringiensis* (Berliner)". Phytoma 217: 69-73.
- González, R. H. 1989. "Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile". Departamento de Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad de Chile. Biblioteca digital de la Universidad de Chile.
- Guedes, R.N. y Picanço, M.C. 2012. "The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance". Bull OEPP/EPPO Bull 42: 211-216
- Guedes, R.N. y Siqueira, H.A. 2012. "The tomato borer *Tuta absoluta*: insecticide resistance and control failure". CAB Rev 7, no. 055.
- Guilemaud, T., Blin, A., Le goff, I., Desneux, N., Reyes, M., Tabone, E., Tsagkarakou, A., Nino, L. y Lombaert, E., 2015. "The tomato borer, *Tuta absoluta*, invading the Mediterranean Basin, originates from a single introduction from Central Chile". Sci. Rep. 5: 8371
- Gunning, R. V., y Devonshire, A. L. 2002. "Negative-cross resistance between indoxacarb and pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera*: a tool for resistance management". Resist Pest Manag Newslett. 11: 52.

- Gutiérrez, L. 2010. "Programa IPM Certis para el control de *Tuta absoluta*". Phytoma. 217: 60-65.
- Haji, F.N.P. 1997. "Controle biológico da traca do tometeiro com *Trichogramma* no Nordeste do Brasil". J.R. Postali P. & R. A. Zucchi. Brasil. 319-324.
- Haro, J.J. 1996. "La comunidad de eulófidos (Hymenoptera, Chalcidoidea, Eulophidae), parasitos de *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880) (Diptera, Agromyzidae)". Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Hickel, E. R., y Vilela, E. F. 1991. "Comportamento de chamamento e aspectos de acasalamento de *Scrobipalpus absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), sob condições de campo". An Soc Entomol. Brasil. 20: 173-182.
- Hirooka, T., Nishimatsu, T., Kodama, H., Reckmann, U., Nauen, R. 2007. "The biological profile of flubendiamide, a new benzenedicarboxamide insecticide". Pflanzensch. Nachr. Bayer 60: 183-202.
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), 2017. http://www.irac-online.org/content/uploads/modo_de_accion_Oct11.pdf. Acceso enero 2017.
- JA. 2010. "Polilla del Tomate (*Tuta absoluta*)". Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera. Red de Alerta e Información Fitosanitaria.
- Jeanguenat, A. 2013. "The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides". Pest Manag Sci 69: 7-14.
- Kabiri, F., Vila, E., y Cabello, T. 2010. "*Trichogramma achaeae*: an excellent biocontrol agent against *Tuta absoluta*". Sting (IOBC Newsletter on Biological Control). 33: 5-6.
- Kılıç, T. 2010. "First record of *Tuta absoluta* in Turkey". Phytoparasitica. 38: 243-244.
- Lahm, G.P., Cordova, D., Barry, J.D. 2009. "New and selective ryanodine receptor activators for insect control". Bioorg Med Chem Lett. 19: 4127-4133.
- Lahm, G.P., Stevenson, T.M., Selby, T.P., Freudenberg, J.H., Cordova, D., Flexner, L., Bellin, C.A., Dubas, C.M., Smith, B.K., Hughes, K.A., Hollinghaus, J.G., Clark, C.E., Benner, E.A. 2007. "Rynaxypyr™: a new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator". Bioorg Med Chem Lett. 17: 6274-6279.

- Larraín, P. 1986. "Eficacia de insecticidas y frecuencia de aplicación basada en niveles poblacionales críticos de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Neotrop Entomol.* 34: 113-119.
- Larraín, P. 1987. "Plagas del tomate, primera parte: descripción, fluctuación poblacional, daño, plantas hospederas, enemigos naturales de las plagas principales". *IPA La Platina* 39: 30-35.
- Leite, G.L., M.C. Picanço, D.J., Silva, A.C. y Mata, G.N. 1995. "Distribuição de *Scrobipalpuloides absoluta* no dosel de *Lycopersicon esculentum*, *L. hirsutum* e *L. peruvianum*". *Horticultura Brasileira*. 13: 47-51
- Li, X., Schuler, M.A. y Berenbaum, M.R. 2007. "Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics". *Annu Rev Entomol.* 52: 231-253.
- Lietti, M., Botto, E., Alzogaray, R. 2005. "Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". *NeotropEntomol* 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, J.M., Martín, L., López, R.C., González, F., Sanz, E., Gallardo, M. y Cantus, J.M. 2010. "Affirm (Emamectina), una nueva arma contra la *Tuta absoluta* y otras orugas de lepidópteros". *Phytoma*. 217: 90-94.
- López, P. 2003. "Manejo integrado de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) asociado al cultivo de tomate en Chile". Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat, Seminario, Ing. Ejec. Agrícola. Chile. 77 p.
- Low, W.Y., Ng, H.L., Morton, C.J., Parker, M W., Batterham, P. y Robin, C. 2007. "Molecular evolution of glutathione S-transferases in the genus *Drosophila*". *Genetics*, 177: 1363-1375.
- Mack, R.N., Barrett, S.C., deFur, P.L., MacDonal, W.L., Madden, L.V., Marshall, D.S., McCullough, D.G., McEvoy, P.B., Nyrop, J.P., Reichard, S.E., Rice, K.J., Tolin, S.A. 2002. "Predicting invasions of nonindigenous plants and plant pests". National Academy of Sciences, Washington, DC.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento). 2014. AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.

- Marcano, R. 1995. "Efecto de la temperatura sobre el desarrollo y la reproducción de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". Bol Entomol Venez 10: 69-75.
- Martín, A. 2008. "Metil-clorpirifos: presente y futuro". Phytoma. 203.<http://www.phytoma.com/tienda/articulos-editorial/238-203-noviembre-2008/3723-metil-clorpirifos-presente-y-futuro>. Acceso enero 2017.
- Mollá, O., Montón, H., Beitia Crespo, F.J. y Urbaneja, A. 2008. "La polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick), una nueva plaga invasora". Terralia 69: 36-42
- Monserat, A. 2009. "La polilla del tomate *Tuta absoluta* en la Región de Murcia: bases para su control". Serie Técnica y de Estudios N° 34. Conserjería de Agricultura y Agua.
- Monserat, A. 2010. "Estrategias globales en el manejo de *Tuta absoluta* en Murcia". Phytoma 2017: 81-86.
- Monserat, A. 2016. "Estrategias fitosanitarias en tomate". Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, IMIDA.
- Moore, J.E. 1983. "Control of tomato leafminer (*Scrobipalpula absoluta*) in Bolivia". Trop Pest Manag. 29: 231-238.
- Morais, G.J. y Normanha, Filho., J.A. 1982 "Surto de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) em tomateiro no trópico semi-árido." Pesquisa Agropecuária Brasileira 17: 503-504
- NAPPO. 2012. North American Plant Protection Organization. Protocolo de vigilancia para el minador de la hoja de tomate, *Tuta absoluta*, para los países miembros de la NAPPO.www.napso.org/. Acceso abril de 2013.
- Niedmann, L. L. y Meza-Basso, L. 2006. "Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile". Agricultura Técnica 66: 235-246.
- Navarro Llopis, V., Alfaro, C., Vacas, S. y Primo, J. 2010. "Aplicación de la confusión sexual al control de la polilla del tomate *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)". Phytoma. 217: 32-34
- Nauen, R. 2006. "Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor". Pest Manag Sci. 62: 690-692.

- Notz, A. 1992. "Minador pequeño de la hoja del tomate; Palomilla pequeña; Minador del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) 1917". Plagas Agrícolas de Venezuela. Fichas técnicas de organismos plaga. In 2008.
- Pereyra, P.C. y Sánchez, N.E. 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.
- Potting, R. 2009. "Pest risk analysis, *Tuta absoluta*, tomato leaf miner moth". Plant protection service of the Netherlands. Pag 24.
- Povolny, D. 1975. "On three neotropical species of Gnorimoschemini (Lepidoptera: Gelechiidae) mining Solanaceae". Acta Univ Agric. 23: 379-393.
- Quiroz, C. 1976. "Nuevos antecedentes sobre la biología de la polilla del tomate, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick)". Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). 36: 82-86.
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., ... y Feyereisen, R. 2002. "Evolution of supergene families associated with insecticide resistance". Science. 298: 179-181.
- Reyes, M., Franck, P., Charmillot, P.J., Ioriatti, C., Olivares, J., Pasqualini, E. y Sauphanor, B. 2007. "Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the Codling moth, *Cydia pomonella*". Pest Manag Sci. 63: 890-902.
- Reyes, M., Rocha, K., Alarcón, L., Siegwart, M, y Sauphanor, B. 2012. "Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad". Pest Biochem Physiol. 102: 45-50.
- Rinkevich, F. D., Du, Y. y Dong, K. 2013. " Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids". Pest BiochemPhysiol. 106: 93-100.
- Ripa, R., Rojas, S. y Rodriguez, F. 1992. "Consideraciones sobre el control de la polilla del tomate". IPA La Platina. 68: 20-24.
- Ripa, R., Rojas, S. y Velasco, G. 1995. "Releases of biological control agents of insect pests on Easter Island (Pacific Ocean)". Entomophaga 40: 427-440.

- Roditakis, E., Mavridis, K., Riga, M., Vasakis, E., Morou, E., Rison, J.L. y Vontas, J. 2016b. "Identification and detection of indoxacarb resistance mutations in the para sodium channel of the tomato leafminer, *Tuta absoluta*". Pest Manag Sci.
- Roditakis, E., Papachristos, D. y Roditakis, N.E. 2010. "Current status of the tomato leafminer *Tuta absoluta* in Greece". OEPP/EPPO Bul. 40: 163-166.
- Roditakis, E., Skarmoutsou, C. y Staurakaki, M. 2013a. "Toxicity of insecticides to populations of tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece". Pest Manag Sci. 69: 834-840.
- Roditakis, E., Skarmoutsou, C., Staurakaki, M., Martínez-Aguirre M.R., García-Vidal, L., Bielza, P., Haddi, K., Rapisarda, C., Rison, J.L., Bassi, A. y Teixeira, L.A. 2013b. "Determination of baseline susceptibility of European populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) to indoxacarb and chlorantraniliprole using a novel dip bioassay method". Pest Manag Sci. 69: 217-227.
- Roditakis, E., Steinback, D., Moritz, G., Vasakis, E., Stavrakaki, M., Ilias, A., García-Vidal, L., Martínez-Aguirre, M.R., Bielza, P., Morou, E., Silva, J.E., Silva, W.M., Siqueira, H.A., Iqbal, S., Troczka, B.J., Williamson, M.S., Bass, C., Tsagkarakou, A., Vontas, J. y Nauen, Ralf. 2017. "Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". Insect Biochem Mol Biol. 80: 11-20
- Roditakis, E., Vasakis, E., Grispou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M. y Bassi, A. 2015. "First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides". J Pest Sci. 88: 9-16.
- Roditakis, E., Vasakis, E., Stavrakaki, M., Ilias, A., Morou, E., Steinbach, D., Bielza, P., Bass, C., Bassi, A., Nauen, R., Vontas, J. y Tsagkarakou, A. 2016a. "The global importance of the tomato borer *Tuta absoluta*, its control and the current state of insecticide resistance". In: XXV International Congress of Entomology, 25-30 September, Orlando, FL, US. pag. 3783.
- Salazar, E. R. y Araya, J. E. 1997. "Detección de resistencia a insecticidas en la polilla del tomate". Simiente. 67: 8-22.
- Salazar, E. R. y Araya, J. E. 2001. "Respuesta de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a insecticidas en Arica". Agricultura Técnica. 61: 429-435.
- Sannino, L. y Espinosa, B. 2009. "Keiferia lycopersicella, una nuovatignola su pomodoro". Informat Agr. 4: 69-70.

Scott, J. G., 1989. "Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethroid resistant strains of house flies". *Pest Biochem Physiol.* 34: 27-31.

Segovia, L. M. 1997. "Monitoring the tomato moth, *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick), in tomatoes (*Lycopersicum esculentum* Mill.) cultivated under plastic in Quillota". Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Servicio Agrícola y Ganadero Chile (SAG). Lista de productos registrados en Chile. <http://www.sag.cl/>. Acceso marzo 2011.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2013. Ficha técnica N° 28.

Shelton, A.M., Sances, F.V., Hawley, J., Tang, J.D., Boune, M., Jungers, D., Collins, H.L. y Farias, J. 2000. "Assessment of insecticides after the outbreak of Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in California in 1997". *J Econ Entomol.* 93: 931-936.

Silva, G.A., Picanço, M.C., Bacci, L., Crespo, A.L.B., Rosado, J.F. y Guedes, R.N.C. 2011. "Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*". *Pest Manag Sci.* 67: 913-920.

Silva, T.B., Silva, W.M., Campos, M.R., Silva, J.E., Ribeiro, L.M. y Siqueira, H.A. 2016. "Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil". *Crop Protect.* 79: 80-86.

Silva, W.M., Berger, M., Bass, C., Balbino, V.Q., Amaral, M.H.P., Campos, M.R. y Siqueira, H.A.A. 2015. "Status of pyrethroid resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*". *Pest Biochem Physiol.* 122: 8-14.

Syngenta Agro, S.A. 2010. "Affirm. Eficacia y precisión". <http://www.syngentaagro.es/affirm/principio-activo.aspx>. Acceso agosto 2010.

Siqueira, H.A., Guedes, R.N., Fragoso, D.B. y Magalhaes, L.C. 2001. "Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". *J Pest Manag.* 47: 247-251.

Siqueira, H.A., Guedes, R.N. y Picanço, M.C. 2000. "Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Agric Forest Entomol.* 2: 147-153.

Sutherst, R.W., Maywald, G.F. y Kriticos, D. 2007. "CLIMEX® software version 3, User's Guide". CSIRO, Hearne Scientific Software Pty Ltd.

Terralia, 2016.

http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/view_composition?composition_id=17056. Acceso diciembre 2016.

Theoduloz, C., Vega, A., Salazar, M., González, E. y Meza-Basso, L. 2003. "Expression of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin cry1Ab gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills)". J Appl Microbiol. 94: 375-381.

Tohnishi, M., Nakao, H., Furuya, T., Seo, A., Kodama, H., Tsubata, K., Fujioka, S., Kodama, H., Hirooka, T., Nishimatsu, T. 2005. "Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests". J Pest Sci. 30: 354-360

Torres Gregorio, J., Argente, J., Díaz, M.A. y Yuste, A. 2009. "Aplicación de *Beauveria bassiana* en la lucha biológica contra *Tuta absoluta*". Agrícola Vergel. 326: 129-132.

Torres, J.B., Faria, C.A., Evangelista, W.S. y Pratissoli, D. 2001. "Within-plant distribution of the leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology". Int J Pest Manag. 47: 173-178.

Uchôa-Fernandes, M.A., Della Lucia, T.M. y Vilela, E.F. 1995. "Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae)". Anais da SociedadeEntomologica do Brasil. 24: 159-164.

Urbaneja, A., Montón, H. y Molla, O. 2009. "Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*". J Appl Entomol. 133: 292-296

Urbaneja, A., Vercher, R., Navarro, V., García-Marí, F. y Porcuna, J.L. 2007. "La polilla del tomate, *Tuta absoluta*". Phytoma. 194: 16-23.

Urbaneja, A., Montón, H., Vanaclocha, P., Mollá, O. y Beitia, F. 2008. "La polilla del tomate, *Tuta absoluta*, una nueva presa para los míridos *Nesidiocoris tenuis* y *Macrolophus pygmaeus*". Agrícola Vergel. 320: 361-367.

Van der Blom, J., Karakitsos, K., Giakoumaki, V.M. y Robledo Camacho, A. 2016. "Control de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) por *Necremnus tutae* en cultivos de tomate de invernadero en Almería". Phytoma 276: 24-28.

Van der Blom, J., Robledo, A. y Torres, S. 2011. "Control de *Tuta absoluta* mediante medidas culturales". Documentos Técnicos 04.

Vargas, H. 1970. "Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lep. Gelechiidae)". Idesia.

Vercher, R., Calabuig, A. y Gómez, F. 2009. "Ecología de la nueva plaga invasora del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick)". VI Congreso Nacional de Entomología Aplicada. XII Jornadas Científicas de la SEEA. Pag. 14.

Vercher, R., Calabuig, A. y Felipe, C. 2010. "Ecología, muestreos y umbrales de *Tuta absoluta* (Meyrick)". Phytoma. 127: 23-26.

Wang, D., Gong, P.Y., Li, M., Qui, X.H. y Wang, K.Y. 2009. "Sublethal effects of spinosad on survival, growth and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)". Pest Manag Sci. 65: 223-227.

Wang, W., Mo, J., Cheng, J., Zhuang, P. y Tang, Z. 2006. "Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)". Pest Bioche Physiol. 84: 180-187.

Weisenburger, D.D. 1993. "Human health: effects of agrichemicals use". Hum Pathol 24: 571-576.

Páginas Webs

<http://archives.eppo.org>. Acceso enero 2011.

<http://www.dissectiongroup.co.uk>. Acceso noviembre 2016.

2.- OBJETIVOS

En el ámbito de la agricultura, al agricultor se le exige cada vez más la producción de alimentos de alta calidad por parte de las cadenas de distribución, consumidores y diferentes asociaciones. Para garantizar la viabilidad de una explotación agrícola es necesario conocer los métodos de producción adecuados para conseguir este objetivo. Por tanto, es de vital importancia mantener un control adecuado de las principales plagas y enfermedades que puedan afectar a los diferentes cultivos para obtener productos de calidad.

El número de materias activas disponibles en el mercado, sobre todo de insecticidas, es cada vez más reducido. Por ello, mantener las explotaciones agrícolas libres de plagas cada vez es más complejo.

La principal plaga del cultivo del tomate es *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Este microlepidóptero es capaz de provocar daños muy importantes en el cultivo del tomate, pudiendo poner en compromiso la viabilidad económica de su producción. El control de dicha plaga se lleva a cabo principalmente con insecticidas. Como ya se ha comentado, la variedad de materias activas es limitada lo cual conlleva el uso excesivo de las mismas, elevando así el riesgo de desarrollo de resistencia de las plagas a los insecticidas.

El primer objetivo de este trabajo consiste en determinar la susceptibilidad base de varias poblaciones de tuta del Mediterráneo a emamectina benzoato, metaflumizona, azadiractina, lambda cihalotrín y metrilclorpirifos y conocer la evolución de la sensibilidad de tuta en el tiempo a esos mismos productos. También se estudia si existen diferencias en la sensibilidad a estos compuestos en función del estadio larvario de tuta.

El siguiente paso consiste en seleccionar una población de tuta resistente a emamectina y determinar qué mecanismo de resistencia es el responsable de dicha resistencia. A continuación, con esa población resistente a emamectina se determinan las posibles resistencias cruzadas a otros insecticidas.

También se va a estudiar si una exposición prolongada en tuta a emamectina a una concentración subletal para la plaga, favorece el desarrollo de resistencia.

Además, se quiere conocer si el desarrollo de resistencia de tuta a emamectina tiene un coste ecológico (*fitness cost*), el cual se ve reflejado en su ciclo de vida.

Por último, se va a analizar la herencia de la resistencia de tuta a emamectina.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

3.1.- Material vegetal

La especie de material vegetal utilizada en este estudio es *Solanum lycopersicum* cv. Bobcat. Las plantas de tomate son criadas en la estación experimental Tomás Ferro de la Universidad Politécnica de Cartagena, situada en La Palma (Cartagena). Allí las semillas son germinadas en cámaras con temperatura, humedad y fotoperiodo controlado, siendo 26 ± 1 °C, 50-60% y 16:8h respectivamente. Pasadas dos semanas son sacadas a invernadero para obtener el tamaño y endurecimiento necesario de la planta para llevar a cabo la cría de la plaga, así como los bioensayos y demás estudios que se realizan. El invernadero cuenta con aberturas cenitales y laterales cubiertas con malla anti trips. Este se encuentra dividido en ocho secciones separadas por un pasillo central, dejando cuatro a cada lado. Las secciones son estancas y están hechas de malla anti trips, evitando así la contaminación de la planta limpia de otras plagas. En su interior contienen una mesa en la cual se sitúan las macetas de tomate. El riego se lleva a cabo mediante piquetas pinchadas en el sustrato de la maceta.

Las plantas se encuentran libres de residuos, no han recibido ningún tratamiento durante su desarrollo. Se encontraron casos aislados de plantas contaminadas con algún tipo de plaga, las cuales fueron eliminadas antes de llegar al laboratorio.

3.2. Jaulas de cría

Una jaula de cría es el lugar en el que se encuentra una población (Figura 3.1), se mantiene y se multiplica. Ésta tiene como base una bandeja plástica (570 x 420x 80 cm) a la cual está enganchada una malla de plástico de cuadros (25 x 25 mm) formando la estructura principal de la jaula en forma de cubo (535 x 385 x 520 cm). Esta conformación está recubierta por una funda de nital (Sefar nital PA-9XXX, 150 μ de poro) que deja pasar la luz y el aire. Las jaulas tienen dos aberturas laterales en forma de “U” mediante cremallera. Para sujetar la funda de la jaula por la parte inferior, se pone otra bandeja negra debajo de la ya existente (Figura 3.2).

Todas las jaulas se encuentran rotuladas con el nombre de la población, sobre estanterías en condiciones de laboratorio, 26 ± 1 °C, 50-60% de humedad relativa y 16:8 h de fotoperiodo (Figura 3.3).

Figura 3.1. Jaula completa.

Figura 3.2. Detalle de las dos bandejas que sujetan la funda de nylal.

Figura 3.3. Estanterías con las jaulas en el laboratorio.

3.3.- Poblaciones de *Tuta absoluta*

Las poblaciones de *Tuta absoluta* estudiadas han sido recolectadas de cultivos infectados en fase de larva.

En la Tabla 3.1 se muestra el nombre de las diferentes poblaciones, siendo éste el mismo al lugar del que proceden. También se aporta la región y/o comunidad y país de procedencia. Todas han sido recolectadas en hojas y frutos de tomate.

En total hay dieciséis poblaciones, diez son de España, tres de Italia y dos de Portugal. Mixta se fundó en octubre de 2013 con cinco poblaciones españolas, una italiana y otra portuguesa. Se tomaron adultos de las siete poblaciones y se introdujeron en una jaula con planta limpia de tomate, a partir de ahí comenzaron a cruzarse los adultos de las distintas poblaciones (Figura 3.4).

Figura 3.4. Adultos de tuta en la esquina de la jaula.

Tabla 3.1. Nombre y procedencia de las poblaciones de tuta.

Población	Procedencia
Abarán	Murcia (España)
Foggia	Apulia (Italia)
Almería	Andalucía (España)
Canarias	Las Palmas de Gran Canarias (España)
Níjar	Almería, Andalucía (España)
Cañada de Gallego	Mazarrón, Murcia (España)
Biancavilla	Sicilia (Italia)
Tudela	Navarra (España)
Boavista	Oporto (Portugal)
Charneca	Lisboa (Portugal)
Águilas	Murcia (España)
Mixta	Águilas, Canarias, Tudela, Cañada de Gallego, Foggia, Níjar y Charneca
Calnegre	Murcia (España)
Mojonera	Almería (España)
Sicilia	Sicilia (Italia)
La Palma	Murcia (España)

3.4.- Insecticidas y sinergistas

Emamectina benzoato

Affirm es el nombre comercial de emamectina benzoato, desarrollado y comercializado por Syngenta. Es de aplicación foliar y está formulado en gránulos solubles en agua,

conteniendo un 0,95% p/p (9,5 g/kg) de emamectina benzoato (sustancia activa). El 0,95% de emamectina benzoato corresponde al 0,855% de emamectina ya que en España el registro se expresa en forma de Emamectina (base) en vez de Emamectina benzoato (sal) (Figura 3.5).

Figura 3.5. Affirm.

Metaflumizona

Alverde se formula como una suspensión concentrada (SC) con una composición 24% p/v de metaflumizona (240 g/l) y pertenece a BASF (Figura 3.6).

Figura 3.6. Alverde.

Azadiractina

Azadiractina es la materia activa de Align, desarrollado por Sipcam Iberica. Contiene azadiractina al 3,2% p/v (32 g/l) (Figura 3.7).

Figura 3.7. Align.

Lambda cihalotrín

Karate Zeon está compuesto por 10% p/v (100 g/l) de lambda cihalotrín, formulado en una suspensión de micro-cápsulas (CS) desarrollado por Syngenta (Figura 3.8).

Figura 3.8. Karate Zeon.

Metil clorpirifos

Reldan E contiene un 22,4% p/v (224 g/l) de metil clorpirifos, formulado como concentrado emulsionable (EC) (Figura 3.9).

Figura 3.9. Reldan E.

Butóxido de piperonilo (PBO)

El sinergista butóxido de piperonilo, pertenece a la empresa Sigma-Aldrich. Es un líquido amarillo pálido de consistencia aceitosa y puro de concentración (Figura 3.10).

Figura 3.10. PBO.

S,S,S-Tributil fosforo tritioato (DEF)

Es un líquido cuya pureza es del 97,2 % y pertenece a Sigma-Aldrich (Figura 3.11).

Figura 3.11. DEF.

Dietil maleato (DEM)

Dietil maleato pertenece a la empresa Sigma-Aldrich, su pureza es del 97% (Figura 3.12).

Figura 3.12. DEM.

En la Tabla 3.2 se muestra la dosis de campo de cada insecticida (fuente Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, MAPAMA).

Tabla 3.2. Insecticida, materia activa y dosis de campo (ppm).

Insecticida	Materia activa	Dosis de campo (ppm)
Affirm	Emamectina benzoato	15
Alverde	Metaflumizona	240
Align	Azadiractina	48
Karate Zeon	Lambda cihalotrín	20
Reldan E	Metil clorpirifos	896

3.5.- Cría de las poblaciones de *Tuta absoluta*

Como ya se ha comentado, las poblaciones se encuentran en jaulas de cría. En ellas se van introduciendo tantas plantas de tomate libres de residuos, plagas y enfermedades como sean necesarias para ir alimentando *ad libitum* la población. Una vez que las plantas están totalmente inservibles, la maceta no se extrae de la jaula hasta pasado un tiempo prudencial puesto que tuta, como se dijo en la introducción, crisálida tanto en la parte aérea como en el sustrato, además de pupar en cualquier borde de la maceta y se perdería una importante cantidad de individuos adultos. Pasado ese tiempo, se sacan las macetas de la jaula, se tira la turba y se congelan las macetas (al menos 24 horas) para evitar que escapen adultos de las crisálidas que pueda haber en ellas, ya que las macetas serán reutilizadas.

Una vez establecida la población se puede llevar a cabo el comienzo de los bioensayos.

El mantenimiento de las poblaciones es continuo, se les añade tanta planta como necesiten con la frecuencia que cada población demande.

3.6.- Bioensayos

3.6.1.- Sincronización de la oviposición

Para tener las larvas necesarias en el mismo estadio un día determinado y poder realizar el bioensayo, se lleva a cabo la sincronización de la oviposición, llamadas puestas. Éstas consisten en poner en una jaula, como la de cría anteriormente descrita, planta limpia de tomate e introducir adultos de la población objeto de estudio para que pongan huevos sobre el material vegetal durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se sacan los imágos y se devuelven a su jaula original. Las polillas son capturadas, tanto para poner como quitar la puesta, con ayuda de un aspirador entomológico.

En función de la temperatura, el número de días que tienen que transcurrir para tener el estadio larvario deseado para realizar el bioensayo es diferente.

3.6.2.- Bioensayo de susceptibilidad

El primer paso para poder hacer un bioensayo es poner una puesta, y transcurridos los días necesarios para que las larvas se encuentren en el estadio deseado para el estudio, se procede con los siguientes pasos.

3.6.2.1.- Preparación de las soluciones insecticidas

En primer lugar se prepara la solución madre. Ésta es una solución muy concentrada del producto a estudiar, de la cual se pipetea diferentes volúmenes, en función de las concentraciones finales necesarias.

Para que las mezclas sean homogéneas, se sitúan todos los vasos de plástico (1000 ml) sobre un agitador magnético con un imán en su interior (Figura 3.13). Por último, se añade a cada 100 ml de cada concentración una gota del mojante (Tween® 20: polyoxyethylenesorbitan monolaurate, 0.05% v/v), para mejorar la penetrabilidad y mojabilidad del caldo. Una de las concentraciones corresponde al control, que contiene agua destilada y mojante, sin insecticida (0 ppm).

Figura 3.13. Agitador magnético con los vasos.

3.6.2.2.- Tratamiento de las hojas

El siguiente paso es el tratamiento de las hojas de tomate de las cuales se van a alimentar las larvas. Se preparan tantos folíolos (con sus peciolo) como concentraciones y repeticiones se necesiten. Los bioensayos constan de diez larvas por repetición, tres repeticiones por concentración y el número de concentraciones varía en función del bioensayo y disponibilidad de larvas (entre 3 y 4 más un control).

Se introducen los folíolos uno a uno en la solución durante diez segundos y se ponen a secar introduciendo el peciolo en un vial con agua, para evitar la deshidratación mientras se secan. Los viales se sitúan sobre gradillas y se ponen lo suficientemente separados para que las hojas no se toquen entre sí y se produzcan contaminaciones con otras concentraciones (Figura 3.14). Los tratamientos se llevan a cabo en orden ascendente de concentración y en la campana de extracción.

Figura 3.14. Hojas tratadas con sus peciolo en viales con agua, sobre gradillas en el interior de la campana.

Una vez secas las hojas, se introducen en envases transparentes (127 x 100 x 45 mm, capacidad de 500 ml), con un algodón saturado en agua en el peciolo para evitar la deshidratación en el transcurso del bioensayo (72 horas) (Figura 3.15).

Figura 3.15. Envase con el foliolo tratado seco y algodón humedecido en el peciolo.

Finalmente, se introducen las larvas previamente sacadas de los foliolos de tomate de las plantas de las puestas, con ayuda de un pincel. Se cierran los envases con sus correspondientes con tapas agujereadas (para permitir la aireación y evitar la condensación) de cierre hermético (Figura 3.16).

Figura 3.16. Envase con las larvas en su interior, tapadera agujereada y rotulado.

El bioensayo se sitúa a temperatura de 26 ± 1 °C, 50-60% de humedad relativa y 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

3.6.2.3.- Lectura del bioensayo

Transcurridas 72 horas se determina el efecto del producto químico sobre las orugas, para ello se distinguen tres tipos de larvas:

- *Vivas*: no se ven afectadas, presentan un estado físico normal y se mueven con normalidad (movimientos coordinados).
- *Muertas*: completamente inmóviles y no responden cuando se les toca con el pincel.
- *Moribundas*: este tipo de orugas son aquellas a las que les ha afectado gravemente el insecticida pero no están muertas. Se pueden distinguir de la siguiente manera:
 - o Su tamaño es por lo menos dos veces más pequeño que las orugas del control, básicamente no se produce crecimiento durante los días que dura el bioensayo.
 - o Cuando las larvas se ponen boca arriba y aunque se vuelven a poner sobre sus patas, su movimiento es lento, torpe y no tiene coordinación.
 - o Las larvas pueden presentar signos de deshidratación, su apariencia es oscura, no se desarrollan normalmente, su cuerpo se curva y es imposible su recuperación.
 - o Cuando las larvas se ponen boca arriba y no son capaces de volver a ponerse en posición correcta.

Para determinar la susceptibilidad en función del estado de desarrollo se sigue la metodología descrita anteriormente. La única diferencia radica en que para que las tutas se encuentren en segundo o cuarto estadio larvario, el tiempo que transcurre desde que se realiza la puesta hasta que se lleva a cabo el bioensayo es de 9-11 días (L2) o entre 15-17 días (L4), en función de la temperatura.

3.6.3- Bioensayo de selección

La metodología seguida para forzar que tuta desarrolle resistencia, comienza del mismo modo que la metodología de los bioensayos.

En primer lugar se llevan a cabo las puestas y, transcurrido el tiempo necesario para que las orugas se encuentren en L2, se cuenta el número de las larvas que se encuentran en los folíolos de las plantas de la puesta. A continuación, se prepara una única concentración de insecticida a la cual van a ser tratadas todas las larvas. Se cortan las hojas de las plantas de tomate con las larvas en su interior y se introducen en la solución insecticida. Una vez secas las hojas (en gradillas con su viales, igual que en los bioensayos de susceptibilidad) se sitúan en envases transparentes del mismo tipo que los descritos anteriormente para los bioensayos, con las mismas condiciones ambientales y la hidratación.

En este caso el bioensayo se lee a las 96 horas. Las larvas vivas y moribundas resultantes se ponen en una jaula con planta de tomate (libre de residuos o tratada, depende del estudio que se esté llevando a cabo) y se procede a su cría pasando así a la siguiente “selección (S)”. La dosis a la cual se selecciona irá en aumento en función de la respuesta de la población frente al insecticida.

Conocido el número de larvas tratadas, ya que se contaron antes de seleccionarlás, y las larvas vivas al leer el bioensayo, se puede tener una estimación de la mortalidad.

Una vez haya adultos suficientes en la nueva jaula (siguiente selección), comienza de nuevo el ciclo de selección. La nueva dosis de tratamiento vendrá determinada por el resultado de la mortalidad de la selección anterior.

El número de larvas tratadas será aproximadamente de 1000, obteniendo así alrededor de unas 200 larvas vivas ya que un 20% de supervivencia es admisible para asegurar el mantenimiento de la siguiente generación de la población.

Durante el proceso de selección se realizan bioensayos de susceptibilidad, como los descritos en el apartado 3.6.2., para comprobar si aumenta la resistencia de la población al insecticida.

3.6.4.- Bioensayo de sinergistas

Los bioensayos de sinergistas se llevan a cabo del mismo modo que los de susceptibilidad con dos excepciones: las larvas siempre deben encontrarse en segundo estadio y, una vez extraída la larva de la planta de la puesta, se le aplica un sinergista (PBO, DEF o DEM) al cuerpo de la larva con ayuda de una micropipeta (con 10 μ l se pueden mojar cinco L2), antes de ponerla sobre la hoja de tomate tratada (Figura 3.17).

Figura 3.17. Disposición de los envases de todos los tipos de bioensayos.

3.7.- Análisis de datos

Los datos tomados de los ensayos se introducen en el programa Polo Plus (Probit and Logit Analysis, versión 1.0). Polo Plus es un programa estadístico desarrollado específicamente para analizar datos obtenidos de bioensayos con insecticidas (Robertson *et al.*, 1980). Así se obtiene la mortalidad Probit a la concentración deseada.

3.8.- Bibliografía

Robertson, J.L., Russell, R.M. y Savin, N.E. 1980. "Polo: a user's guide to probit or logit analysis". Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station. General Technical Report PSW-38.

Páginas web

<http://www.mapama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25353.pdf>. Acceso diciembre 2016.

<http://www.mapama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25414.pdf>. Acceso diciembre 2016.

<http://www.mapama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/23291.pdf>. Acceso diciembre 2016

<http://www.mapama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/22398.pdf>. Acceso diciembre 2016.

<http://www.mapama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/12211.pdf>. Acceso diciembre 2016.

4.- SUSCEPTIBILIDAD BASAL DE POBLACIONES MEDITERRÁNEAS DE *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) A EMAMECTINA BENZOATO, METAFLUMIZONA, AZADIRACTINA, LAMBDA CIHALOTRÍN Y METIL CLORPIRIFOS

4.1.- Introducción

Tuta se detectó por primera vez en España en invernaderos de tomate en Castellón en el invierno de 2006 (Desneux *et al.*, 2010). Los primeros daños en la Región de Murcia fueron observados a finales de agosto de 2007 en plantaciones de tomate en Águilas. La dispersión de esta plaga desde España a Europa y África fue progresiva pero rápida (García-Marí y Vercher, 2010).

La elevada tasa de reproducción de tuta y los cuantiosos daños que provocan las larvas en hojas, tallos y frutos del cultivo del tomate (Apablaza, 1992), ha hecho que el control de este lepidóptero sea clave en la producción de tomate al aire libre e invernadero (Llopis *et al.*, 2010).

Los productos químicos han sido la principal estrategia de control para este insecto. Para mantener los niveles poblacionales bajos se realizan tratamientos insecticidas repetidamente. Entre los productos disponibles los primeros años, sólo spinosad e indoxacarb eran efectivos, ya que los organofosforados y piretroides no parecían conseguir buenas eficacias en las poblaciones de tuta de España. Al inicio de la invasión de tuta, el uso único de los compuestos spinosad e indoxacarb provocaba una fuerte presión sobre la plaga incrementando el riesgo de desarrollo de resistencia, como ya ha sucedido en otras plagas cuando pocos productos son muy efectivos en su control y se aplican de manera exclusiva (Bielza *et al.*, 2007). Para evitar el tratamiento reiterado con sólo dos productos y el riesgo del desarrollo de resistencia, se solicitó al Ministerio la autorización de otros cuatro productos (emamectina benzoato, metaflumizona, flubendiamida y clorantraniliprol) para el control de tuta (Bielza, 2010), los cuales fueron registrados posteriormente.

Para evitar el desarrollo de resistencias es necesario establecer una estrategia anti-resistencia. El primer paso consiste en conocer el estado actual de la susceptibilidad de tuta, por ello se estudia la línea base de susceptibilidad (LBS). Se mide la susceptibilidad inicial de las diferentes poblaciones de tuta, antes de someterlas a presión de selección con los compuestos en estudio, y con los resultados se calcula la línea base de susceptibilidad. En este caso todas las poblaciones disponibles son de campo y han sufrido diferentes tratamientos antes de llegar al laboratorio. La LBS es la

primera toma de datos, pone de manifiesto el estado de la susceptibilidad de tuta y así se establece el punto de partida del estudio. Con estos datos se pueden hacer comparaciones posteriores y comprobar los cambios ocurridos en el estado de la resistencia de tuta.

El objetivo de este capítulo consiste en conocer la susceptibilidad inicial de tuta, la línea base de susceptibilidad de tuta a emamectina, metaflumizona, azadiractina, lambda cihalotrin y metil clorpirifos y comprobar la evolución en el tiempo de la resistencia de tuta. Además se estudiará la susceptibilidad de tuta en función del estadio larvario, a los diferentes insecticidas nombrados.

4.2.- Material y Métodos

4.2.1.- Poblaciones de insectos

Las poblaciones de tuta bioensayadas para determinar la línea base de susceptibilidad se encuentran descritas en el apartado “3.3.- Poblaciones de *Tuta absoluta*”, Tabla 3.1.

4.2.2.- Insecticidas

Los insecticidas para los cuales se ha obtenido la línea base de susceptibilidad son: emamectina benzoato, metaflumizona, azadiractina, lambda-cihalotrin y metil clorpirifos. Sus nombres comerciales, concentración y formulación de la materia activa se encuentran detallados en el apartado “3.4.- Insecticidas y sinergistas”.

4.2.3.- Bioensayos

Para conocer la concentración letal 50 (CL₅₀), es decir, la concentración a la cual se muere el 50% de la población, se llevan a cabo los bioensayos de susceptibilidad descritos en el apartado “3.6.2.- Bioensayos de susceptibilidad”. Ambos tipos de bioensayos van precedidos de la correspondiente puesta, explicada en el apartado “3.6.1.- Sincronización de la oviposición”. Los resultados de los bioensayos mostrados desde el apartado 4.3.1 hasta 4.3.5 están realizados con larvas en segundo estadio. Y los resultados del apartado 4.3.6 fueron obtenidos de ensayos en larvas de segundo y cuarto estadio.

4.2.4.- Análisis estadístico

El análisis de los datos se lleva a cabo con el programa estadístico Polo Plus, como se comentó en el apartado “3.7.- Análisis de datos”.

4.3.- Resultados y discusión

Se han bioensayado las mismas once poblaciones para los cinco productos: emamectina benzoato, metaflumizona, azadiractina, lambda cihalotrín y metil clorpirifos. Estas poblaciones corresponden a los años iniciales de la expansión de tuta (2010-2013), por lo que se han usado para calcular la línea base de susceptibilidad para cada producto en tuta. En años posteriores se recolectaron otras poblaciones y se estudia su susceptibilidad frente a los mismos cinco productos, pudiendo así observar la evolución de la sensibilidad de tuta con el paso del tiempo al comparar los resultados de estas poblaciones con la línea base de susceptibilidad. Entre esas poblaciones se encuentra Sicilia, población recolectada en la isla italiana del mismo nombre y con antecedentes de fallos de control en campo por diamidas.

Las tablas de los apartados 4.3.1-4.3.5 mantienen la misma estructura. En ellas se muestra de izquierda a derecha el nombre de la población, la concentración letal 50 con sus límites fiduciales (95% de confianza), factor de resistencia (FR), la pendiente y su error. Los datos están ordenados de arriba a abajo de la población más susceptible a la más resistente frente al producto. En la última fila de la tabla donde se muestran los resultados las primeras poblaciones que llegaron al laboratorio, se encuentra la línea base de susceptibilidad (LBS).

4.3.1.- Susceptibilidad a emamectina benzoato

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados para emamectina benzoato. La población más sensible a emamectina es Cañada de Gallego, con una CL_{50} de 0,009 ppm, siendo la menos susceptible Boavista con un valor de CL_{50} de 0,019 ppm. Por tanto, el factor de resistencia más alto de las poblaciones estudiadas es 3,2. Boavista es 3,2 veces menos susceptible a emamectina que Cañada, pero ese valor es relativamente bajo, no se puede decir que hay resistencia a emamectina en dicha población. De hecho, se puede decir que hay una variabilidad natural entre las once poblaciones bastante baja. Esto puede ser debido a la alta homogeneidad genética observada en las poblaciones de la polilla del tomate de América del Sur y Europa, lugar de origen de dicha especie desde donde se dispersaron (Suinaga *et al.*, 2004; Cifuentes *et al.*, 2011), ya que existe la teoría de que fue una única población la que llegó a Europa (Cifuentes *et al.*, 2011; Guedes y Siqueira, 2012). Por ello, la escasa variabilidad genética se puede justificar con el hecho de que fue una única población la que llegó al Mediterráneo y además con una baja heterogeneidad genética. La CL_{50} combinada de estas poblaciones es de 0,014 ppm estableciéndose como la línea base de susceptibilidad (LBS) para emamectina, y será

usado como referencia para observar cambios en la susceptibilidad a este insecticida en los estudios de seguimiento de la evolución de la resistencia.

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados frente a emamectina de cinco poblaciones más, recolectadas entre 2014 y 2016, para conocer la evolución de la resistencia de tuta con el tiempo. La población La Palma muestra más susceptibilidad frente a emamectina que la LBS. Como se puede observar en los datos de la población Mixta (la cual es una mezcla de siete de las once poblaciones que forman la LBS, Tabla 3.1), muestra una CL_{50} similar a la de la LBS de emamectina. Sicilia (FR 2,4) y Mojonera (FR 2,9) muestran factores de resistencia bajos, y se encuentran dentro de la normalidad en la variabilidad entre poblaciones.

La dosis máxima de campo para emamectina es de 15 ppm (Tabla 3.2). Aunque ninguna de las poblaciones muestra un valor cercano a 15 ppm en su CL_{50} , es necesario mantener programas de gestión de resistencias porque tuta demuestra que es capaz de desarrollar resistencia. Esto se observa entre la población Cañada de Gallego y Mojonera, donde esta última es casi cinco veces menos susceptible a emamectina que Cañada.

Lo mismo sucede en otros dos lepidópteros plaga pero de forma más acusada, donde no se observan concentraciones letales elevadas, al igual que sucede en tuta, pero los factores de resistencia sí son alarmantes. En *Plutella xylostella* se observa un factor de resistencia de 60,5 (Zhao *et al.*, 2006) y en *Spodoptera litura* de 77 (Ahmad *et al.*, 2008) y 80 (Shad *et al.*, 2010). Estos valores alertan de la capacidad de desarrollo de resistencia de ambos lepidópteros a emamectina. Si no se mantiene una estrategia adecuada de tratamientos, el control de estos insectos con emamectina se verá comprometido.

Datos similares a los observados en las tablas 4.1 y 4.2 se pueden ver en los ensayos realizados con emamectina por Zhao *et al.* (2006), en diferentes poblaciones de *P. xylostella* de Estados Unidos y México. De las poblaciones bioensayadas de *Plutella*, 4 de ellas son más susceptibles al insecticida (0,002-0,0065 ppm) que cualquier población de tuta de la Tabla 4.1 y 4.2. Por el contrario, otra población es considerablemente menos sensible a emamectina (CL_{50} 0,121 ppm) que la población más “resistente” de tuta (Mojonera). Sin embargo, también hay poblaciones de *Plutella* que muestran bastante similitud en el estado de la susceptibilidad a emamectina. Esto se observa en las poblaciones Almería, Tudela, Níjar, Canarias y La Palma, coincidentes con la población de *Plutella* con una CL_{50} de 0,0113 ppm; Foggia y Mixta se aproximan a la susceptibilidad de otra población de *Plutella* con un valor de CL_{50} de 0,0149 ppm y Sicilia a la población que muestra una CL_{50} de 0,0345 ppm.

Tabla 4.1. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a emamectina benzoato.

Población	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Cañada de Gallego	0,009	0,005	0,012	-	2,229	0,441
Charneca	0,009	0,005	0,017	1,1	1,375	0,401
Almería	0,010	0,005	0,016	1,2	2,144	0,341
Tudela	0,011	0,007	0,015	1,3	1,857	0,297
Níjar	0,011	0,008	0,016	1,3	3,121	0,494
Canarias	0,012	0,006	0,017	1,4	2,903	0,663
Águilas	0,013	0,010	0,016	1,5	3,157	0,604
Foggia	0,014	0,009	0,025	1,7	2,697	0,450
Biancavilla	0,018	0,012	0,033	2,1	1,749	0,400
Abarán	0,025	0,016	0,063	2,9	2,000	0,343
Boavista	0,027	0,019	0,059	3,2	2,347	0,804
Línea base	0,014	0,012	0,016	1,6	2,083	0,140

Tabla 4.2. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia respecto a la línea base, pendiente y error de cuatro poblaciones de campo a emamectina.

Población	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
La Palma	0,011	0,0001	0,055	0,08	0,681	0,139
Mixta	0,014	0,007	0,022	1	1,704	0,485
Calnegre	0,021	0,002	0,064	1,5	1,160	0,289
Sicilia	0,034	0,013	0,067	2,4	1,270	0,236
Mojonera	0,041	0,018	0,107	2,9	1,121	0,377

La susceptibilidad que muestran Biancavilla, Abarán y Calnegre a emamectina es similar a la de una población sensible de *Spodoptera litura* (0,02 ppm) (Shad *et al.*, 2010), son valores bajos de susceptibilidad. Sin embargo, ensayos realizados con *Spodoptera littoralis* muestran que esta especie es menos sensible a emamectina que tuta, ya que los resultados de la CL₅₀ (0,09 y 0,34 ppm) se encuentran por encima de los de tuta (Tabla 4.1 y 4.2).

Abamectina (avermectina B₁) es una de las avermectinas más usadas para el control de plagas en agricultura (Clark *et al.*, 1995). Emamectina es un derivado de la abamectina,

synthesized in 5 steps and is much more potent against lepidoptera than abamectin (Jansson *et al.*, 1996; Rugg *et al.*, 2005).

Knowing that abamectin is less effective than emamectin, factors of resistance of 5,7 (Dağlı *et al.*, 2012), 8,9 (Silva *et al.*, 2011) and 9,4 (Siqueira *et al.*, 2001) in tuta to abamectin, can be considered low, although they remain higher than those that show any population of tuta to emamectin (Table 4.1 and 4.2). These low levels of resistance to abamectin, can be due to the low dose used and to its rapid degradation (Clark *et al.*, 1995).

4.3.2.- Susceptibilidad a metaflumizone

The baseline of susceptibility of tuta to metaflumizone is 0,067 ppm, showing a resistance factor of 5,2 against the most sensitive population (Tudela) (Table 4.3). This data is similar to the resistance factor obtained by Roditakis *et al.*, (2012) in populations of tuta whose value is 5.

The most resistant population of tuta is Foggia with a resistance factor of 11, followed by Biancavilla, Águilas and Almería (Table 4.3). These values are within the natural variability between populations and are found above those obtained in the Greek populations by Roditakis *et al.*, (2013). Even so, it is worth highlighting the range of the CL_{50} of these populations of Greece, which oscillates from 31,8 to 159,5 ppm (Roditakis *et al.*, 2013), values considerably higher than those observed in tables 4.3 and 4.4 (0,013-0,337 ppm). They are also less susceptible to metaflumizone the populations of Turkey tested by Dağlı *et al.*, (2012), with a range of the CL_{50} of 153,2-1350 ppm and those studied by Karaağaç (2015), with values of 13,25 to 52,71 ppm, in populations of tuta also from Turkey. Despite these high values of concentration lethal, they return to observe moderate values of resistance, 9 (Dağlı *et al.*, 2012), which is surpassed by Almería, Águilas, Biancavilla and Foggia (Table 4.3). And values quite low of the resistance factor, 1,8-4 (Karaağaç, 2015) where only Tudela and Boavista are found below these values (Table 4.3).

Of the populations bioassayed in 2016, only Mojonera shows a decrease in susceptibility with a resistance factor with respect to the baseline of susceptibility of 5. This factor is close to 26 if compared with the most sensitive population, Tudela (Table 4.4).

The data of Table 4.3 and 4.4 are quite far from reaching the field dose for this compound, 240 ppm (Table 3.2). Even so, the Mojonera population is approximately 26 times less susceptible than Tudela, the reference sensitive.

Esto muestra que tuta puede desarrollar “resistencia” a este compuesto, por tanto se aconseja diseñar una adecuada estrategia anti-resistencia a la hora de llevar a cabo los tratamientos insecticidas.

Tabla 4.3. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a metaflumizona.

Población	CL₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Tudela	0,013	0,003	0,029	-	0,908	0,180
Boavista	0,021	0,003	0,100	1,6	1,073	0,174
Níjar	0,028	0,003	0,087	2,2	0,837	0,200
Abarán	0,044	0,002	0,122	3,4	0,655	0,234
Canarias	0,050	0,009	0,115	3,8	0,661	0,163
Charneca	0,055	0,023	0,144	4,2	1,035	0,159
Cañada de Gallego	0,077	0,034	0,131	5,9	1,063	0,233
Almería	0,122	0,027	0,339	9,4	0,681	0,155
Águilas	0,129	0,076	0,205	9,9	1,251	0,237
Biancavilla	0,132	0,048	0,619	10,1	0,787	0,163
Foggia	0,144	0,015	0,993	11,0	0,718	0,196
Línea base	0,067	0,049	0,088	5,2	0,770	0,045

Tabla 4.4. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia respecto a la línea base, pendiente y error de tres poblaciones de campo a metaflumizona.

Población	CL₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Calnegre	0,041	0,003	0,103	0,6	0,686	0,230
Sicilia	0,086	0,034	0,179	1,3	1,045	0,275
Mojonera	0,337	0,171	0,992	5,0	0,960	0,229

En otros lepidópteros plaga, la susceptibilidad frente metaflumizona es bastante menor que la de tuta. En *Spodoptera exigua* se observan valores de CL₅₀ de 15,1 (Tian *et al.*, 2014; Su y Sun, 2014) y rangos de 1,91 a 152,8 ppm en *Plutella xylostella* (Wang *et al.*, 2016). De las 10 poblaciones de *Plutella*, 8 muestran un ratio de resistencia que oscila de 3 a 10, siendo superados por Biancavilla y Foggia (Tabla 4.3), las otras dos presentan factores de resistencia muy elevados, 49 y 70 (Wang *et al.*, 2016) en comparación con los datos de la Tabla 4.3 y 4.4.

4.3.3.- Susceptibilidad a azadiractina

El factor de resistencia de la línea base de susceptibilidad de azadiractina es de 5, con una CL_{50} próxima a 3 ppm. Para este compuesto, Níjar es la población más susceptible y Abarán la más resistente, mostrando valores de CL_{50} de 0,589 y 11,305 ppm respectivamente. Abarán es casi 20 veces más resistente que la población más sensible. Todos estos bioensayos fueron realizados en 2012 (Tabla 4.5).

Posteriormente, en 2016 se estudió la susceptibilidad de Mojonera, Calnegre y Sicilia a azadiractina, las cuales mostraron factores de resistencia respecto a la línea base de susceptibilidad de 2,2, 4,0 y 4,7, respectivamente (Tabla 4.6). Estos ensayos realizados 4 años más tarde, en general, muestran una leve tendencia a disminuir su susceptibilidad a azadiractina.

El valor más elevado de CL_{50} de tuta a azadiractina es próximo a 14 ppm y la dosis de campo para este compuesto es 48 ppm (Tabla 3.2), por tanto el control eficaz de este insecticida en tuta no se vería comprometido. A pesar de ello, Sicilia es casi 24 veces menos susceptible a azadiractina que Níjar. Por tanto, es de vital importancia la implantación de una estrategia de tratamientos debido al posible desarrollo de resistencias de tuta a azadiractina.

Tabla 4.5. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a azadiractina.

Población	CL_{50}	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Níjar	0,589	0,031	1,653	-	0,829	0,239
Tudela	1,329	0,223	3,089	2,3	0,934	0,219
Cañada de Gallego	1,876	0,487	4,024	3,2	1,125	0,361
Águilas	2,186	1,197	3,536	3,7	1,662	0,307
Canarias	2,813	0,390	6,771	4,8	0,843	0,200
Biancavilla	3,197	0,506	8,592	5,4	1,234	0,242
Foggia	3,455	0,769	8,232	5,9	0,788	0,218
Almería	3,813	1,984	6,255	6,5	1,822	0,345
Charneca	5,921	2,647	11,378	10,1	1,591	0,265
Boavista	7,282	1,210	24,734	12,4	0,875	0,238
Abarán	11,305	5,386	24,104	19,9	0,753	0,159
Línea base	2,965	2,214	3,814	5,0	0,967	0,070

Tabla 4.6. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de tres poblaciones de campo a azadiractina.

Población	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Mojonera	6,670	1,079	22,198	2,2	0,707	0,234
Calnegre	11,809	2,674	32,006	4,0	0,980	0,312
Sicilia	13,922	3,067	29,988	4,7	1,191	0,404

Los datos obtenidos en las poblaciones de Abarán, Calnegre y Sicilia (Tabla 4.5 y 4.6) se encuentran dentro del rango de valores de la CL₅₀ en poblaciones turcas de tuta, 10,9-88,1 ppm (Dağlı *et al.*, 2012). Para una población de Brasil de tuta también se obtuvo el valor de 10,9 ppm (CL₅₀) frente a azadiractina (Tomé *et al.*, 2013), valor que se encuentra entre Boavista (7,282 ppm) y Abarán (11,305 ppm).

La susceptibilidad de Charneca frente a azadiractina (5,9 ppm) es similar a la observada en una población brasileña de tuta (5,62 ppm) (Tomé *et al.*, 2013).

Un elevado nivel de resistencia fue encontrado en una población de tuta de Egipto cuya CL₅₀ es de 620 ppm (Abd El-Ghany *et al.*, 2016), valor muy elevado en comparación con los de las poblaciones mostradas en las Tablas 4.5 y 4.6.

Por otro lado, una población de *Helicoverpa armigera* muestra ser más sensible a azadiractina (0,62 ppm) (Singh *et al.*, 2007) que todas las poblaciones bioensayadas de tuta (Tabla 4.5 y 4.6), exceptuando la población de tuta tomada como sensible de referencia, Níjar (0,589 ppm), que es más susceptible.

4.3.4.- Susceptibilidad a lambda cihalotrín

La CL₅₀ combinada de las once poblaciones bioensayadas a lambda cihalotrín es de 153 ppm y el factor de resistencia es 2. El factor de resistencia más elevado es el de la población Águilas, 7,8 (CL₅₀ 591 ppm). La población más sensible es Cañada de Gallego (al igual que para emamectina) con una CL₅₀ de 76 ppm (Tabla 4.7). La susceptibilidad de Biancavilla (500 ppm) a lambda cihalotrín es similar a la de una población egipcia que muestran un valor de CL₅₀ de 490 ppm (El-Ghany *et al.*, 2016) y la de Charneca (158 ppm) a la de una población de *Spodoptera littoralis* (152,54 ppm) (Saad *et al.*, 2016).

Se han encontrado poblaciones de tuta más susceptibles a lambda cihalotrín que la población más sensible de tuta (76 ppm) de la Tabla 4.7. Estas poblaciones son de Arica (Chile) y muestran una CL₅₀ de 35,28 ppm (Salazar y Araya, 2001).

Lo mismo sucede para otro lepidóptero, *Helicoverpa armigera*, donde los valores de las CL₅₀ de las poblaciones bioensayadas a lambda cihalotrín, muestran un rango de valores de 32,47-72,48 ppm (Aheer *et al.*, 2009), el cual se encuentra por debajo de los observados en tuta (Tabla 4.7 y 4.8). Sólo una población es algo menos susceptible al compuesto y su CL₅₀ es de 130,02 ppm (Aheer *et al.*, 2009), valor que se encuentra entre la población Canarias (98 ppm) y Charneca (158 ppm). El factor de resistencia de las poblaciones de *H. armigera* es 4 (Aheer *et al.*, 2009). Se puede considerar un valor bajo, se encuentra entre el de la población Almería (3,6) y Tudela (4,4).

Por otro lado, una población de *Spodoptera littoralis* muestra una elevada resistencia a lambda cihalotrín, su CL₅₀ es de 1926 ppm, valor muy por encima del que muestra la población de tuta menos susceptible a esta materia activa (Águilas 591 ppm).

En las poblaciones bioensayadas en 2016 no se observa desarrollo de la resistencia a lambda cihalotrín. Calnegre muestran un factor de resistencia de 2,7 y Mojonera de 3, respecto a la línea base de susceptibilidad (Tabla 4.8). La susceptibilidad de estas dos poblaciones, es inferior a la que muestran Abarán, Biancavilla y Águilas (Tabla 4.7). Por lo tanto, no ha habido desarrollo de resistencia de tuta a lambda cihalotrín con el paso del tiempo.

Se vuelven a observar factores de resistencia aceptables dentro de la variabilidad natural de las poblaciones. Pero cabe destacar la importancia de las elevadas CL₅₀ (76-591 ppm) que se observan en todas las poblaciones bioensayadas, tanto las de la Tabla 4.7 como 4.8. Son datos elevados si se comparan con la dosis de campo máxima recomendada para orugas en tomate que es de 20 ppm (Tabla 3.2). La población más sensible a lambda es Cañada de Gallego y tiene una CL₅₀ casi 4 veces superior a la dosis de campo. Águilas es la población menos sensible a lambda cihalotrín y su CL₅₀ es casi 30 veces superior a la dosis de campo. Si se parte de que la dosis de campo recomendada eliminaría un alto porcentaje (80-90%) de la población, y en este estudio se compara con la concentración a la cual se muere el 50% de los individuos, es más alarmante aún la diferencia entre la dosis de campo y los resultados de tuta mostrados.

De los cinco productos estudiados en este apartado, lambda cihalotrín es el único en el que tuta muestra resistencia con factores de resistencia que oscilan de 4 a 30 respecto a la dosis de campo. Estos resultados se pueden deber a varios factores, como que la dosis de campo de este insecticida para tuta esté subestimada y/o el mal uso de esta materia activa haya provocado el desarrollo de resistencias. En todo caso, no parece que este compuesto tenga una efectividad alta frente a tuta, por lo que se desaconseja su uso.

Tabla 4.7. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a lambda cihalotrín.

Población	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Cañada de Gallego	76	41	126	-	1,301	0,202
Foggia	95	8	186	1,3	1,001	0,329
Boavista	96	30	260	1,3	1,194	0,281
Canarias	98	8	203	1,3	1,003	0,330
Charneca	158	67	255	2,1	2,015	0,449
Níjar	172	19	390	2,3	0,959	0,241
Almería	276	53	559	3,6	1,516	0,393
Tudela	335	114	524	4,4	1,769	0,441
Abarán	434	256	579	5,7	2,188	0,661
Biancavilla	500	243	1147	6,6	1,148	0,382
Águilas	591	150	1028	7,8	1,481	0,413
Línea base	153	112	197	2	1,008	0,083

Tabla 4.8. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de tres poblaciones de campo a lambda cihalotrín.

Población	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Sicilia	202	93	323	1,3	1,655	0,375
Calnegre	414	211	668	2,7	1,873	0,421
Mojonera	463	215	851	3,0	0,982	0,232

4.3.5.- Susceptibilidad a metil clorpirifos.

La población más sensible a metil clorpirifos, de las once que forman la LBS, es Almería con una CL₅₀ de 5,8 ppm y la menos susceptible Águilas, con una CL₅₀ de 27,6 ppm. El factor de resistencia de la población menos sensible es de 4,7, factor bajo, encuadrándose dentro de la variabilidad natural entre poblaciones. La LBS de tuta de metil clorpirifos es de 24,2 con un factor de resistencia de 4,2 (Tabla 4.9).

Los resultados obtenidos para metil clorpirifos en todas las poblaciones mediterráneas de tuta estudiadas en la Tabla 4.9 y 4.10 (76-500 ppm), excepto el de la población Águilas, se encuentran por debajo del rango de valores obtenidos en las poblaciones de tuta de Grecia a clorpirifos (530-2038 ppm) (Roditakis *et al.*, 2013), las poblaciones de

este estudio son más sensibles. La población Águilas se encuentra dentro del rango de las poblaciones griegas (591 ppm).

Los resultados que muestran Almería, Charneca, Tudela y Biancavilla, se encuentran en el rango de valores de 0,451 a 10,861 ppm obtenidos en la especie *Rhyzopertha dominica* (Lorini y Galley, 2001). Sin embargo, su factor de resistencia es de 23,9, un valor bastante elevado comparándolo con el máximo observado para tuta (4,7).

Las poblaciones estudiadas en 2016 son más sensibles a metil clorpirifos que la LBS (Tabla 4.10). Observando los resultados de las Tablas 4.9 y 4.10 se puede concluir que con el paso del tiempo, las poblaciones de tuta no han desarrollado resistencia a metil clorpirifos, de hecho, se han hecho más susceptibles a dicho compuesto.

Los resultados de susceptibilidad mostrados en las tablas 4.9 y 4.10 quedan bastante lejos de alcanzar la dosis de campo de metil clorpirifos, 896 ppm (Tabla 3.2). Por tanto, dicho compuesto podría ser usado contra tuta y tendría un control eficaz de la plaga.

Tabla 4.9. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de once poblaciones de campo y línea base de susceptibilidad a metil clorpirifos.

Población	CL₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Almería	5,8	1,8	11,9	-	1,324	0,216
Charneca	7,1	4,0	14,7	1,2	2,945	0,527
Tudela	8,3	4,1	13,7	1,4	1,376	0,270
Biancavilla	8,9	3,2	17,0	1,5	2,777	0,596
Canarias	13,3	5,1	77,9	2,3	1,058	0,252
Níjar	13,4	6,0	47,5	2,3	1,079	0,257
Foggia	14,4	5,7	24,7	2,5	2,922	0,482
Abarán	17,0	7,0	50,8	2,7	1,317	0,356
Boavista	18,9	7,6	38,1	3,3	1,711	0,317
Cañada de Gallego	24,2	11,0	204,4	4,2	1,370	0,325
Águilas	27,6	18,8	44,8	4,7	1,744	0,216
Línea base	24,2	17,5	34,6	4,2	1,015	0,069

Tabla 4.10. Población, concentración letal 50, límites fiduciales (95% confianza), factor de resistencia, pendiente y error de tres poblaciones de campo a metil clorpirifos.

Población	CL₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Calnegre	1,6	0,3	3,6	0,07	0,991	0,289
Mojonera	7,4	3,7	15,8	0,3	1,245	1,245
Sicilia	8,1	3,6	23,7	0,3	0,943	0,251

4.3.6.- Susceptibilidad en función del estadio larvario

Todos los bioensayos realizados en esta tesis se llevan a cabo en larvas de segundo estadio (L2). En este caso se ha querido conocer cómo varía la susceptibilidad de tuta en larvas de cuarto estadio (L4) y así poder comparar la susceptibilidad y el estadio larvario.

Las tablas donde se muestran los resultados indican el producto estudiado, el estadio larvario bioensayado, la concentración letal 50 obtenida (con sus límites fiduciales al 95%) y el factor de resistencia de las larvas en cuarto estadio sobre las larvas de segundo estadio (L4/L2). Si el valor del FR es mayor que 1, las larvas de cuarto estadio serán más resistentes que las de segundo estadio. Por el contrario, si el valor del FR está por debajo de 1, las larvas de cuarto estadio serán más sensibles que las de segundo estadio.

Los resultados mostrados en la Tabla 4.11 de los ensayos de larvas de segundo estadio, corresponden a los de la línea base de susceptibilidad (LBS) que se ha visto anteriormente (Tabla 4.1, 4.3, 4.5, 4.7 y 4.9). Y los resultados de los bioensayos llevados a cabo en larvas de cuarto estadio corresponden a la población Mixta, que es una mezcla de siete poblaciones fundada en octubre de 2013 (apartado 3.3).

Como se puede observar en la Tabla 4.11, todos los valores de las CL₅₀ de las larvas de cuarto estadio son superiores a los de la L2, menos en el producto metil clorpirifos. Aún siendo valores superiores, los de la L4 frente a los de la L2, los factores de resistencia son muy bajos. El valor más alto es el de lambda cihalotrín (4,06), producto para el que se observan diferencias significativas entre los resultados de larvas de diferente estadio, siendo las larvas de cuarto estadio 4 veces más resistentes que las del segundo estadio.

En el caso de metil clorpirifos, las larvas de segundo estadio son 5,15 veces más resistentes a metil clorpirifos que las L4, observándose diferencias significativas entre los límites. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los límites de los

resultados para emamectina, metaflumizona y azadiractina, por tanto tienen la misma susceptibilidad independientemente del estadio larvario

Sin embargo, ensayos realizados en larvas de tercer (L3) y quinto (L5) estadio de *Spodoptera littoralis* a emamectina, muestran que las larvas de quinto estadio son menos susceptibles al tóxico que las de tercer estadio, respecto a la CL₅₀. Y el factor de resistencia de las larvas más maduras frente a las más inmaduras es de 3 (Sayed y Sheikh, 2015). Para el caso de emamectina en tuta, aunque los datos obtenidos de la L4 son algo superiores a los obtenidos en la L2, ambos estadios no mostraron diferencias significativas entre ellos, con un factor de resistencia de 1,12 (Tabla 4.11).

En otros compuestos, *Bacillus thuringiensis* y spinosad, también se observó que en tuta las larvas de primer estadio (más inmaduras) eran más susceptibles a dichos compuestos que las larvas de segundo y tercer estadio (Hashemitassuji *et al.*, 2014). Esto sucede para el caso de lambda cihalotrín, donde las larvas más inmaduras (L2) son más susceptibles que las de cuarto estadio (Tabla 4.11).

Los datos de la Tabla 4.11 muestran que la susceptibilidad no va ligada al estadio larvario en emamectina benzoato, metaflumizona y azadiractina, ya que en ambos estadios la susceptibilidad es similar. Sin embargo, en lambda cihalotrín las larvas más maduras (L4) son 4 veces más resistentes que las L2. Y al contrario sucede para metil clorpirifos, donde las L2 son 5 veces menos susceptibles que las L4.

Tabla 4.11. Producto, estadio larvario, concentración letal 50 y sus límites fiduciales y el factor de resistencia.

Producto	Estadio	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	FR
Emamectina benzoato	L2	0,0139	0,0120	0,0160	1,12
	L4	0,0156	0,0093	0,0244	
Metaflumizona	L2	0,067	0,049	0,088	1,15
	L4	0,077	0,009	0,171	
Azadiractina	L2	2,961	2,214	3,814	2,33
	L4	6,891	2,231	15,668	
Lambda cihalotrín	L2	153	112	197	4,06
	L4	621	444	722	
Metil clorpirifos	L2	24,2	17,6	34,6	0,19
	L4	4,7	1,0	14,2	

4.4.- Conclusiones

4.4.1.- Susceptibilidad a emamectina benzoato

Las poblaciones mediterráneas de tuta son bastante susceptibles a emamectina, con valores de la CL_{50} (0,009-0,041 ppm) muy por debajo (1666-366 veces) de la dosis recomendada de campo (15 ppm). No se ha encontrado resistencia a este insecticida en ninguna población estudiada. La línea base de susceptibilidad para emamectina es 0,014 ppm, que podrá ser usada como referencia en estudios de seguimiento de la resistencia a este insecticida.

4.4.2.- Susceptibilidad a metaflumizona

Las poblaciones de tuta de la cuenca mediterránea estudiadas son muy sensibles a metaflumizona (CL_{50} : 0,013-0,337 ppm). La población más “resistente” a este compuesto (Mojonera) muestra un valor 712 veces por debajo de la dosis de campo recomendada para este insecticida. La línea base de susceptibilidad de tuta a metaflumizona es de 0,067 ppm, dato que se puede usar de referencia en el seguimiento de la resistencia de esta plaga a metaflumizona.

4.4.3.- Susceptibilidad a azadiractina

La susceptibilidad de las poblaciones de tuta estudiadas frente a azadiractina oscila entre 0,589 y 13,922 ppm, valores bajos y lejanos de la dosis de campo (48 ppm). La línea base de susceptibilidad de tuta a azadiractina puede ser tomada como referencia para comparaciones futuras en el seguimiento de la resistencia de tuta a azadiractina (2,925 ppm).

4.4.4.- Susceptibilidad a lambda cihalotrín

Todas las poblaciones mediterráneas de tuta estudiadas muestran valores de CL_{50} (76-591 ppm) superiores a la dosis de campo recomendada (20 ppm). La línea base de susceptibilidad obtenida también se encuentra por encima de la dosis de campo (153 ppm), siendo este valor una referencia para futuros estudios del estado de la resistencia de tuta a lambda cihalotrín. Las poblaciones de tuta estudiadas muestran resistencia a este insecticida.

4.4.5.- Susceptibilidad a metil clorpirifos

La línea base de susceptibilidad de las poblaciones de tuta de la cuenca mediterránea frente a metil clorpirifos es de 24,2 ppm. Este valor muestra que las poblaciones de tuta de este estudio son bastante sensibles a metil clorpirifos ya que la dosis de campo es de

896 ppm. En los ensayos realizados en 2016 se observa que la susceptibilidad de tuta ha aumentado con el paso del tiempo. No se ha observado resistencia en tuta frente a metil clorpirifos.

4.4.6.- Susceptibilidad en función del estadio larvario

Tuta tiene una susceptibilidad similar en larvas de segundo y cuarto estadio frente a emamectina, metaflumizona y azadiractina.

Sin embargo, frente a lambda cihalotrín las larvas de cuarto estadio de tuta son cuatro veces más resistentes que las de segundo estadio. Y para el producto metil clorpirifos, las larvas de segundo estadio son cinco veces menos susceptibles que las de cuarto estadio. Para ambos productos hay diferencias significativas entre los resultados de ambos estadios larvarios.

4.5.- Bibliografía

Abd El-Ghany, N.M., Abdel-Razek, A.S., Ebadah, I.M. y Mahmoud, Y.A. 2016. "Evaluation of some microbial agents, natural and chemical compounds for controlling tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). J Plan Protection Research. 56, nº4.

Aheer, G.M., Aziz, M.A., Hammed, A. y Ali, A. 2009. "Evaluation of resistance to different insecticides in field strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Punjab, Pakistan". Entomol Research. 39: 159-167.

Ahmad, M., Sayyed, A.H., Saleem, M. y Ahmad, M. 2008. "Evidence for field devolved resistance to newer insecticides in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan". Crop Protection. 27: 1367-1372.

Apablaza, J. 1992. "La polilla del tomate y su manejo". Tattersal 79: 12-13.

Bielza, P. 2010. "La resistencia a insecticidas en *Tuta absoluta* (Meyrick)". Phytoma 217: 103-106.

Bielza, P., Quinto, V., Contreras, J., Torné, M., Martín, A. y Espinosa, P.J. 2007. "Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of southeastern Spain". Pest Manag Sci 63: 682-687.

Cifuentes, D., Chynoweth, R. y Bielza, P. 2011. "Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994)

(Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers". Pest Mang Sci. 67: 1155-1162.

Clark, J. M., Scott, J. G., Campos, F. y Bloomquist, J. R., 1995. "Resistance to avermectins: extent, mechanisms, and management implications". Annl Rev Entomol. 40: 1- 30

Dağlı, F., Ikten, C., Sert, E. y Bölücek, E. 2012. "Susceptibility of tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) populations from Turkey to 7 different insecticides in laboratory bioassay". Bulletin OEPP/EPPO. 42: 305-311.

Desneux, N., Wajnberg, E., A.G., Wyckhuys ,K., Burgio, G., Arpia, S., Narváez-Vasques, C.A., González-Cabrera, J., Catalán, D., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T. y Urbaneja, A. 2010. "Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control". J Pest Sci. 83: 197-215.

García-Marí, F. y Vercher, R. 2010. "Descripción, origen y expansión de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". Phytoma. 127: 16-20

Guedes, R.N. y Siqueira, H.A. 2012. "The tomato borer *Tuta absoluta*: insecticide resistance and control failure". CAB Rev. 7, nº055.

Hashemitassuji, A. Safaralizadeh, M.H., Aramideh, S. y Hashemitassuji, Z. 2014. "Effects of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki and spinosad on three larval stages 1st, 2nd and 3rd of tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in laboratory conditions". Archives of Phytopathology and Plant Protection. 48: 377-384.

Jansson, R.K., Cartwright, B.B., Cox, D., dunbar, D.M., Dybas, R.A., Eckel, C. *et al.* 1996. "Emamectin benzoate: a novel avermectin derivate for control of lepidopterous pests. In The Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests". Chemical Control. Proceedings of the Thrid International Workshop (Sivapragasam, A., Loke, W., Hussan, A. and Lim G., eds). 171-177.

Karaağaç, S. U. 2015. "Enzyme activities and analysis of susceptibility levels in Turkish *Tuta absoluta* populations to chlorantraniliprole and metaflumizone insecticides". Phytoparasitica. 43: 693-700.

Llopis, V. N., Alfaro, C., González, S. V., & Millo, J. P. 2010. "Aplicación de la confusión sexual al control de la polilla del tomate *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)". Phytoma. 217: 32-34.

- Lorini, I. y Galley, D.J. 2001. "The cross-resistance spectrum in deltamethrin resistance strain of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae)". *Neotrop Entomol.* 30: 321-325.
- Roditakis, E., Skarmoutsou, C. y Staurakaki, M. 2013. "Toxicity of insecticides to populations of tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece". *Pest Manag Sci.* 69: 834-840.
- Rugg, D., Buckingham, S.D., Sattelle, D.B. and Jansson, R.K. 2005. "5.2-The insecticidal macrocyclic lactones". In *Comprehensive Molecular Insect Science* (Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S., eds). 25-52.
- Saad, A-F., Tayeb, E-S., Omar, A.E., Farag, E-S. y Shams, A.F. 2016. "Pesticide formulations as key factor affecting chlorpyrifos-ethyl and lambda-cyhalothrin performance against *Spodoptera littoralis* (Boisd.)". *Alexandria Science Exchange Journal.* 37, n°1.
- Salazar, E.R. y Araya, J.E. 2001. "Tomato moth, *Tuta absoluta* (Meyrick) response to insecticides in Arica, Chile". *Agricultura Técnica.* 61: 429-435.
- Shad, S.A., Sayyed, A.H. y Saleem, M.A. 2010. "Cross-resistance, mode of inheritance and stability of resistance to emamectin in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci.* 66: 839-846.
- Sayed, El. y Sheikh, El. 2015. "Comparative toxicity and sublethal effects of emamectin benzoate, lufenuron and spinosad on *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae)". *Crop Protection.* 67: 228-234
- Silva, G.A., Picanço, M.C., Bacci, L., Crespo, A.L.B., Rosado, J.F. y Guedes, R.N.C. 2011. "Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*". *Pest Manag Sci.* 67: 913-920.
- Singh, G., Rup, P.J. y Koul, O. 2007. "Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae". *Bulletin of Entomological Research.* 97: 351-357.
- Siqueira, H.A., Guedes, R.N., Fragoso, D.B. y Magalhaes, L.C. 2001. "Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". *J Pest Manag.* 47: 247-251.

- Su, J. y Sun, X-X. 2014. "High level of metaflumizone resistance and multiple insecticide resistance in field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangdong Province, China". Crop Protection. 61: 58-63.
- Suinaga, F.A., Casali, V.W., Picanço, M. y Foster, J. 2004. "Genetic divergence among tomato leafminer populations base don AFL analysis". Pesq Agropec Bras. 39: 645-651.
- Tian, X., Sun, X. y Su, J. 2014. "Biochemical mechanisms for metaflumizone resistance in beet armyworm, *Spodoptera exigua*". Pest Biochem Physiol. 113: 8-14.
- Tomé, H.V.V., Martins, J.C., Corrêa, A.S., Galdino, T.V.S., Picanço, M.C. y Guedes, R. N.C. 2013. "Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*". Crop Protection. 46: 63-69.
- Wang, X-L., Su, W., Zhang, J-H., Yang, Y-H., Dong, K. y Wu, Y-D. 2016. "Two novel sodium channel mutations associated with resistance to indoxacarb and metaflumizone in the diamondback moth, *Plutella xylostella*". Insect Science. 23: 50-58.
- Zhao, J.Z., Collins, H.L., Li, Y.X., Mau, R.F.L., Thompson, G.D., Hertlein, M., Andalaro, J.T., Boykin, R. y Shelton, A.M. 2006. "Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate". J Econ Entomol. 99: 176-181.

5.- SELECCIÓN DE UNA POBLACIÓN DE *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) RESISTENTE A EMAMECTINA BENZOATO Y MECANISMOS DE RESISTENCIA IMPLICADOS

5.1.- Introducción

El control de tuta se basa en gran medida en el control químico mediante insecticidas tales como organofosforados, piretroides, indoxacarb, emamectina benzoato y diamidas. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que esta plaga tiene gran potencial para desarrollar resistencia a muchas clases de insecticidas, comprometiendo la eficacia de su control químico (Siqueira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2011, 2015, 2016; Haddi *et al.*, 2012; Roditakis *et al.*, 2013a, 2015; Campos *et al.*, 2014).

Para evitar el elevado riesgo de desarrollo de resistencias es imprescindible implantar una estrategia de manejo de resistencias a insecticidas (Bielza, 2010). Para ello es imprescindible conocer los mecanismos de resistencia que afectan a cada insecticida (Bielza, 2010).

Una buena estrategia antirresistencias debe alternar insecticidas con diferente modo de acción en los tratamientos y, en generaciones sucesivas de la plaga, no se tienen que utilizar productos con ese mismo modo de acción (Bielza, 2010). En función del producto, será mejor no realizar aplicaciones en la misma generación (spinosad), otros será mejor aplicarlos en las primeras fases del cultivo (abamectina) y otros serán eficaces hasta larvas en tercer estadio (emamectina) como se explica para el caso de tuta en el apartado “1.6.- Materias activas autorizadas contra tuta”.

Para que la estrategia de manejo de resistencias cumpla su objetivo, evitar el desarrollo de resistencia a insecticidas, se debe de utilizar junto con otros métodos de control (medidas culturales, feromonas, control biológico...), es decir, la estrategia antirresistencias debe estar dentro de un protocolo de control integrado de plagas (Bielza, 2010).

El objetivo de este capítulo es seleccionar una población de tuta resistente a emamectina benzoato y determinar los mecanismos de resistencia involucrados. Una vez conocidos los mecanismos que afectan a cada insecticida, se pueden diseñar los tratamientos en tuta, qué insecticidas se deben alternar, cuántas aplicaciones se pueden realizar por cultivo,... es decir, se puede diseñar una estrategia de manejo de la resistencia adecuada para tuta.

5.2.- Material y métodos

Para seleccionar una población resistente a un insecticida se someten los individuos a una concentración del insecticida, y los supervivientes serán los “resistentes” a esa concentración. Si el porcentaje de supervivencia es bajo, se está realizando una elevada presión de selección eliminando así los individuos sensibles. Los supervivientes se crían siendo así la siguiente generación, en principio, más resistente que la anterior. Realizando este proceso repetidas veces se consigue obtener una población más resistente al insecticida que al inicio.

Además de realizar presión de selección, se puede provocar el desarrollo de resistencia en una plaga sometiéndola a concentraciones subletales. Esto es así porque dichas concentraciones no matan al insecto pero sí lo estresan, de manera que pueda generar una mayor tasa de mutaciones (Gressel, 2011). Entre esas mutaciones pueden encontrarse mutaciones relacionadas con la resistencia a insecticidas.

Si se combinan ambos procedimientos, someter los individuos a un continuo estrés exponiéndolos a una concentración subletal más la presión de selección, es posible que se obtenga antes una población resistente al compuesto.

Este estudio comienza en marzo de 2012 y se parte de la población sensible de referencia del laboratorio, denominada Águilas (Tabla 3.1. de material y métodos generales).

5.2.1.- Selección precedente

En marzo de 2012 se comenzó la selección de la población resistente pero sin control de la mortalidad producida, lo que llamamos “selección precedente”: una vez establecida la población de Águilas en su jaula de cría, se introducía planta sin tratar a demanda de la necesidad de alimento, se llevaba a la campana de extracción y se hacía el tratamiento con emamectina de todo lo que había en el interior de la jaula (plantas, larvas y adultos) mediante pulverización hasta punto de goteo. Este procedimiento se realizaba tantas veces como necesitara planta la población. Esto duró seis ciclos de selección (de S0 a S6) (Tabla 5.1).

5.2.2.- Cría de la población

A partir de diciembre de 2013, es decir, del ciclo de selección S7, la población a seleccionar se ha alimentado con planta de tomate tratada a una concentración subletal de emamectina. Esta concentración corresponde a la CL_{10} (concentración a la cual se muere el 10% de la población). Dicha concentración se ha ido aumentando a lo largo

del estudio conforme la población ha ido desarrollando resistencia. Cuando la población necesitaba planta, se impermeabilizaba la campana, se preparaba la solución insecticida y se llevaba a cabo el tratamiento sólo de las plantas mediante pulverización hasta punto de goteo con un pulverizador (capacidad 1 litro), con una concentración subletal de emamectina. Una vez terminado el tratamiento, las plantas se dejaban en la campana hasta su secado y después se introducían en la jaula y se regaban. Así tantas veces como fuera necesario a la semana.

5.2.3.- Bioensayo de selección

La selección mediante bioensayos se comenzaron a realizar a partir de diciembre de 2013, es decir a partir de la S7 (Tabla 5.2). Este tipo de bioensayos están descritos en el en el apartado “3.6.3.- Bioensayo de selección”, con el insecticida emamectina benzoato. Las selecciones finalizaron en julio de 2016.

5.2.4.- Bioensayo de susceptibilidad

Para conocer si la población va desarrollando resistencia frente a emamectina y para ir ajustando la concentración subletal (CL_{10}), a la cual se trata la planta con la que se alimenta la población, se realizan bioensayos de susceptibilidad en la S6, S8, S12, S17 y S20. Estos se encuentran descritos en el apartado “3.6.2.- Bioensayo de susceptibilidad” con larvas en segundo estadio, previa sincronización de la oviposición (apartado 3.6.1.).

5.2.5.- Bioensayo de sinergistas

Los bioensayos de sinergistas están descritos en el apartado “3.6.4.- Bioensayo de sinergistas”. La concentración de PBO es 1000 ppm y del DEF y DEM de 300 ppm. Para determinar estas concentraciones se han realizado bioensayos previos con los diferentes sinergistas, hasta que se ha encontrado la máxima concentración que no tenía un efecto letal significativo en las larvas de tuta.

5.2.6.- Análisis estadístico

El análisis de los datos se lleva a cabo con el programa estadístico Polo Plus, como se comentó en el apartado “3.7.- Análisis de datos”.

5.3.- Resultados y discusión

En este apartado se muestran los resultados de la selección de una población susceptible de campo (Águilas), la cual se ha tomado como la población susceptible de referencia a emamectina, la evolución de su susceptibilidad a lo largo de la selección y los mecanismos de resistencia desarrollados por tuta frente a emamectina.

5.3.1.- Selección de una población resistente

En la Tabla 5.1 se muestra el proceso de selección en una primera fase (selección precedente) y la concentración a la cual se trató la población en cada selección. Se observa un aumento de la concentración de emamectina desde la S0 hasta la S6, de 0,02 ppm a 0,5 ppm, es decir, se aumentó la concentración 25 veces en seis ciclos de selección. De esta “selección precedente” no hay datos de mortalidad ya que sólo se realizaban tratamientos sobre la población dentro de la jaula. Sin embargo, las observaciones indicaban que la mortalidad no era excesiva, ya que la población se reproducía bien.

Tabla 5.1. Selección y concentración de emamectina en la selección de la selección precedente.

Selección	Concentración (ppm)
S0	0,02
S1	0,1
S2	0,15-0,2
S3	0,05-0,1
S4	0,05-0,1
S5	0,1-0,3
S6	0,5

Los datos de la segunda fase de selección se muestran en la Tabla 5.2, donde hay datos de la mortalidad de la selección a emamectina desde la S7 hasta la S19. En ella se puede observar la concentración de selección, el número de larvas que se tratan, las que sobreviven y las que mueren, el porcentaje de mortalidad y la concentración a la cual se tratan las plantas en cada selección.

La concentración de emamectina en la S7 es de 0,3 ppm. La concentración de selección en la S19 (3 ppm) es 10 veces superior a la inicial en la S7 (Tabla 5.2) y 150 veces la concentración inicial (0,02 ppm) (Tabla 5.1).

Se procuró que el número de larvas tratadas fuera cercano a 1000 individuos y/o obtener 200 larvas supervivientes, para asegurar una variabilidad genética aceptable y que el número de individuos vivos fuera suficiente para poder crear la siguiente selección. Este hecho fue logrado en todas las selecciones excepto en la S7, S8 y S9, al comienzo de este tipo de selección (Tabla 5.2).

La mortalidad de tuta en los bioensayos evolucionó con algunos altibajos (Tabla 5.2). De la S7 a la S10, donde se selecciona a la misma concentración, se observa una

evolución de la selección con mortalidad decrecientes a la misma dosis, del 90,2 (S7) al 62,2% (S10). De la S11 a la S17, en las que se selecciona a 0,4 ppm, se observa una progresión menos clara, pero se acaba confirmado una mortalidad baja (60-70%) para una dosis de 0,4 ppm. En la S18 se seleccionaron unos individuos a 1 ppm con una mortalidad de 28% y otros a 3 ppm con un porcentaje de mortalidad de 63,2. La selección se terminó en la S19 con un valor de 92,7% de mortalidad a 3 ppm (Tabla 5.2). Este aumento a 3 ppm en la concentración de selección se realizó para hacer más presión de selección y así, aunque sacrificando un elevado número de individuos, se generara un elevado nivel de resistencia. Era sabido que el porcentaje de mortalidad iba a ser elevado porque el bioensayo de susceptibilidad en la S17 muestra que la CL_{90} era 2,2 ppm (Tabla 5.3), por tanto a 3 ppm en selecciones posteriores la mortalidad partiría del 90%.

En la S7 y S8 la concentración subletal de las planta de cría es 0,005 ppm, valor que corresponde a la CL_{10} del bioensayo de susceptibilidad realizado en la S6, similar al de la población Águilas (Tabla 5.3). En la S8 se realizó otro bioensayo de susceptibilidad y la CL_{10} obtenida es 0,04 ppm, por ello la concentración de la planta de cría de la S9 a la S12 se aumenta a 0,01 ppm, concentración algo conservadora. A partir de la S13 hasta la S19 se vuelve a aumentar esa concentración a 0,03 ppm, ya que es la CL_{10} de la S12 (Tabla 5.3). Esta concentración se aumentó a 0,1 ppm una vez establecida la S20. Resultados de la S17 muestran que esa concentración se podría haber aumentado ya en la S18 y, en la S20 haber subido estos tratamientos a 0,3 ppm puesto que la CL_{10} de la S20 es de 0,28 ppm (Tabla 5.3). Aún así se mantuvo a 0,03 ppm hasta finalizar el proceso de selección para evitar disminuciones considerables en el nivel poblacional, ya que el aumento de la concentración de la selección a partir de la S18 dejaría pocos individuos supervivientes. Esta concentración de 0,03 ppm es 6 veces mayor a la inicial (0,005 ppm). Y la de 0,1 ppm, con la que se trata la planta de la S20 es 20 veces mayor, lo cual es un aumento considerable de la concentración de la planta a la cual se alimenta la población seleccionada.

En los datos de la CL_{50} de la Tabla 5.3, se puede ver el desarrollo de resistencia en tuta a emamectina benzoato en el proceso de selección. La S6 es casi 3 veces más resistente que la S0 (Águilas). En la S8, la población ya es 15,4 veces más resistente que al inicio del estudio. Sin embargo, esta resistencia parece disminuir a 13,8 en la S12, según los resultados obtenidos en el bioensayo de susceptibilidad. Aún así, no se encuentran diferencias significativas entre el resultado de la S8 y S12 (se solapan sus límites fiduciales), por tanto la resistencia de la S8 a la S12 se mantiene. Esto puede ser debido a los pocos individuos seleccionados y por tanto, escasos supervivientes obtenidos en

las selecciones S7-S9 (Tabla 5.2). Por ello, si la variabilidad genética es ya de por sí escasa en las poblaciones mediterráneas de tuta como ya se ha comentado (Suinaga *et al.*, 2004; Cifuentes *et al.*, 2011; Guedes y Siqueira, 2012), al tener pocas larvas para formar la población, la variabilidad genética es aún más limitada dificultando así el desarrollo de resistencias.

Tabla 5.2. Selección, concentración de emamectina benzoato a la que se selecciona, datos de los ensayos (larvas totales, vivas, muertas, porcentaje de mortalidad) y concentración de emamectina benzoato a la que se tratan las plantas de cría.

Selección	ppm	Larvas			Mortalidad (%)	Plantas de cría (ppm)
		totales	vivas	muertas		
S7	0,3	672	67	606	90,2	0,005
S8	0,3	298	59	239	80,2	0,005
S9	0,3	512	62	450	87,9	0,01
S10	0,3	911	344	567	62,2	0,01
S11	0,4	1066	143	923	86,6	0,01
S12	0,4	732	282	450	61,5	0,01
S13	0,4	927	299	628	67,7	0,03
S14	0,4	901	294	607	67,4	0,03
S15	0,4	1073	188	885	82,5	0,03
S16	0,4	1400	478	922	65,9	0,03
S17	0,4	923	302	621	67,3	0,03
S18	1-3	943	347	596	63,2	0,03
S19	3	4203	308	3895	92,7	0,03

En la S17 se observa ya un factor de resistencia importante (47,1), lo cual coincide con un elevado número de individuos seleccionados y larvas supervivientes desde la S12 a la S17. La población en la S20 es 86,1 veces más resistente que en la S0. La S20 es casi 134 veces más resistente a emamectina que cuando se comenzó a seleccionar, observando los resultados del factor de resistencia 90 (Tabla 5.3). Se puede decir que esta población de tuta ha desarrollado resistencia frente a emamectina. Además del efecto de la selección, la disminución de la susceptibilidad puede verse favorecida por la alimentación sobre plantas tratadas a dosis subletales. Esto es así porque cuando los insectos están expuestos a dosis bajas de insecticida, pueden desarrollar resistencia adaptándose fisiológicamente. Ese efecto se ha estudiado para *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* biotipo B, donde se han expuesto a la CL₂₅ de diferentes insecticidas durante 7 generaciones (Liang *et al.*, 2012). Los datos más destacados para *B. tabaci*

muestran un factor de resistencia para nitenpiram, imidacloprid y acetamiprid de 6, 3 y 5, respectivamente. En *T. vaporariorum* cabe destacar el efecto del nitenpiram e imidacloprid con factores de resistencia de 3,7 y 2,5, respectivamente (Liang *et al.*, 2012).

Tabla 5.3. Selección, concentración letal 10, 50 y 90 con sus respectivos límites fiduciales (95% confianza) y sus factores de resistencia, de los bioensayos de susceptibilidad a emamectina.

Selección	CL ₁₀	Lim (inf-sup)	FR ₁₀	CL ₅₀	Lim (inf-sup)	FR ₅₀	CL ₉₀	Lim (inf-sup)	FR ₉₀
Águilas	0,0051	0,0025-0,0073	1	0,0129	0,0097-0,0163	1	0,0328	0,0245-0,0569	1
S6	0,0050	0,0010-0,0130	1	0,0370	0,0150-0,0650	2,9	0,2850	0,1570-0,8130	8,7
S8	0,0420	0,0030-0,1050	8,2	0,1990	0,0670-0,3990	15,4	0,9370	0,4590-5,4880	28,6
S12	0,0310	0,0010-0,0870	6,1	0,1780	0,0510-0,4740	13,8	1,0090	0,3990-23,0810	30,7
S17	0,1670	0,0230-0,2940	32,7	0,6080	0,3870-0,9830	47,1	2,2070	1,2380-17,3970	67,2
S20	0,2810	0,0720-0,4970	55,1	1,1110	0,6990-1,6360	86,1	4,3920	2,6700-13,6990	133,9

Comparando los valores en la S20 de la CL₅₀ (1,1 ppm) y CL₉₀ (4,4 ppm), con la dosis de campo de emamectina en tuta (15 ppm), no se puede decir que la eficacia del control de la polilla del tomate con este insecticida estuviera comprometida, ya que ambos resultados de los bioensayos de susceptibilidad muestran valores por debajo de dicha dosis de campo. Aun así, es probable que el nivel de resistencia siguiera aumentando si se mantuviera la presión de selección, hasta sobrepasar las dosis recomendadas en campo. Esta selección para la resistencia en el laboratorio es indicativa de un potencial desarrollo de resistencia a emamectina en campo, por lo que sería importante seguir las recomendaciones de la etiqueta del producto y diseñar una adecuada estrategia antirresistencias.

No tenemos constancia de que exista en la bibliografía referencias de resistencias a emamectina en campo o laboratorio. Para un compuesto del mismo modo de acción, la abamectina, tuta muestra niveles bajos de resistencia en Brasil con factores de resistencia 5,2 a 9,4 (Siqueira *et al.*, 2001) y de 1,1 a 8,9 (Silva *et al.*, 2011), valores que se encuentran por debajo de la S8 (15,4) de tuta a emamectina en este trabajo (Tabla 5.3).

Para el insecticida spinosad se han encontrado en Brasil valores bajos de resistencia de tuta (1,2-4,8) (Silva *et al.*, 2011). A partir de una población brasileña que ya mostraba cierto nivel de resistencia a spinosad, se seleccionó en laboratorio durante 22 generaciones (Campos *et al.*, 2014). En sólo 7 generaciones se obtuvo una población 5.000 veces más resistente; y 18.000 veces más resistente que la susceptible de

referencia. Esta rápida respuesta a la selección es achacable a que la población de partida ya era una población resistente de campo y a que la resistencia es una mutación en el punto de acción. Por tanto, los individuos que ya portaban la mutación ya estaban presentes en la población de partida, y la selección en el laboratorio simplemente eliminó los susceptibles y fijó la mutación de la población. En nuestro caso con emamectina se partió de una población susceptible, por lo que el proceso de selección es mucho más complejo. Igualmente, Berger *et al.*, (2016) obtuvieron un factor de resistencia a spinosad de 277 tras seleccionar una población de Portugal durante once generaciones. Al igual que Campos *et al.*, (2014), se partió de una población que ya era moderadamente resistente, que unido a que la resistencia es en el punto de acción, hace que la selección en el laboratorio sea más rápida.

En tuta se ha observado en campo en Sicilia (Italia) un factor de resistencia de 2414 para clorantaniliprol y de 1742 para flubendiamida (Roditakis *et al.*, 2015). Sin embargo, dos años más tarde, Roditakis *et al.* (2017b) seleccionaron una población italiana durante 4 generaciones a clorantraniliprol (CL₅₀ 56 ppm) y ésta llegó a ser sólo 4 veces más resistente (CL₅₀ 230 ppm) que su progenitor. Esta aparentemente baja respuesta a la selección se puede deber a que la resistencia ya había llegado casi a su techo potencial, al estar ya prácticamente fijada la mutación responsable. El mismo fenómeno ocurrió en el trabajo ya citado de selección para la resistencia a spinosad (Campos *et al.*, 2014), en el que se obtuvo una respuesta fuerte y rápida en la generación 7, con ya poca respuesta adicional hasta la generación 22.

5.3.2.- Mecanismos de resistencia

En la Tabla 5.4 se muestran los resultados obtenidos en los bioensayos con los sinergistas con la población seleccionada a emamectina (E.b. S20) y de Águilas. El resultado presentado tanto para PBO, DEF como DEM, es el Probit combinado de los resultados obtenidos en dos bioensayos, ya que los tres ensayos fueron realizados dos veces.

El resultado de E.b. S20 con PBO y emamectina (0,044 ppm) es 25,2 veces inferior al de la población resistente, E.b. S20, de tuta a emamectina (1,111 ppm). El sinergista ha eliminado la resistencia completamente ya que la población resistente muestra un valor similar al de la población de partida en el proceso de selección (Águilas). De hecho no hay diferencias significativas entre ambos bioensayos, se solapan los límites fiduciales del resultado del bioensayo de la población sensible y de la resistente con PBO frente a emamectina (Tabla 5.4).

Los datos del Probit combinado también muestran una disminución de la resistencia cuando se aplica el sinergista DEF, la CL_{50} pasa de 1,1110 a 0,2967 ppm (3,7 veces menos resistente). No se solapan los límites fiduciales ni con la población resistente ni con la de partida. Sin embargo, para el sinergista DEM no se observan diferencias significativas con la población resistente, no ha reducido la resistencia en la población E.b. S20.

La disminución de la resistencia en los bioensayos con los sinergistas (Tabla 5.4), muestra que la resistencia de tuta a emamectina es metabólica. La reducción completa de la resistencia por parte del butóxido de piperonilo (PBO), sugiere que hay una actividad elevada de las P450 monooxigenasas en este insecto confiriéndole resistencia a emamectina. Esta reducción total de la resistencia al aplicar el PBO puede deberse a que dicho sinergista también inhibe las esterasas (Young *et al.*, 2005). Por tanto, esa acción combinada sobre ambos sistemas enzimáticos es la que elimina por completo la resistencia. Este hecho se ratifica con el resultado del bioensayo con DEF, inhibidor de esterasas, donde se observa que se reduce parcialmente la resistencia. El efecto del butóxido de piperonilo ha sido observado en otras especies de artrópodos. La participación de las P450 monooxigenasas en la resistencia a un compuesto de la misma familia, abamectina, se ha observado en *Leptinotarsa decemlineata*, *Musca domestica*, *Tetranychus urticae*, *Spodoptera littoralis* y *Helicoverpa armigera* (Scott, 1989; Christie y Wright, 1990; Argentine *et al.*, 1992; Campos *et al.*, 1996).

Como se ha dicho, el sinergista DEF suprime la resistencia parcialmente de la población E.b. S20, lo cual sugiere que las esterasas están menos implicadas en el mecanismo de resistencia de tuta a emamectina que las P450 monooxigenasas, teniendo las esterasas un papel secundario en dicho mecanismo de resistencia.

Las glutatión S-transferasas no están involucradas en la resistencia a emamectina de tuta, no hay diferencias significativas entre el resultado del ensayo con el sinergista DEM y el resultado de la población resistente.

Diversos estudios realizados en tuta combinados con sinergistas concluyen que los tres sistemas enzimáticos están involucrados en la resistencia a cartap (Siqueira *et al.*, 2000) y abamectina (Siqueira *et al.*, 2001), donde la importancia relativa de cada enzima depende del insecticida y población estudiada.

Tabla 5.4. Resultados de los bioensayos de E.b. S20 a emamectina y con sinergistas y de Águilas a emamectina, concentración letal 50 con sus límites y pendiente con su error.

Población	Producto	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	Pendiente	Error
E.b. S20	Emamectina	1,1110	0,6999	1,6360	2,1470	0,4980
	+ PBO*	0,0440	0,0093	0,1198	0,5680	0,0960
	+DEF**	0,2967	0,1462	0,4848	1,5330	0,2300
	+DEM**	0,4070	0,2120	0,7630	0,9310	0,1590
Águilas	Emamectina	0,0129	0,0097	0,0163	3,1570	0,6040

*1000 ppm

**300 ppm

Ensayos realizados en seis poblaciones de tuta de Brasil resistentes a abamectina muestran que el PBO reduce la resistencia completamente de una de las poblaciones (Siqueira *et al.*, 2001), como sucede en este estudio en la población de tuta resistente a emamectina. En las otras cinco poblaciones brasileñas resistentes a abamectina, la reducción de la resistencia es casi completa al realizar el bioensayo combinado con el sinergista PBO (Siqueira *et al.*, 2001). Esas mismas seis poblaciones brasileñas se bioensayaron con el sinergista DEF (inhibe las esterasas) y los resultados muestran la eliminación por completo de la resistencia de cuatro de las seis poblaciones estudiadas, siendo casi completa la reducción de la resistencia de las otras dos (Siqueira *et al.*, 2001). Sin embargo, en la población resistente de este estudio (E.b. S20), la reducción de la resistencia al utilizar el DEF no fue tan acusada como la observada en las poblaciones brasileñas (Tabla 5.4). Los resultados de los ensayos con dietil maleato (inhibe las enzimas glutatión S-transferasas) y abamectina en las poblaciones de Brasil, muestran una disminución significativa de cuatro de las poblaciones, no teniendo ningún efecto en las otras dos (Siqueira *et al.*, 2001). Los resultados de esas dos poblaciones brasileñas, en las cuales no se observa reducción de la resistencia al bioensayar conjuntamente el sinergista DEM y abamectina, coinciden con lo observado en este trabajo cuando se bioensaya la población resistente a emamectina (E.b. S20) con ese mismo sinergista y emamectina (Tabla 5.4).

En la resistencia de tuta a diamidas no es tan claro el efecto de los tres sinergistas (PBO, DEF y DEM). Reditakis *et al.* (2017b) estudiaron el mecanismo de resistencia involucrado en su población de Italia resistente a flubendiamida (FR 2658) y

cloranthraniliprol (FR 1356). Al bioensayar la población resistente con cloranthraniliprol combinado con los sinergistas PBO y DEM, el factor de sinergismo tan sólo es de 1,5 y 1,4, respectivamente (CL_{50PBO} : 161 ppm; CL_{50DEM} : 169 ppm), en comparación a la CL_{50} de la población resistente sin sinergista (244 ppm) (Roditakis *et al.*, 2017b). Lo cual implica un impacto bastante limitado de estos mecanismos de detoxificación. El factor de sinergismo de la población italiana con el DEF es de 10,6, indicando la posible presencia de un mecanismo de resistencia a través de las esterasas para este insecticida en particular. Con flubendiamida esto no sucede ya que su factor de sinergismo va de 1,2 a 1,7 para los tres sinergistas. Por tanto, Roditakis *et al.* (2017b) concluyen que existe claramente la presencia de un mecanismo de resistencia adicional. Es posible que la resistencia de tuta a las diamidas se deba a una combinación de la resistencia metabólica y en el punto de acción, siendo esta última la que tenga un papel más importante en el desarrollo de la resistencia en tuta a estos compuestos.

En la resistencia de tuta a indoxacarb de una población griega, al bioensayarla con los sinergistas PBO y DEF, se observa un ligero aumento la toxicidad de indoxacarb (hasta 4 veces) (Roditakis *et al.*, 2017a). Sin embargo, el resultado del ensayo con el sinergista DEM, no mostró reducción de la resistencia de la población de Grecia a indoxacarb (Roditakis *et al.*, 2017a). Esto puede ser debido a que la resistencia de tuta a indoxacarb se debe a una mutación en el punto de acción. Los resultados de la población resistente a indoxacarb de tuta con el sinergista DEM, son similares a los observados en este estudio con la población resistente a emamectina de tuta, donde el sinergista DEM no redujo la resistencia de la población E.b. S20 a emamectina (Tabla 5.4).

Reyes *et al.* (2012) aportan que la pérdida de susceptibilidad de tuta a spinosad está directamente relacionada con el sistema enzimático P450 monooxigenasas, glutatión S-transferasas y esterasas. Ensayos realizados en poblaciones de tuta resistentes a spinosad de Chile, muestran que el mecanismo más presente en tales poblaciones de tuta está relacionado con la actividad de las monooxigenasas (Reyes *et al.*, 2012). Este mecanismo ya ha sido relacionado con la resistencia a spinosad en otros lepidópteros (Wang *et al.*, 2006, 2009). Sin embargo, los ensayos con las poblaciones chilenas resistentes a spinosad con DEF y DEM muestran que la actividad de las glutatión S-transferasas y esterasas tienen un papel secundario en la resistencia de tuta a spinosad (Reyes *et al.*, 2012). Estos datos observados en las poblaciones chilenas, son similares a los observados en la resistencia de tuta a emamectina en este trabajo, donde el principal sistema enzimático implicado en el desarrollo de resistencia es el P450 monooxigenasas, teniendo un papel secundario las esterasas.

Sin embargo, en otros estudios realizados no se encuentran diferencias significativas entre el bioensayo de la población resistente de tuta a spinosad con y sin sinergista. Esto sucede en una población de tuta de Portugal resistente a spinosad al bioensayarla con el sinergista PBO (Berger *et al.*, 2016), y en una población de Brasil de tuta resistente al mismo insecticida al bioensayarla con los sinergistas PBO y DEF (Campos *et al.*, 2014). Estos resultados muestran que tales sistemas enzimáticos tienen un papel mínimo en la resistencia a spinosad, alejándose de la teoría de Reyes *et al.* (2012).

La investigación de las principales enzimas en poblaciones de tuta de Brasil, sugieren que las P450s y GSTs podrían tener un papel en la resistencia a ciertos piretrodies (Silva *et al.*, 2015).

5.4.- Conclusiones

Se ha obtenido una población de tuta (E.b. S20) 86 veces más resistente a emamectina que la población sensible de referencia con la que se inició el estudio (Águilas), tras 19 ciclos de selección.

El mecanismo de resistencia metabólica que le confiere la resistencia a esta población de tuta, viene dado por la actividad enzimática de las P450 monooxigenasas, ya que el PBO suprimió totalmente la resistencia. Este efecto puede ser debido a que el PBO también inhibe en cierto grado las esterasas, ya que DEF redujo parcialmente la resistencia de E.b. S20.

5.5.- Bibliografía

- Argentine, J. A., Clark, J. M. y Lin, H., 1992. "Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of Colorado potato beetle". *Pest Biochem Physiol.* 44: 191- 207
- Berger, M., Puinean, A.M., Randall, E., Zimmer, C.T., Silva, W.M., Bielza, P., Field, L.M., Hughes, D., Mellor, I., Hassani-Pak, K., Siqueira, H.A., Williamson, M.S. y Bass, C. 2016. "Insecticide resistance mediated by an exon skipping event". *Mol Ecol.* 25: 5692-5704.
- Bielza, P. 2010. "La resistencia a insecticidas en Tuta absoluta (Meyrick)". *Phytoma* 217: 103-106.
- Bielza, P., Garcia-Vidal, L. y Martinez-Aguirre M.R. 2016. "Case study 4: *Tuta absoluta* - insecticide resistance management of this invasive species". In: XXV International Congress of Entomology, 25 -30 September, Orlando, FL, US p. 3783.

- Campos, M.R., Rodrigues, A.R., Silva, W.M., Silva, T.B., Silva, V.R., Guedes, R.N. y Siqueira, H.A. 2014. "Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: A bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance". Plos One. 9: e103235.
- Campos, F., Krupa, D. A. y Dybas, R. A., 1996. "Susceptibility of populations of two-spotted spider mites (Acari: Tetranychidae) from Florida, Holland, and the Canary Islands to abamectin and characterization of abamectin resistance". J Econ Entomol. 89: 594- 601
- Christie, P. T. y Wright, D. J. 1990. "Activity of abamectin against larval stages of *Spodoptera littoralis* Boisduval and *Heliothis armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) and possible mechanisms of differential toxicity". Pest Sci. 29: 29- 38.
- Cifuentes, D., Chynoweth, R. y Bielza, P. 2011. "Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers". Pest Mang Sci. 67: 1155-1162.
- Gressel, J. 2011. "Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies". Pest Manag Sci. 67: 253-257.
- Guedes, R.N. y Siqueira, H.A. 2012. "The tomato borer *Tuta absoluta*: insecticide resistance and control failure". CAB Rev. 7, n°055. Doi: 10.1079/PAVSNR20127055.
- Haddi, K., Berger, M., Bielza, P., Cifuentes, D., Field, L.M., Gorman, K., Rapisarda, C., Williamson, M.S. y Bass, C. 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.
- Liang, P., Tian, y Biondi, A. 2012. "Short-term and transgenerational effects of the neonicotinoid nitenpyram on susceptibility to insecticides in two whitefly species". Ecotoxicology. 21: 1889-1898.
- Roditakis, E., Mavridis, K., Riga, M., Vasakis, E., Morou, E., Rison, J.L. y Vontas, J. 2017a. "Identification and detection of indoxacarb resistance mutations in the para sodium channel of the tomato leafminer, *Tuta absoluta*". Pest Manag Sci.
- Roditakis, E., Skarmoutsou, C. y Staurakaki, M. 2013a. "Toxicity of insecticides to populations of tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece". Pest Manag Sci. 69: 834-840.

- Roditakis, E., Skarmoutsou, C., Staurakaki, M., Martínez-Aguirre M.R., García-Vidal, L., Bielza, P., Haddi, K., Rapisarda, C., Rison, J.L., Bassi, A. y Teixeira, L.A. 2013b. "Determination of baseline susceptibility of European populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) to indoxacarb and chlorantraniliprole using a novel dip bioassay method". *Pest Manag Sci.* 69: 217-227.
- Roditakis, E., Steinback, D., Moritz, G., Vasakis, E., Stavrakaki, M., Ilias, A., García-Vidal, L., Martínez-Aguirre, M.R., Bielza, P., Morou, E., Silva, J.E., Silva, W.M., Siqueira, H.A., Iqbal, S., Troczka, B.J., Williamson, M.S., Bass, C., Tsagkarakou, A., Vontas, J. y Nauen, Ralf. 2017b. "Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Insect Biochem Mol Biol.* 80: 11-20
- Reyes, M., Rocha, K., Alarcón, L., Siegwart, M. y Sauphanor, B. 2012. "Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad". *Pest Biochem Physiol.* 102: 45-50.
- Roditakis, E., Vasakis, E., Grispou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M. y Bassi, A. 2015. "First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides". *J Pest Sci.* 88: 9-16.
- Roditakis, E., Vasakis, E., Stavrakaki, M., Ilias, A., Morou, E., Steinbach, D., Bielza, P., Bass, C., Bassi, A., Nauen, R., Vontas, J. y Tsagkarakou, A. 2016. "The global importance of the tomato borer *Tuta absoluta*, its control and the current state of insecticide resistance". In: XXV International Congress of Entomology, 25-30 September, Orlando, FL, US p. 3783.
- Scott, J. G., 1989. "Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethroid resistant strains of house flies". *Pest Biochem Physiol.* 34: 27-31.
- Silva, A.G., Picanço, M.C., Bacci, L., Crespo, A.L., Rosado, J.F. y Guedes, R.N. 2011. "Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*". *Pest Manag Sci.* 67: 913-920.
- Silva, T.B., Silva, W.M., Campos, M.R., Silva, J.E., Ribeiro, L.M. y Siqueira, H.A. 2016b. "Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil". *Crop Protect.* 79: 80-86.
- Silva, W.M., Berger, M., Bass, C., Balbino, V.Q., Amaral, M.H., Campos, M.R. y Siqueira, H.A. 2015. "Status of pyrethroid resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*". *Pest Biochem Physiol.* 122: 8-14.

- Silva, W.M., Berger, M., Bass, C., Williamson, M., Moura, D.M., Ribeiro, L.M. y Siqueira, H.A. 2016a. "Mutation (G275E) of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ subunit is associated with high levels of resistance to spinosyns in *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Pest Biochem Physiol.* 131: 1-8.
- Siqueira, H.A., Guedes, R.N. y Picanço, M.C. 2000. "Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Agric Forest Entomol.* 2: 147-153.
- Siqueira, H.A., Guedes, R.N., Fragoso, D.B. y Magalhaes, L.C. 2001. "Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Int J Pest Manag.* 47: 247-251.
- Suinaga, F.A., Casali, V.W., Picanço, M. y Foster, J. 2004. "Genetic divergence among tomato leafminer populations base don AFL analysis". *Pesq Agropec Bras.* 39: 645-651.
- Wang, D., Gong, P.Y., Li, M., Qui, X.H. y Wang, K.Y. 2009. "Sublethal effects of spinosad on survival, growth and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)". *Pest Manag Sci.* 65: 223-227.
- Wang, W., Mo, J., Cheng, J., Zhuang, P. y Tang, Z. 2006. "Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)". *Pest Biochem Physiol.* 84: 180-187.
- Young, S.J., Gunning, R.V. y Moores, G.D. 2005. "The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)". *Pest Manag Sci.* 61: 397-401.

6.- RESISTENCIAS CRUZADAS A EMAMECTINA BENZOATO EN *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

6.1.- Introducción

Como ya se ha comentado, el control de tuta se basa en gran medida en la utilización de insecticidas, pero se ha comprobado que esta plaga es capaz de desarrollar resistencia a muchas clases de insecticidas, lo que puede comprometer la eficacia del control químico (Siqueira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2011, 2015, 2016; Haddi *et al.*, 2012; Roditakis *et al.*, 2013, 2015; Campos *et al.*, 2014).

Es habitual que la resistencia desarrollada por una plaga a un compuesto, afecte negativamente a otros compuestos químicamente relacionados. Esto es así porque los productos que se encuentran en el mismo subgrupo químico, tienen el mismo modo de acción. Por ello, existe un elevado riesgo de que la resistencia desarrollada le confiera automáticamente resistencia cruzada a los productos que pertenecen al mismo subgrupo. Este es el concepto de resistencia cruzada y sucede dentro de una familia de insecticidas o acaricidas químicamente relacionados. Esto se suele dar cuando hay resistencia en el punto de acción. Sin embargo, si el mecanismo de resistencia es metabólico, como se ha podido comprobar en la resistencia de tuta a emamectina (Capítulo 5), también puede afectar a otros insecticidas aunque pertenezcan a distintos modos de acción o grupos químicos, ya que pueden ser degradados por un mismo sistema enzimático (IRAC, 2016).

El diseño de una adecuada estrategia antirresistencia precisa del conocimiento de las posibles resistencias cruzadas. Una vez conocidas las resistencias cruzadas de una plaga resistente a un compuesto, se puede diseñar la estrategia evitando llevar a cabo tratamientos con otro compuesto al cual la plaga también tiene resistencia aunque no se haya tratado antes con ese producto. Por ello, se van a estudiar las resistencias cruzadas a emamectina en tuta a varios compuestos insecticidas.

6.2.- Material y métodos

6.2.1.- Bioensayo

Para determinar las resistencias cruzadas se llevan a cabo los bioensayos descritos en el apartado “3.6.2.- Bioensayo de susceptibilidad” en larvas de segundo estadio, precedido de la puesta cuyo procedimiento está descrito en el apartado “3.6.1.- Sincronización de la oviposición”, de la población que corresponda, la sensible (Águilas) o la resistente (E.b. S20).

6.2.2.- Insecticidas

De los insecticidas utilizados, metaflumizona, azadiractina, lambda cihalotrín y metilclorpirifos se encuentran descritos en el apartado “3.4.- Insecticidas y sinergistas”.

Spinosad pertenece a Dow AgroSciences. El nombre comercial es Spintor 480 SC, cuya composición es spinosad 48% p/v y va formulado en suspensión concentrada (Figura 6.1).

Figura 6.1. Spintor 480 SC.

Figura 6.2. Steward.

Steward es el nombre comercial del insecticida indoxacarb, desarrollado por DuPont. Contiene un 30% de materia activa y está formulado en grano dispersable (Figura 6.2). DuPont también ha desarrollado Altacor, cuyo ingrediente activo es clorantraniliprol (rynaxypyr es el nombre de DuPont para este ingrediente activo), al 35% WG en grano dispersable (Figura 6.3); y Benevia con una concentración del 10% OD de ciantraniliprol (cyazypyr es el nombre de DuPont) en dispersión oleosa, aún no autorizado en España (Figura 6.4).

Figura 6.3. Altacor.

Figura 6.4. Benevia.

El nombre comercial de flubendiamida es Fenos. Pertenece a Bayer y contiene flubendiamida 240 g/kg WG, en gránulos dispersables (Figura 6.5).

Figura 6.5. Fenos.

6.2.3.- Análisis estadístico

El análisis de los datos se lleva a cabo con el programa estadístico Polo Plus, como se comentó en el apartado “3.7.- Análisis de datos”.

6.3.- Resultados y discusión

En la Tabla 6.1 se muestran los resultados de los bioensayos realizados para conocer si hay resistencias cruzadas. En ella se puede observar el insecticida estudiado en la población sensible (Águilas) y resistente (E.b. S20), la concentración letal 50 con sus límites fiduciales y la pendiente con su error.

Como ya se comentó en el capítulo anterior, la población seleccionada a emamectina (E.b. S20) es 86 veces más resistente a emamectina que la sensible de laboratorio (Águilas). Se ha bioensayado la población seleccionada y sensible a nueve insecticidas, para así poder comparar los resultados y comprobar si hay resistencias cruzadas a esos nueve insecticidas.

Los resultados de spinosad muestran que no hay resistencia cruzada a este compuesto, ya que los valores de CL_{50} no son significativamente diferentes (los límites fiduciales se solapan) entre la población resistente a emamectina (E.b. S20) y la población sensible (Águilas). Lo mismo sucede con indoxacarb, clorantraniliprol, ciantraniliprol y metaflumizona. Los resultados de los ensayos de la población sensible y resistente de

tuta a emamectina son similares, ambas poblaciones son igual de susceptibles al insecticida bioensayado (Tabla 6.1).

Lo mismo sucede en una población de Brasil de tuta resistente a spinosad donde dicha resistencia no afecta a la efectividad de los compuestos: abamectina, clorantraniliprol, cartap, clorfenapir, tiametoxan, indoxacarb, pemetrín y clorpirifos (Campos *et al.*, 2014). Los datos de clorantraniliprol (rynaxypyr) e indoxacarb de la población chilena coinciden con lo observado en la Tabla 6.1 para esos mismos compuestos, ya que no hay resistencia cruzada en la población de tuta resistente a emamectina. Sin embargo, los bioensayos de la población resistente a spinosad de tuta de Chile, sí muestran resistencia cruzada con spinerotam, otro espinosín (Campos *et al.*, 2014).

Por otro lado, en una población griega de tuta con resistencia a indoxacarb se ha observado resistencia cruzada a metaflumizona (FR 40) y a clorantraniliprol (FR 163) (Roditakis *et al.*, 2017a), lo cual no sucede con la población de tuta resistente a emamectina de este estudio (Tabla 6.1). Por otro lado, la resistencia de la población griega a indoxacarb no afecta a la efectividad del insecticida spinosad (Roditakis *et al.*, 2017a). En este caso en el que no hay resistencia cruzada de la población griega de tuta resistente a indoxacarb con spinosad, se encuentra una similitud con la población resistente a emamectina de tuta en la que tampoco hay resistencia cruzada a spinosad (Tabla 6.1).

En este estudio, en el insecticida lambda cihalotrín se observa que, aunque el valor de la CL_{50} de la población seleccionada a emamectina (E.b. S20) es casi el doble que el de la población sensible (Águilas), no hay diferencias significativas entre ambos resultados porque se solapan los límites fiduciales. Por tanto, tampoco hay resistencia cruzada a lambda cihalotrín (Tabla 6.1).

Los datos obtenidos de la población de tuta E.b. S20, resistente a emamectina, al bioensayarla con el insecticida azadiractina, muestran que la población resistente es 3,5 veces menos susceptible que la población sensible. A pesar de ese factor de resistencia, como se solapan los límites fiduciales de los resultados de ambas poblaciones (sensible y resistente) se puede concluir que la población de tuta resistente a emamectina no muestra resistencia cruzada con azadiractina (Tabla 6.1).

En los resultados de metil clorpirifos de este estudio se observan diferencias significativas entre la población sensible (Águilas) y resistente (E.b. S20). Como se muestra en la Tabla 6.1, la población sensible es 3,7 veces más resistente que la seleccionada a emamectina. Se puede decir que hay un efecto antagonista, es decir, el desarrollo de resistencia a emamectina en tuta, hace que dicha plaga sea más sensible a

metil clorpirifos que de normal, lo que se conoce como resistencia cruzada negativa. Lo mismo sucede en una población de *Spodoptera litura* resistente a emamectina donde se encuentra una leve resistencia cruzada negativa a abamectina, indoxacarb y acetamiprid, ya que los valores obtenidos con la población resistente eran inferiores a los obtenidos con la población sensible (Shad *et al.*, 2010).

En este trabajo se puede observar en la Tabla 6.1. que la población de tuta resistente a emamectina (E.b. S20) es 7,3 veces menos susceptible a flubendiamida que la población sensible de referencia (Águilas). Y además, hay diferencias significativas entre los resultados de los bioensayos de ambas poblaciones. Por tanto, para este insecticida parece que sí existe resistencia cruzada, aunque no muy acentuada.

Tabla 6.1. Insecticida, población sensible (Águilas) y resistente (E.b. S20) a emamectina, concentración letal 50 con los límites fiduciales (95% confianza), pendiente y su error, de los bioensayos realizados con la población sensible y seleccionada a los diferentes insecticidas.

Insecticida	Población	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	Pendiente	Error
Spinosad	E.b. S20	0,148	0,058	0,258	1,337	0,271
	Águilas	0,298	0,136	0,503	2,787	0,536
Indoxacarb	E.b. S20	0,818	0,467	1,535	1,960	0,354
	Águilas	0,911	0,630	1,388	2,030	0,344
Clorantianiliprol	E.b. S20	0,140	0,076	0,236	1,370	0,270
	Águilas	0,183	0,142	0,232	2,301	0,232
Ciantraniliprol	E.b. S20	0,124	0,063	0,217	1,238	0,251
	Águilas	0,091	0,072	0,116	2,009	0,267
Metaflumizona	E.b. S20	0,077	0,026	0,165	0,974	0,272
	Águilas	0,129	0,076	0,205	1,251	0,237
Lambda cihalotrin	E.b. S20	1068	686	1723	1,569	0,363
	Águilas	591	150	1028	1,481	0,413
Azadiractina	E.b. S20	7,741	3,027	16,527	1,017	0,2048
	Águilas	2,186	1,197	3,536	1,662	0,307
Metil clorpirifos	E.b. S20	7,523	0,948	3,826	0,956	0,233
	Águilas	27,601	18,739	44,77	1,744	0,216
Flubendiamida	E.b. S20	0,719	0,314	5,027	0,778	0,237
	Águilas	0,099	0,062	0,138	2,073	0,453

La resistencia desarrollada por tuta a emamectina benzoato no le confiere resistencia cruzada a spinosad, indoxacarb, clorantianiliprol, ciantraniliprol, metaflumizona,

lambda cihalotrín y azadiractina. En metil clorpirifos se ha visto una posible resistencia cruzada negativa. Y para el insecticida flubendiamida, se observa resistencia cruzada. Es posible que esta resistencia cruzada fuera más acusada con una población más resistente a emamectina. En tal caso, con una población con más resistencia a emamectina, es posible que también aparecieran resistencias cruzadas a otros compuestos, como los estudiados en este trabajo e incluso otros disponibles en el mercado. Es por ello la importancia de conocer los mecanismos de resistencia y las resistencias cruzadas, para evitar malos manejos de los insecticidas y crear problemas mayores de resistencia.

6.4.- Conclusiones

La población de tuta resistente a emamectina benzoato seleccionada en el laboratorio (E.b. S20), no muestra resistencia cruzada para los insecticidas spinosad, indoxacarb, clorantniliprol, ciantraniliprol, metaflumizona, lambda cihalotrín y azadiractina. En los resultados de metil clorpirifos se observa una leve resistencia cruzada negativa. Sin embargo, la población resistente de tuta a emamectina muestra resistencia cruzada con la diamida flubendiamida.

6.5.- Bibliografía

Campos, M.R., Rodrigues, A.R., Silva, W.M., Silva, T.B., Silva, V.R., Guedes, R.N. y Siqueira, H.A. 2014. "Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: A bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance". Plos One. 9: e103235.

Haddi, K., Berger, M., Bielza, P., Cifuentes, D., Field, L.M., Gorman, K., Rapisarda, C., Williamson, M.S. y Bass, C. 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.

IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), 2017. http://www.irac-online.org/content/uploads/modo_de_accion_Oct11.pdf. Acceso enero 2017.

Roditakis, E., Mavridis, K., Riga, M., Vasakis, E., Morou, E., Rison, J.L. y Vontas, J. 2017a. "Identification and detection of indoxacarb resistance mutations in the para sodium channel of the tomato leafminer, *Tuta absoluta*". Pest Manag Sci.

Roditakis, E., Skarmoutsou, C. y Staurakaki, M. 2013. "Toxicity of insecticides to populations of tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece". Pest Manag Sci. 69: 834-840.

- Roditakis, E., Steinback, D., Moritz, G., Vasakis, E., Stavrakaki, M., Ilias, A., García-Vidal, L., Martínez-Aguirre, M.R., Bielza, P., Morou, E., Silva, J.E., Silva, W.M., Siqueira, H.A., Iqbal, S., Troczka, B.J., Williamson, M.S., Bass, C., Tsagkarakou, A., Vontas, J. y Nauen, Ralf. 2017b. "Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Insect Biochem Mol Biol.* 80: 11-20
- Roditakis, E., Vasakis, E., Grispou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M. y Bassi, A. 2015. "First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides". *J Pest Sci.* 88: 9-16.
- Shad, S.A., Sayyed, A.H. y Saleem, M.A. 2010. "Cross-resistance, mode of inheritance and stability of resistance to emamectin in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci.* 66: 839-846.
- Silva, A.G., Picanço, M.C., Bacci, L., Crespo, A.L., Rosado, J.F. y Guedes, R.N. 2011. "Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*". *Pest Manag Sci.* 67: 913-920.
- Silva, W.M., Berger, M., Bass, C., Balbino, V.Q., Amaral, M.H., Campos, M.R. y Siqueira, H.A. 2015. "Status of pyrethroid resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*". *Pest Biochem Physiol.* 122: 8-14.
- Silva, W.M., Berger, M., Bass, C., Williamson, M., Moura, D.M., Ribeiro, L.M. y Siqueira, H.A. 2016. "Mutation (G275E) of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ subunit is associated with high levels of resistance to spinosyns in *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Pest Biochem Physiol.* 131: 1-8.
- Siqueira, H.A., Guedes, R.N., Fragoso, D.B. y Magalhaes, L.C. 2001. "Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". *Int J Pest Manag.* 47: 247-251.

7.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN SUBLETAL EN LA EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA EN *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

7.1.- Introducción

Los primeros modelos de evolución de insecticidas (Georghiou y Taylor, 1977), fungicidas (Dekker y Georgopoulos, 1982) y herbicidas (Gressel y Segel, 1978, 1982), se basaron en la evolución de poblaciones resistentes en los que la aplicación a concentraciones extremadamente elevadas produjo el desarrollo de resistencia en el punto de acción. Estos modelos sugirieron que si se aplicaban dosis más bajas, con menos presión de selección, se retrasaría el desarrollo de este tipo de resistencias. Sin embargo, al usar dosis bajas, incluso por debajo de las dosis mínimas recomendadas apareció la resistencia en el punto de acción (Heap, 1988).

En la actualidad se tiende a reducir las concentraciones de los caldos de tratamientos insecticidas, ya sea por motivos medio ambientales, regulatorios o económicos (Gressel, 2011). Además, la rapidez con la que se degrada el producto debido a la luz solar, lluvias, temperatura... ya está provocando una modificación de la concentración del producto que se está aplicando (Van de Veire *et al.*, 2002; Desneux *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011; Biondi *et al.*, 2012). Es posible que los insectos experimenten una exposición más o menos crónica (Ramirez-Romero *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010) a concentraciones subletales del insecticida (Desneux *et al.*, 2007). Esa exposición a concentraciones bajas del compuesto provoca que las poblaciones de las diferentes plagas pueden morir o bien estresarse por esa concentración subletal y sobrevivir (Gressel, 2011). Dicho estrés es un gran potenciador de las tasas de mutación. Por lo tanto, probablemente los supervivientes generen más mutaciones de lo normal, y algunas de ellas pueden estar relacionadas con el desarrollo de resistencias a los insecticidas.

La suposición de que la frecuencia de mutación de una especie en concreto es inalterable no es correcta. Actualmente está bien documentado que existe una tasa basal de mutaciones bajo condiciones no estresantes, dando lugar a una variación genética permanente. En condiciones estresantes, la tasa de mutaciones incrementa. Esto provoca una ventaja evolutiva cuando una especie necesita adaptarse a una nueva situación ya que hay una mayor variabilidad de mutaciones. En este caso si el metabolismo del insecto bajo el estrés del tratamiento, no se adapta, muere. Como muchas mutaciones son mortales o perjudiciales, las mutaciones tienen pocas ventajas y muchas desventajas para un organismo. La proporción de mutaciones que ayudan a afrontar el estrés sólo son ventajosas cuando hay estrés (Gressel, 2011).

Es evidente que las plagas que consiguen sobrevivir a una dosis baja de insecticida, se encuentran muy estresadas y, por tanto, pueden haber generado una cantidad considerable de ADN mutante para recuperarse. Incluso puede haber alteraciones epigenéticas duraderas; cambios heredados pero revocables en el genoma (sin modificación de las secuencias de ADN) que conducen a cambios más o menos estables en la expresión génica (Karpinets *et al.*, 2006).

La selección debido a la exposición continua a bajas concentraciones de un insecticida, en lugar de seleccionar con concentraciones con elevadas mortalidades, podría conducir al desarrollo de individuos resistentes a insecticidas en aquellas poblaciones que estén expuestas al tóxico (Palumbo *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2010; Ay y Yorulmaz, 2010; Gressel, 2011; Shad *et al.*, 2012).

En este capítulo se va a comprobar si la exposición a concentraciones subletales de dos insecticidas (emamectina benzoato e imidacloprid) favorece el desarrollo de resistencia a uno de estos insecticidas (emamectina benzoato) en tuta.

7.2.- Material y métodos

En este estudio, que comienza en diciembre de 2014 y finaliza en enero de 2017, se llevan a cabo cinco líneas paralelas e independientes de tuta, las cuales parten de una única población, Mixta (descrita en el apartado “3.3.- Poblaciones de *Tuta absoluta*”). A continuación, se describe cómo se cría y selecciona cada línea, además de encontrarse resumido en la Tabla 7.1:

- Control: se cría con planta limpia de tomate y se selecciona sólo con agua destilada, sin insecticida (0 ppm)
- Subletal emamectina (SubE): se cría con planta tratada de tomate a una concentración subletal para tuta de emamectina y se selecciona sólo con agua destilada, sin insecticida (0 ppm)
- Selección emamectina (Sele): se cría con planta limpia de tomate y se selecciona a emamectina.
- Subletal emamectina + selección emamectina (SubE+Sele): se cría con planta tratada de tomate a una concentración subletal para tuta de emamectina y se selecciona a emamectina
- Subletal imidacloprid + selección emamectina (SubI+Sele): se cría con planta tratada de tomate a una concentración subletal para tuta de imidacloprid y se selecciona a emamectina

Tabla 7.1. Esquema explicativo de la cría y selección de las cinco líneas.

Cría			
Línea	Planta	Producto subletal	Producto selección
Control	Limpia	-	-
SubE	Tratada	Emamectina	-
SelE	Limpia	-	Emamectina
SubE+SelE	Tratada	Emamectina	Emamectina
SubI+SelE	Tratada	Imidacloprid	Emamectina

7.2.1.- Cría

La cría de las líneas Control y SelE se lleva a cabo como está descrito en el apartado “3.5.- Cría de las poblaciones de *Tuta absoluta*”, con planta limpia de tomate.

La cría de las líneas SubE y SubE+SelE se lleva a cabo tratando la planta de cría a una concentración subletal de emamectina para tuta. Esta concentración es de 0,003 ppm de la S0 a la S6 en la línea SubE y de la S0 a la S5 en la línea SubE+SelE. A partir de la S7 en la línea SubE y S6 en la línea SubE+SelE se aumenta la concentración a 0,01 ppm. El procedimiento seguido en la cría de estas dos líneas es similar al que se comenzó a realizar a partir de diciembre de 2013, en la población de tuta que se seleccionó descrito en el apartado “5.3.1.- Cría de de la población”. Este procedimiento es semejante al de la cría de la línea SubI+SelE, la única diferencia radica en que en este caso la planta está tratada a 100 ppm de imidacloprid, no a emamectina, durante todas las selecciones.

El insecticida imidacloprid fue elegido porque es un compuesto con baja toxicidad para la polilla del tomate. Por ello, se consideró que el tratamiento de las plantas de cría con este producto podría producir un estrés químico importante en esta especie. La concentración de 100 ppm fue elegida tras varios bioensayos previos, en los que se observó que esa concentración no tenía un efecto letal significativo en las larvas de tuta. Además, 100 ppm es la concentración máxima que se puede preparar puesto a concentraciones mayores el compuesto precipita.

7.2.2.- Bioensayos de susceptibilidad

Se realizan bioensayos de susceptibilidad en la S0 de la línea Control (resultado de Mixta), S6 de SelE, SubE+SelE y SubI+SelE, S7 de la línea SubE, S13 de la línea SubE+SelE y S14 de las líneas C, SubE, SelE y SubI+SelE para conocer el estado de la resistencia durante y al final del proceso. Este tipo de bioensayos se encuentran explicados en el apartado “3.3.2.- Bioensayo de susceptibilidad” en larvas de segundo

estadio, precedidos de la correspondiente puesta para sincronizar la oviposición (apartado “3.6.1.- Sincronización de la oviposición”).

7.2.3.- Bioensayos de selección

Las cinco líneas de este estudio se seleccionan continuamente para forzar el desarrollo de resistencia. La metodología seguida está descrita en el apartado “3.6.3.- Bioensayo de selección”. La diferencia que hay entre las líneas está en la concentración de insecticida con la que se selecciona. Para la línea Control y SubE, se selecciona con agua sin insecticida (0 ppm). Para SubE+SelE, SelE y SubI+SelE, se selecciona con emamectina.

7.2.4.- Insecticidas

Los insecticidas utilizados son emamectina benzoato (descrito en el apartado “3.4.- Insecticidas y sinergistas”) e imidacloprid.

El formulado de imidacloprid utilizado es un concentrado soluble (SL) formulado a base de imidacloprid al 20% p/v (200 g/l), cuya materia activa pertenece al grupo químico de los neonicotinoides. Su nombre comercial es Confidor 20 LS (Figura 7.1).

Figura 7.1. Confidor 20 LS.

7.2.5.- Análisis estadístico

El análisis de los datos se lleva a cabo con el programa estadístico Polo Plus, como está explicado en el apartado “3.7.- Análisis de datos”.

7.3.- Resultados y discusión

En este apartado se muestran los resultados de las selecciones (Tabla 7.2-7.6) y los datos obtenidos de los bioensayos de susceptibilidad de las cinco líneas (Tabla 7.7).

Todas las tablas de las selecciones tienen la misma estructura, indican el tratamiento, la selección, la concentración (ppm) a la que se ha seleccionado, las larvas totales, vivas y muertas y la mortalidad de cada selección.

El número de larvas vivas en cada selección se aconseja que sea superior a 200. De este modo se asegura un número suficiente de individuos para fundar la nueva selección, así como una variabilidad genética mínima. Esto se mantiene en la mayoría de las selecciones de cada línea.

7.3.1.- Línea Control

En la Tabla 7.2 se muestran los resultados de la selección de la línea Control. En esta línea no se expone a la población a ningún insecticida. Sin embargo, se lleva a cabo la selección con agua (sin insecticida), de manera que esta línea sufriera el mismo proceso que el resto, por si la mortalidad producida por el manejo pudiera tener algún efecto en el desarrollo de la resistencia. La mortalidad varía desde un 0% (S6) hasta un máximo de 25,2 % (S11 y S3). Esta mortalidad puede ser debida a la propia mortalidad natural de las larvas, al manejo y/o a algún condicionante medio ambiental como puede ser exceso de humedad. En esta línea en 4 selecciones (S0, S2, S9 y S10) no se alcanza el número mínimo de 200 larvas vivas, pero al no ser una línea expuesta a ningún tóxico y debido a la alta tasa reproductiva de tuta, se consideró innecesario continuar seleccionando ya que con pocos individuos la población se iba a establecer sin mayores problemas.

Tabla 7.2. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea Control.

Línea	Selección	ppm	Larvas			
			Totales	Vivas	Muertas	Mortalidad (%)
Control	S0	0	234	196	22	9,4
	S1	0	223	202	14	6,3
	S2	0	201	153	48	23,9
	S3	0	321	240	81	25,2
	S4	0	375	286	89	23,7
	S5	0	631	534	97	15,4
	S6	0	692	692	0	0,0
	S7	0	427	338	89	20,8
	S8	0	426	383	40	9,4
	S9	0	164	148	16	9,8
	S10	0	228	170	56	24,6
	S11	0	302	226	76	25,2
	S12	0	415	318	97	23,4
	S13	0	704	577	127	18,0

7.3.2.- Línea Subletal emamectina

La línea SubE se expone durante la cría a una concentración subletal de emamectina, pero no se realiza selección con emamectina. Igual que para el caso anterior, se realiza el proceso de selección con agua para tener en cuenta la mortalidad debida al mismo proceso. En este caso sólo en la S2 no se alcanzó el valor de 200 larvas vivas (168). La mortalidad de esta línea oscila a lo largo de las selecciones. El valor mínimo es de 5,5% en la S0 y de 42,1% en la S8 (Tabla 7.3). La mortalidad en esta línea puede ser debida a los mismos factores nombrados para la línea Control.

Tabla 7.3. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea SubE.

Línea	Selección	ppm	Larvas			
			Totales	Vivas	Muertas	Mortalidad (%)
SubE	S0	0	275	320	15	5,5
	S1	0	306	440	18	5,9
	S2	0	226	168	58	25,7
	S3	0	302	257	45	14,9
	S4	0	505	320	183	36,2
	S5	0	300	258	42	14,0
	S6	0	369	321	48	13,0
	S7	0	422	281	141	33,4
	S8	0	926	536	390	42,1
	S9	0	712	490	222	31,2
	S10	0	437	289	148	33,9
	S11	0	503	388	115	22,9
	S12	0	814	607	207	25,4
	S13	0	699	568	131	18,7

7.3.3.- Línea Selección emamectina

La concentración de emamectina a la cual se comienza a seleccionar y se mantiene de la S0 hasta la S4 es 0,02 ppm. Esta concentración corresponde, aproximadamente, al valor de la CL₅₀ de la población Mixta (CL₅₀ 0,014 ppm), de la cual parten las cinco líneas. El criterio que se siguió para subir las concentraciones, en ésta y en las otras líneas seleccionadas, fue que se subió la concentración cuando la mortalidad se acercó o bajó del 50%.

En la línea SelE el rango de mortalidad de la S0 a la S4 es de 11,2 % (S3) a 67,1% (S1). En una puesta de la S5 se seleccionó a 0,05 ppm, al observar una mortalidad baja (35,63%),

en las otras puestas de la misma selección se aumentó la concentración de selección a 0,08 ppm con una mortalidad de 71,07%. Se continuó a 0,08 ppm en la S6 y S7, donde la mortalidad fue baja (64,6% y 43%, respectivamente). Por ello, se elevó la concentración de selección a 0,3 ppm de la S8 a la S10 y algunas puestas de la S11 (53,35%). De nuevo la mortalidad era baja y se aumentó la concentración en la S11 a 1 ppm con una mortalidad de 75,14 %, hasta la S13.

La concentración de selección de la S13 es 50 veces superior a la de la S0 (Tabla 7.4). Este incremento de la concentración se debe a la disminución de la susceptibilidad de la línea conforme se avanza en las selecciones. En la S3 de esta línea, el número de larvas vivas es escaso (119).

Tabla 7.4. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea SelE.

Línea	Selección	ppm	Larvas			
			Totales	Vivas	Muertas	Mortalidad (%)
SelE	S0	0,02	1044	260	484	46,4
	S1	0,02	677	223	454	67,1
	S2	0,02	783	273	510	65,1
	S3	0,02	134	119	15	11,2
	S4	0,02	409	229	180	44,0
	S5	0,05-0,08	478	195	283	59,2
	S6	0,08	811	287	524	64,6
	S7	0,08	739	421	318	43,0
	S8	0,3	739	227	512	69,3
	S9	0,3	612	255	357	58,3
	S10	0,3	871	295	576	66,1
	S11	0,3-1	964	334	630	65,4
	S12	1	1073	198	875	81,5
	S13	1	880	278	602	68,4

7.3.4.- Línea Subletal emamectina + selección emamectina

Como en la línea SelE, se comienza a seleccionar a 0,02 ppm (valor aproximado a la CL_{50} de la población Mixta). La concentración se aumenta a 0,05 ppm en la S5 debido a la baja mortalidad de la S4 (30,4%). Aún así, la mortalidad mantenía un valor bajo (53,3%) para nosotros ya que el objetivo era hacer más presión de selección. En la S6 se volvió a aumentar esa concentración a 0,08 ppm y la mortalidad se quedó en 34,8%. Por tanto, el aumento a partir de la S7 fue más importante, la concentración de selección se subió a 0,3 ppm y se mantuvo hasta la S11. En estas selecciones (S7-S11) las mortalidades oscilaron de 58,9% (S11) a 84,2% (S8). En la última selección (S12), se

aumentó de nuevo la concentración de selección a 0,8 ppm, obteniendo una mortalidad del 61,7%. En esta línea de selección, SubE+SelE, en la S2 se obtuvieron muy pocas larvas vivas (79), corriendo un gran riesgo el mantenimiento de la línea por su escasa variabilidad genética.

La concentración de selección de la S13 es 40 veces superior a la de la S0 (Tabla 7.5). Este aumento es debido a la respuesta positiva de la línea a la selección.

Tabla 7.5. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea SubE+SelE.

			Larvas			
Línea	Selección	ppm	Totales	Vivas	Muertas	Mortalidad (%)
SubE+SelE	S0	0,02	893	198	695	77,8
	S1	0,02	871	159	712	81,7
	S2	0,02	336	79	257	76,5
	S3	0,02	895	289	606	67,7
	S4	0,02	276	192	84	30,4
	S5	0,05	735	343	392	53,3
	S6	0,08	693	452	241	34,8
	S7	0,3	1554	463	1091	70,2
	S8	0,3	1658	262	1396	84,2
	S9	0,3	1089	258	831	76,3
	S10	0,3	1220	274	946	77,5
	S11	0,3	984	404	580	58,9
S12	0,8	741	284	457	61,7	

7.3.5.- Línea Subletal imidacloprid + selección emamectina

La concentración de emamectina a la cual se comienza a seleccionar (S0) y se mantiene hasta la S3 es 0,02 ppm. Las mortalidades de la S0 a la S3 oscilan entre 55,6% (S3) y 63% (S1). En la S4 y S5, se aumentó la concentración a 0,05 ppm por los bajos valores de mortalidad obtenidos en la S3, pero no fue suficiente y se volvió a subir a 0,08 ppm en la S6, a 0,1 ppm en la S7 y a 0,3 ppm en la S8 y S9 con mortalidades del 56,2%, 40,5%, 58,4% y 60,2%, respectivamente. Los valores de estas mortalidades eran bajos, por tanto se elevó de nuevo a 1 ppm la concentración de selección de la S10 a la S13 y aun así, las mortalidades obtenidas no son extremadamente altas (62,5-81,1%). En la S4 el número de larvas supervivientes no fue el adecuado (148) (Tabla 7.6).

En esta línea se ha dado un aumento de la concentración de selección de 50 veces. Exceptuando algún altibajo, la línea SubI+SelE es la que mejor ha respondido a la selección a emamectina tanto en el porcentaje de mortalidad, como en la calidad y número larvas en las puestas.

Esto puede ser debido al desarrollo rápido de resistencia al estar alimentándose de planta tratada con imidacloprid a una concentración subletal para tuta, 100 ppm, concentración a la cual otras plagas mueren.

Es posible que en esta línea se de hormesis. Éste es un fenómeno biológico por el cual un factor de estrés puede tener efectos inhibitorios a altos niveles de exposición, pero a niveles bajos puede estimular procesos biológicos (Mattson, 2008; Calabrese, 2008).

Tabla 7.6. Selección, concentración de la selección, larvas totales, vivas y muertas y porcentaje de mortalidad de la línea SubI+SelE.

Línea	Selección	ppm	Larvas			
			Totales	Vivas	Muertas	Mortalidad (%)
SubI+SelE	S0	0,02	750	311	449	59,9
	S1	0,02	900	333	567	63,0
	S2	0,02	844	373	471	55,8
	S3	0,02	475	211	264	55,6
	S4	0,05	583	148	466	79,9
	S5	0,05	889	424	465	52,3
	S6	0,08	900	394	506	56,2
	S7	0,1	755	449	306	40,5
	S8	0,3	1003	417	586	58,4
	S9	0,3	689	274	415	60,2
	S10	1	1570	296	1274	81,1
	S11	1	1505	303	1202	79,9
	S12	1	2487	446	2041	82,1
	S13	1	907	340	567	62,5

7.3.6.- Susceptibilidad de las líneas

En la Tabla 7.7 se encuentran los datos obtenidos de los bioensayos de susceptibilidad de las diferentes líneas.

Los resultados de la S0 de la línea Control corresponden a los datos de Mixta, ya que es la población de partida de las cinco líneas. Como se puede observar no hay diferencias significativas entre la S0 y S14 de la línea Control, la susceptibilidad se ha mantenido constante a lo largo de todo el proceso de selección. Es un resultado esperado ya que las selecciones no contenían ningún insecticida (Tabla 7.7). También se puede deducir que la mortalidad experimentada por el mismo proceso de selección (sin insecticida) no tiene ningún efecto sobre la evolución de la resistencia.

La línea SubE, aunque ha estado continuamente expuesta a una concentración subletal de emamectina, no ha desarrollado resistencia frente a este insecticida. No hay diferencias significativas entre los bioensayos realizados en esta línea en la S7 y S14, ni con la S0 de la línea Control (Tabla 7.7). Estos resultados pueden deberse a varias razones. Por un lado, es posible que no se hayan producido mutaciones. Por otro lado, es posible que sí las haya habido pero como no se han seleccionado con insecticida, las mutaciones no tienen una ventaja competitiva. Además, no se han dado cambios epigenéticos observables en la susceptibilidad al insecticida. El concepto de epigenética fue definido por Waddington (1939) como "el estudio de todos los eventos que llevan al desenvolvimiento del programa genético del desarrollo" o según Waddington (1942) como el complejo "proceso de desarrollo que media entre genotipo y fenotipo". Es decir, la epigenética hace referencia al estudio de los factores ambientales (no genéticos) que intervienen en la expresión génica, sin que se produzcan cambios en la secuencia de los nucleótidos. Estos cambios epigenéticos pueden ser heredables.

Los resultados de los bioensayos en la S6 y S14 de la línea SelE muestran factores de resistencia, respecto a la S0 de la línea Control, de 11,5 y 28, respectivamente. La presión de selección realizada en esta línea con concentraciones ascendentes de emamectina, ha provocado el desarrollo de resistencia en tuta a este insecticida (28 veces más resistente que al inicio). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados de la S7 y S14 no muestran diferencias significativas entre ellos (Tabla 7.7).

Lo mismo sucede en la línea SubE+SelE, donde los resultados de los bioensayos de susceptibilidad de la S6 y S13 no muestran diferencias significativas entre ellos. El factor de resistencia de la S6 respecto a la S0 de la línea control es de 8,5. Cabe destacar el factor de resistencia de la S14, 30,1. Esta línea del estudio es 30,1 veces más resistente a emamectina que al inicio (Tabla 7.7). Es posible que este factor de resistencia se deba a una mayor tasa de mutaciones en tuta generada al alimentarse de planta tratada a concentraciones subletales. Es posible que alguna de esas mutaciones esté relacionada con la resistencia a insecticidas. Este efecto combinado con el proceso de selección, eliminaría aquellos individuos cuyas mutaciones no estuvieran relacionadas con la resistencia al insecticida, quedando sólo los individuos resistentes al compuesto.

Por otro lado, al observar los resultados de las líneas SubE y SelE, se puede comprobar que en la línea SubE no se ha desarrollado resistencia al estar tuta continuamente alimentándose de planta tratada a una concentración subletal de emamectina. Y en la línea SelE sí se ha desarrollado resistencia, en magnitud similar a la línea SubE+SelE. Por tanto, se puede decir que la resistencia desarrollada en la línea que combina estas dos anteriormente nombradas, SubE+SelE, se debe principalmente al proceso de selección y no al efecto subletal.

Tabla 7.7. Resultados de los bioensayos de susceptibilidad en las 5 líneas (concentración letal 50 en ppm con sus límites, factor de resistencia y pendiente con su error).

Línea	Selección	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Control	S0*	0,0137	0,0071	0,0223	-	3,157	0,604
	S14	0,0081	0,0022	0,0161	0,6	2,028	0,460
SubE	S7	0,0131	0,0053	0,0342	1,0	1,195	0,414
	S14	0,0172	0,0044	0,0249	1,3	0,923	0,279
SelE	S6	0,1570	0,0760	0,2220	11,5	2,667	0,915
	S14	0,3830	0,0410	1,0760	28,0	0,988	0,323
SubE+SelE	S6	0,1160	0,0360	0,2560	8,5	1,485	0,470
	S13	0,4130	0,0800	0,7550	30,1	1,538	0,502
SubI+SelE	S6	0,0673	0,0332	0,2583	4,9	1,252	0,437
	S14	0,2280	0,0390	0,5140	16,6	1,420	0,284

Las selecciones 6 y 14 de la línea SubI+SelE, no muestran diferencias significativas entre ellas en la susceptibilidad frente a emamectina pero sí son más resistentes que la población de partida, teniendo la S14 un factor de resistencia de 16,6 (Tabla 7.7). Esta línea ha desarrollado resistencia pero su FR es inferior al de la línea SubE+SelE (30,1). Al igual que en los casos anteriores, no parece que la exposición subletal al imidacloprid haya tenido un efecto significativo en el desarrollo de la resistencia a emamectina. Por tanto, en esta línea SubI+SelE puede considerarse que únicamente el efecto de la selección con emamectina ha contribuido a la resistencia.

Hay estudios donde el insecto se adapta fisiológicamente y desarrolla resistencia a un insecticida debido a la exposición continua de un tóxico a concentraciones subletales. Esto se ha observado en *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* biotipo B, donde se han expuesto a la CL₂₅ de diferentes insecticidas durante siete generaciones (Liang *et al.*, 2012). Los datos más destacados para *B. tabaci* muestran un ratio de resistencia en nitenpiram, imidacloprid y acetamiprid de 6, 3,1 y 5, respectivamente. En *T. vaporariorum* cabe destacar el aumento de la resistencia para nitenpiram e imidacloprid con ratios de 3,7 y 2,5, respectivamente (Liang *et al.*, 2012). Sin embargo, en los estudios con tuta aquí presentados, no se ha observado esta adaptación con efectos transgeneracionales.

7.4.- Conclusiones

El estudio paralelo de las diferentes líneas ha permitido comprobar que no ha habido efecto de las concentraciones subletales en el desarrollo de la resistencia a emamectina, ni con emamectina (SubE y SubE+SelE) ni con imidacloprid (SubI+SelE).

El desarrollo de resistencia que se ha obtenido en la línea SelE (FR 28), SubE+SelE (FR 30,1) y SubI+SelE (FR 16,6) viene dado por la presión de selección generada.

El efecto de hormesis observado en la línea SubI+SelE sería interesante estudiarlo. Sería muy útil conocer los efectos subletales o estimuladores que tiene un insecticida en una plaga no objetivo, ya que la aplicación de un insecticida para una plaga puede estar generando un “beneficio” o “mejora” en la población de otra plaga del mismo cultivo a la cual no le afecta ese compuesto.

7.5.- Bibliografía

Ahmad, M., Arif, M.I. y Naveed, M. 2010. “Dynamics of resistance to organophosphate and carbamate insecticides in the cotton whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Pakistan”. J Pest Sci. 83: 409–420.

Ay, R. y Yorulmaz, S. 2010. “Inheritance and detoxification enzyme levels in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) strain selected with chlorpyrifos”. J Pest Sci. 83: 85–93.

Biondi, A., Desneux, N., Siscaro, G. y Zappalà, L. 2012. “Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*”. Chemosphere. 87: 803–812.

Calabrese, E.H. 2008. “Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists”. Environ Toxicol Chem. 27: 1451–1474.

Dekker, J., y Georgopoulos, S.G. 1982. “Fungicide resistance in crop protection”. PUDOC, Wageningen, The Netherlands.

Desneux, N., Decourtye, A. y Delpuech, J.M. 2007. “The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods”. Annu Rev Entomol. 52: 81–106.

Desneux, N., Fauvergue, X., Dechaume-Moncharmont, F.X., Kerhoas, L., Ballanger, Y. y Kaiser, L. 2005. “*Diaeretiella rapae* limits *Myzus persicae* populations after applications of deltamethrin in oilseed rape”. J Econ Entomol. 98: 9–17.

- Gressel, J. 2011. "Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies". *Pest Manag Sci.* 67: 253-257.
- Georghiou, G.P., y Taylor, C.E. 1977. "Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance". *J Econ Entom.* 70: 319-323.
- Gressel, J., y Segel, L.A. 1978. "The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides: possible reasons and implications". *J Theor Biol.* 75: 349-371.
- Gressel, J., y Segel, L.A. 1982. "Interrelating factors controlling the rate of appearance of resistance: the outlook for the future". *Herbicide Resistance in Plants.* New York. 325-347.
- Han, P., Niu, C.Y., Lei, C.L., Cui, J.J. y Desneux, N. 2010. "Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L". *Ecotoxicology.* 19:1612-1619.
- Karpinets, T.V., Greenwood, D.J., Pogribny, I.P., y Samatova, N.F. 2006. "Bacterial stationary-state mutagenesis and mammalian tumorigenesis as stress-induced cellular adaptations and the role of epigenetics". *Curr Genom.* 7: 481-496.
- Liang, P., Tian, Y-A., Biondi, A., Desneux, N. y Gao, X-W. 2012. "Short-term and transgenerational effects of the neonicotinoid nitenpyram on susceptibility to insecticides in tow whitefly species". *Ecotoxicology.* 21: 1889-1898.
- Mattson, M.P. 2008. "Hormesis defined". *Ageing Res Rev.* 7: 1-7.
- Palumbo, J.C., Horowitz, A.R. y Prabhaker, N. 2001. "Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*". *Crop Prot.* 20: 739-765.
- Ramirez-Romero, R., Desneux, N., Decourtye, A., Chaffiol, A. y Pham-Delègue, M.H. 2008. "Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honeybee *Apis mellifera* L". *Ecotoxicol Environ Saf.* 70:327-333.
- Shad, S.A., Sayyed, A.H., Fazal, S., Saleem, M.A., Zaka, S.M. y Ali, M. 2012. "Field evolved resistance to carbamates, organophosphates, pyrethroids, and new chemistry insecticides in *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae)". *J Pest Sci.* 85:153-162.
- Van de Veire, M., Sterk, G., Van der Staaij, M., Ramakers, P.M. y Tirry, L. 2002. "Sequential testing scheme for the assessment of side-effects of plant protection products on the predatory bug *Orius laevis*gatus". *Biocontrol.* 47:101-113.

Waddington, C. H. 1942. "The pupal contraction as an epigenetic crisis in *Drosophila*". Zoological Society of London. 111: 181-188.

Waddington, H. 1939. "Development as an epigenetic process. An introduction to modern genetics". Alien and Unwin, London.

Xia, B., Shi, T., Liang, P. y Gao, X.W. 2002. "Effect of sublethal concentration of insecticides on the carboxylesterase in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)". Chin J Pestic Sci. 4:23-27

8.- EFECTO DE LA RESISTENCIA A EMAMECTINA BENZOATO EN EL CICLO DE VIDA DE *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

8.1.- Introducción

Tuta es nativa de Sudamérica, llegó a España en 2006 y se dispersó rápidamente por los países del Mediterráneo considerándose la mayor plaga para el cultivo del tomate al aire libre y en invernaderos (Desneux *et al.*, 2010).

Estos insectos no entran en diapausa y en función de las condiciones medioambientales, la duración de cada estadio larvario es diferente (Sannino y Espinosa, 2010).

Los estudios que hay sobre la biología y desarrollo de tuta son escasos, se limitan principalmente a los países del sur de América donde las condiciones ambientales son favorables para el ciclo de vida de este insecto (Miranda *et al.*, 1998).

Es necesario conocer la ecología de tuta para que las estrategias de control contra esta plaga sean exitosas. La información que aporta una tabla de vida es importante para controlar una plaga, ya que proporciona una descripción bastante completa sobre diferentes parámetros de su ecología.

El desarrollo de resistencia de un insecto puede ir asociado a un coste de adaptación (*fitness cost*). Los cambios genéticos que confieren la resistencia pueden tener contrapartidas, con una peor adaptación en otros aspectos, como una menor fecundidad o fertilidad, ciclo de vida más largo, tasa de reproducción reducida, etc. Esto puede ser debido por varias causas. Una posibilidad es que la resistencia implique un gasto energético, es decir, el insecto tiene que invertir gran parte de sus energías en metabolizar el tóxico para no morir. Si gasta su energía en metabolizar el insecticida, el insecto ha de quitar esa energía de otras funciones vitales para su vida, además del estrés que todo ello le conlleva.

En este capítulo se va a realizar una tabla de vida de los diferentes estadios del ciclo de vida de tuta, de una población sensible y otra resistente a emamectina.

8.2.- Material y métodos

8.2.1.- Determinación de los estadios

El primer paso para poder llevar un seguimiento de los diferentes estadios del ciclo de tuta, comienza con una puesta de doce horas. Se lleva a cabo en jaulas de cría con planta limpia de tomate, en una jaula se pone la población sensible (Mixta) y en otra la

resistente (E.b. S20). Una vez extraídos los adultos, se cortan los folíolos y se ponen en envases de plástico translúcidos con su correspondiente tapadera agujereada para permitir la aireación (volumen 2000 ml), evitando así la condensación. En el peciolo de cada folíolo se pone un algodón saturado en agua para evitar la deshidratación del material vegetal durante el ensayo, ya que en él se encuentran huevos, primer estadio del ciclo de vida de tuta (Figura 8.1). Cada huevo de cada población es un individuo de la tabla de vida.

Figura 8.1. Folíolos con huevos de tuta enumerados, algodón saturado en agua en el peciolo, en el interior de un envase plástico translúcido con aireación en la tapa.

El seguimiento del ciclo de vida de cada individuo se llevó a cabo mediante observación visual. Cuando en un folíolo había dos o más individuos, éstos eran extraídos e individualizados en otro folíolo (Figura 8.2).

Figura 8.2. Individuos individualizados en folíolos de tomate con hidratación en el peciolo.

Se hidrataba el algodón cuando era necesario así como sustituido por uno nuevo. Y lo mismo con los folíolos, una vez se encontraban en mal estado, se extraía la larva y el material vegetal se sustituía por otro nuevo.

Todo el ensayo se encontraba en laboratorio bajo condiciones medioambientales controladas, a una temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo de 16:8 h.

8.2.2.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos se han analizado con un test t para determinar si hay diferencias significativas entre la población sensible y resistente de tuta a emamectina.

8.3.- Resultados y discusión

En la Tabla 8.1 se presenta el promedio de la duración de los diferentes estadios del ciclo de vida de tuta en la población sensible y resistente a emamectina, el error y el número de individuos entre paréntesis.

En el estadio de huevo no hay diferencias significativas entre la población sensible y resistente a emamectina de tuta. La duración del huevo es de 5,44 y 5,71 días en la población sensible y resistente, respectivamente (Tabla 8.1). Estos valores se encuentran dentro del rango de los valores aportados por investigaciones en Chile en tuta (4-6 días) (Barrientos *et al.*, 1998) y son cercanos a la duración del huevo (5,8 días) según Fernández y Montagne (1990). Sin embargo, en otros estudios llevados a cabo en tuta (en diferentes cultivares de tomate) el promedio de duración del huevo es de 4-4,1 días (Gharekhani y Salek-Ebrahimi, 2014) y 4,4-4,6 días (Rostami *et al.*, 2017). Estos valores son más bajos que los obtenidos para las poblaciones de tuta de este estudio, sensible (5,44 días) y resistente (5,71 días). Las tablas de vida realizadas por Gharekhani y Salek-Ebrahimi (2014) y Rostami *et al.* (2017) se llevan a cabo a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, un grado menos que la de la Tabla 8.1.

En larvas de primer, tercer y cuarto estadio larvario tampoco hay diferencias significativas. Sin embargo, en larvas de segundo estadio sí hay diferencias entre los individuos de la población sensible y resistente. El periodo de desarrollo de las larvas de segundo estadio de la población sensible (3,08 días), es más corto que el de las larvas de la población resistente (3,76 días) (Tabla 8.1).

En el estadio larvario, el cual engloba desde que emerge la larva (L1) hasta que comienza el periodo de prepupa (L4), también hay diferencias significativas entre la población sensible (11,69 días) y resistente (12,52 días). La población sensible vuelve a tener un periodo más corto de duración de desarrollo (Tabla 8.1). Estos valores de la población sensible y resistente a emamectina de tuta, se encuentran en el rango de días que aportan otras investigaciones del ciclo de vida de tuta donde afirman que el estadio larvario tiene una duración de 11-13 días (Barrientos *et al.*, 1998) y 11-15 días (Fernández y Montagne, 1990). Rostami *et al.* (2017) afirman que el periodo larvario en tuta dura 12,64-13,06 días, valores algo más elevados que los mostrados en este trabajo

(11,69 y 12,52 días). Sin embargo, los datos de la Tabla 8.1 del estadio larvario, son más elevados que los datos que se muestran en la tabla de vida de tuta de Gharekhani y Salek-Ebrahimi (2014), donde afirman que el periodo larvario tiene una duración de 9,02-10,11 días.

En el estadio de prepupa, cuando tuta deja de alimentarse, sale de la galería y busca un lugar adecuado para pupar, es la población resistente la que tiene un periodo más corto de duración de esta fase del ciclo (2,43 frente a 2,84 días). Para este estadio también hay diferencias significativas entre poblaciones (Tabla 8.1).

El tiempo de duración en estado de pupa es menor en la población sensible (8,89 días) que en la población resistente (11,68 días), encontrándose diferencias significativas entre ambas poblaciones (Tabla 8.1). La población sensible muestra un periodo (8,89 días) más corto en el estado de pupa que los observados en la tabla de vida de Rostami *et al.* (2017) (9,51-10,7 días). Sin embargo, la población de tuta resistente a emamectina muestra un periodo en el estadio de pupa (11,68 días) algo más elevado que el que aporta Rostami *et al.* (2017) (9,51-10,7 días). Por otro lado, Gharekhani y Salek-Ebrahimi (2014) y Barrientos *et al.* (1998) obtienen periodos de duración de la pupa de tuta más cortos, 6,61-7,58 y 5-8 días respectivamente, que los mostrados en la Tabla 8.1 así como los observados por Rostami *et al.* (2017).

Tabla 8.1. Promedio $\pm$ error típico de duración de los diferentes estadios de tuta en la población sensible y resistente a emamectina (entre paréntesis número de individuos).

Estadio	Población	
	Sensible	Resistente
Huevo	5,44 $\pm$ 0,14a (45)	5,71 $\pm$ 0,10a (80)
L1	2,96 $\pm$ 0,11a (45)	2,90 $\pm$ 0,06a (80)
L2	3,08 $\pm$ 0,11a (45)	3,76 $\pm$ 0,14b (78)
L3	2,77 $\pm$ 0,09a (39)	3,04 $\pm$ 0,04a (76)
L4	3,06 $\pm$ 0,20a (39)	2,81 $\pm$ 0,14a (67)
L1-L4	11,69 $\pm$ 0,22a (32)	12,52 $\pm$ 0,12b (67)
Prepupa	2,84 $\pm$ 0,11b (25)	2,43 $\pm$ 0,07a (58)
Pupa	8,89 $\pm$ 0,26a (19)	11,68 $\pm$ 0,29b (48)
Adulto	7,74 $\pm$ 0,86b (19)	4,13 $\pm$ 0,35a (48)

Los números entre paréntesis hacen referencia al número de individuos.

Letras diferentes muestran diferencias significativas entre las poblaciones (Test t, $p < 0,05$).

Una vez emergido el adulto, mueren significativamente antes los individuos resistentes (4,13 días) que los sensibles (7,74 días) (Tabla 8.1). Aunque hay diferencias significativas entre ambas poblaciones, los datos obtenidos no parecen ser muy fiables ya que los promedios de la Tabla 8.1 se alejan bastante de lo observado en otros estudios de tuta donde el adulto dura 15,17-17,73 (Gharekhani y Salek-Ebrahimi, 2014) y 10-10,49 días (Rostami *et al.*, 2017). Esto puede ser debido a que una vez emergido el adulto, no se le proporcionó ninguna fuente de hidratación como puede ser algodón hidratado con agua o material vegetal fresco.

8.4.- Conclusiones

La duración del estadio de huevo, así como el periodo de duración de larvas de primer, tercer y cuarto estadio es similar en la población sensible y resistente de tuta a emamectina. No sucediendo lo mismo para el resto de fases del ciclo de vida de tuta.

El estadio larvario (L1-L4) es más corto en la población sensible que en la resistente, al igual que en la fase de pupa. Sin embargo, en el estadio de prepupa, la población resistente cuenta con un periodo más corto.

La duración de la fase de adulto no es significativa ya que los valores obtenidos no son muy coherentes al compararlos con la bibliografía relacionada, pero muestra la mayor capacidad de los adultos sensibles de sobrevivir en una situación de estrés (sin hidratación).

En general, se puede concluir que la población sensible a emamectina de tuta completa su ciclo en menos tiempo que la población resistente. Este hecho puede estar asociado con la energía que tiene que gastar el insecto de la población resistente para metabolizar el tóxico. Por tanto, le quedan menos energías para completar su ciclo de vida y tarda más días que una población sensible en hacerlo.

8.5.- Bibliografía

Barrientos, R., Norero, J.A. y Estay, P. 1998. "Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae)". Ciencia e Investigación Agraria. 25: 133-137.

Desneux, N., Wajnberg, E., A.G., Wyckhuys, K., Burgio, G., Arpia, S., Narváez-Vasques, C.A., González-Cabrera, J., Catalán, D., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T. y Urbaneja, A. 2010. "Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control". J Pest Sci. 83: 197-215.

- Fernández, S. y Montagne, A. 1990. "Biología del minador del tomate, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick)". Bull Entomol Venez. 5: 89-99.
- Gharekhani, G.H. y Salek-Ebrahimi, H. 2014. "Life table parameters of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) on different varieties of tomato". J Econ Entomol. 107: 1765-1770.
- Miranda, M.M., Picanço, M., Zanuncio, J.C. y Guedes, R.N. 1998. "Ecological life table of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)". Biocontrol Sci Technol. 8: 597-606.
- Rostami, E., Madadi, H., Abbasipour, H., Allahyari, H. y Cuthbertson, A.G. 2017. "Life table parameters of the tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) on different tomato cultivars". J Appl Entomol. 141: 88-96.
- Sannino, L. y Espinosa, B. 2010. "*Tuta absoluta*. Guida alla conoscenza e recentacquisizioni una corretta difesa". L'Informatore Agrario 66. 1: 1-113.

9.- HERENCIA DE LA RESISTENCIA EN *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)

9.1.- Introducción

El éxito de una estrategia de resistencia frente a los insecticidas depende de varios factores como ya se ha ido comentando a lo largo de los diferentes capítulos, y entre ellos se encuentra el modo de herencia de la resistencia. Tener un cierto grado de conocimiento de la genética de la resistencia, aumenta la capacidad de diseñar y llevar a cabo mejores programas de gestión de la resistencia.

Por tanto, el objetivo de este capítulo es investigar el modo de herencia de la resistencia a emamectina benzoato en *Tuta absoluta*. Más concretamente, en determinar si la resistencia a emamectina de una población de tuta (E.b. S20) es autosomal, va ligada al sexo o tiene un efecto maternal. Además, se va a calcular el grado de dominancia y la dominancia efectiva.

9.2.- Material y métodos

9.2.1.- Bioensayos de cruces recíprocos

Los cruces recíprocos se llevan a cabo con la población resistente a emamectina (E.b. S20) y la sensible (Mixta), para intercambiar recíprocamente los genotipos de ambas poblaciones y poder determinar la herencia de la resistencia. Para ello, por un lado se cruzan machos de la población sensible con hembras de la población resistente a emamectina de tuta. Y por otro lado, se cruzan machos de la población resistente con hembras de la población sensible de tuta.

El primer paso para realizar dichos cruces comienza poniendo los adultos a poner huevos (puestas) como se ha explicado en el apartado “3.6.1.- Sincronización de la oviposición”, en una jaula (como las descritas en el apartado 3.2.) con planta limpia. En una jaula se pone la población sensible y en otra la población resistente. La puesta se realiza el mismo día y durante el mismo tiempo para que ambas descendencias estén sincronizadas, ya que el objetivo es que se crucen en el estadio reproductivo, adultos. Ambas jaulas se crían con planta limpia de tomate.

Una vez las tutas han alcanzado el estadio de crisálida, son sacadas con ayuda de un pincel y pinzas especiales. Por un lado se sacan las pupas de la población sensible y por otro las de la población resistente (Figura 9.1).

Figura 9.1. Crisálidas extraídas de la población sensible y resistente, agrupadas individualmente.

A continuación, se sexan los individuos en el estadio de pupa con ayuda de una lupa (Figura 9.2).

Figura 9.2. Pupa recién formada para sexar (foto de la izquierda), detalle del abdomen de una pupa de tuta (foto de la derecha) ambas en la lupa.

Para diferenciar entre machos y hembras, se han seguido las indicaciones del artículo de Coelho y França (1987), donde señalan que la diferencia entre los machos y las hembras se encuentra en el abdomen de las pupas (Figura 9.3).

Figura 9.3. Parte final del abdomen de la hembra (foto de la izquierda) y del macho (foto de la derecha).

A continuación, se ponen las pupas macho de la población resistente a emamectina y las pupas hembra de la población sensible a emamectina, en una jaula con planta limpia de tomate. Y en otra jaula se ponen las pupas macho de la población sensible a emamectina y las pupas hembra de la población resistente a emamectina con planta de tomate (Figura 9.4).

Figura 9.4. Pupas macho de la población sensible en una placa petri con algodón, pupas hembra de la población resistente en un envase transparente con algodón en su base y dos plantas de tomate en el interior de una jaula de cría.

En la Tabla 9.1 se observa el número de pupas de cada sexo que se obtuvieron de las puestas iniciales, y el número de adultos emergidos de esas pupas entre paréntesis.

Tabla 9.1. Número de pupas macho y hembra de la población sensible y resistente y el número de adultos emergidos entre paréntesis.

	Machos	Hembras
Sensible	33 (24)	26 (20)
Resistente	33 (16)	18 (12)

En la Figura 9.5, se pueden ver pupas vacías y pupas de las que el adulto no ha emergido.

Figura 9.5. Pupas vacías, pupas con el adulto dentro que no ha emergido y pupas deformadas

Una vez emergen los adultos y se cruzan, ponen huevos (Figura 9.6) y de ambas descendencias se hace un bioensayo como el descrito en el apartado “3.6.2.- Bioensayo de susceptibilidad” en larvas de segundo estadio con emamectina benzoato.

Figura 9.6. Detalle de los huevos de tuta en los tricomas del tronco de la planta de tomate de uno de los cruces.

9.2.2.- Análisis estadístico

El análisis de los datos se lleva a cabo con el programa estadístico Polo Plus, como se comentó en el apartado “3.7.- Análisis de datos”.

9.2.3.- Análisis de la herencia

Los datos obtenidos de cada cruce recíproco se utilizan para determinar si la resistencia es autosomal, va ligada al sexo o tiene un efecto maternal.

El grado de dominancia para la CL_{50} (D_{LC}) se calcula como describe Bourguet *et al.* (2000):

$$D_{LC} = (\log CL_{RS} - \log CL_{SS}) / (\log CL_{RR} - \log CL_{SS})$$

Donde CL_{RS} es la concentración letal 50 para cada F1, CL_{SS} es la concentración letal 50 de la población sensible y CL_{RR} es la concentración letal 50 de la población resistente. Varía de 0 (completamente recesivo) a 1 (completamente dominante).

La dominancia efectiva (D_{ML}) se calcula a partir de los datos de mortalidad a una concentración en concreto con la siguiente fórmula (Bourguet *et al.*, 2000):

$$D_{ML} = (ML_{RS} - ML_{SS}) / (ML_{RR} - ML_{SS})$$

Donde ML_{RS} es la mortalidad para la F1 de un cruce, ML_{SS} corresponde a la mortalidad de la población sensible y ML_{RR} de la población resistente. El rango de valores va de 0 (resistencia completamente recesiva) y 1 (resistencia completamente dominante).

9.3.- Resultados y discusión

En este apartado se muestran los resultados de los bioensayos de susceptibilidad a emamectina de los cruces recíprocos, de la población sensible y resistente.

Además, se ha calculado la dominancia de la resistencia y la dominancia efectiva.

9.3.1.- Herencia de la resistencia

En la Tabla 9.2. se muestra el nombre de la población bioensayada a emamectina benzoato o cruce, la concentración letal 50 con sus límites fiduciales, factor de resistencia y la pendiente con su error de los ensayos realizados.

La población resistente muestra un factor de resistencia de 81 frente a la población sensible, siendo los factores de los cruces recíprocos 2 y 5. Los resultados de los cruces son muy similares, no hay diferencias significativas entre ambos ensayos, se solapan los límites fiduciales. Estos resultados sugieren que la resistencia de tuta a emamectina benzoato es heredada autosómicamente y no va ligada al sexo. Lo mismo sucede en la resistencia en tuta a diamidas. Roditakis *et al.* (2017) realizaron bioensayos en la F1 de dos cruces recíprocos de una población sensible y otra resistente de tuta de Italia a diamidas. Y, aunque en los resultados de ambos cruces se observan diferencias

significativas, los autores afirman que puede ser debido más bien a factores variables propios del bioensayo que a razones ligadas al sexo (Roditakis *et al.*, 2017). Por lo tanto, concluyen que el efecto maternal en la herencia de la resistencia es insignificante y que la resistencia a diamidas en tuta es heredada autosómicamente.

Lo mismo afirman Campos *et al.* (2014) observando los resultados de los bioensayos de los cruces recíprocos de una población sensible y otra resistente de tuta de Brasil a spinosad. La resistencia a spinosad en tuta es autosómica, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de los ensayos de los cruces de las poblaciones brasileñas de tuta.

Tabla 9.2. Nombre de la población, concentración letal 50 y sus límites (95% confianza), factor de resistencia y pendiente con su error de los ensayos realizados con emamectina benzoato.

Población	CL ₅₀	Lim inf	Lim sup	FR	Pendiente	Error
Machos sensibles x Hembras resistentes	0,0224	0,0049	0,0604	2	0,723	0,153
Machos resistentes x Hembras sensibles	0,0681	0,0229	0,2286	5	0,814	0,217
E.b. Sub S20 (R)	1,1110	0,6999	1,6360	81	2,1470	0,4980
Mixta (S)	0,0137	0,0071	0,0223	1	1,7040	0,4850

En la herencia de la resistencia a emamectina de otras dos especies de lepidópteros plaga, se ha observado lo mismo que ocurre en la resistencia de tuta a emamectina, diamidas y spinosad. La herencia de la resistencia a emamectina es autosomal, no hay efecto maternal ni está ligado al sexo en *Spodoptera litura* (Shad *et al.*, 2010) y en *Spodoptera exigua* (Che *et al.*, 2015). De nuevo no se observan diferencias significativas en los resultados de los cruces recíprocos para ambas especies.

9.3.2.- Grado de dominancia (D_{LC})

El grado de dominancia del cruce entre machos sensibles y hembras resistentes es 0,11, indicando una resistencia casi completamente recesiva. En el cruce de machos resistentes y hembras sensibles, el grado de dominancia es 0,36. Esto señala que la resistencia es recesiva.

Resultados similares se observan en la resistencia de tuta a diamidas en poblaciones de Italia y de Brasil. En las poblaciones italianas los grados de dominancia son 0,18 (hembras sensibles con machos resistentes) y 0,35 (machos sensibles con hembras resistentes) (Roditakis *et al.*, 2017), y en las brasileñas 0,33 y 0,30 (Campos *et al.*, 2014).

Estos resultados se han obtenido calculando el grado de dominancia siguiendo la fórmula de Bourguet *et al.* (2000) con los datos de los autores.

Los grados de dominancia en las poblaciones de tuta resistentes a emamectina, diamidas y spinosad aportan la misma información que los datos obtenidos con *Spodoptera litura*. Los grados de dominancia en *S.litura* para los cruces recíprocos son $0,82 \pm 0,19$ (hembras seleccionadas con machos sensibles) y $0,83 \pm 0,18$ (hembras sensibles con machos seleccionados), indicando una dominancia incompleta de la resistencia (Shad *et al.*, 2010).

9.3.3.- Dominancia efectiva (D_{ML})

En la Tabla 9.3 se muestran los datos de la mortalidad corregida a varias concentraciones de la combinación de los cruces recíprocos (pooled), de la población sensible y de la resistente. Datos con los cuales se ha calculado la dominancia efectiva.

Tabla 9.3. Datos de la mortalidad corregida a varias concentraciones de la combinación de los cruces recíprocos (pooled), de la población sensible y de la resistente.

Concentración (ppm)	Mortalidad corregida		
	Pooled	Sensible (Mixta)	Resistente (E.b. S20)
0,003	23,2	22,0	0,0
0,03	33,9	78,4	6,6
0,3	69,6	100,0	13,8
3,0	100,0	100,0	82,8

En la Tabla 9.4 se observan los resultados de la dominancia efectiva para la combinación de ambos cruces a varias concentraciones. La resistencia es completamente recesiva a 0,003 y 3 ppm (0,0 y 0,0), recesiva a 0,3 ppm (0,353) y tiende a ser menos recesiva a 0,03 ppm (0,620). Por tanto, a la dosis de campo (15 ppm) se espera que se comporte también como recesiva.

Tabla 9.4. Datos de la dominancia efectiva de la combinación de los cruces recíprocos (pooled) a diferentes concentraciones.

Cruce	Concentración (ppm)			
	0,003	0,03	0,3	3
Cruces recíprocos combinados	0,0	0,620	0,353	0,0

Sin embargo, en la resistencia de tuta a spinosad de poblaciones brasileñas a altas concentraciones es recesiva, mientras que en concentraciones bajas se da la dominancia completa, e incompletamente recesivo a concentraciones intermedias de spinosad, lo cual es esperable para un patrón de herencia incompletamente recesivo (Campos *et al.*, 2014).

Algo similar sucede con otro lepidóptero como es *Spodoptera litura*. La estimación de dominancia efectiva, mostró que la dominancia aumenta a medida que la concentración de emamectina disminuye. La resistencia es dominante a baja concentración y completamente recesiva en la concentración más elevada (Shad *et al.*, 2010).

9.4.- Conclusiones

La resistencia de tuta a emamectina benzoato es heredada autosómicamente y no va ligada al sexo. Los resultados del grado de dominancia indican que dicha resistencia es recesiva, lo mismo que los cálculos de la dominancia efectiva.

9.5.- Bibliografía

- Bourguet, D., Genissel, A. y Raymond, M. 2000. "Insecticide resistance and dominance levels". J Econ Entomol. 93: 1588-1595.
- Campos, M.R., Rodrigues, A.R., Silva, W.M., Silva, T.B., Silva, V.R., Guedes, R.N. y Siqueira, H.A. 2014. "Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance". Plos One. 9: e103235.
- Che, W., Huang, J., Guan, F., Wu, Y. y Yang, Y. 2015. "Cross-resistance and inheritance of resistance to emamectin benzoate in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). J Econ Entomol. 108: 2015-2020.
- Coelho, M. y França, F. 1987. "Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro". Pesq Agropec Bras. 22: 129-135.
- Roditakis, E., Steinback, D., Moritz, G., Vasakis, E., Stavrakaki, M., Ilias, A., García-Vidal, L., Martínez-Aguirre, M.R., Bielza, P., Morou, E., Silva, J.E., Silva, W.M., Siqueira, H.A., Iqbal, S., Troczka, B.J., Williamson, M.S., Bass, C., Tsagkarakou, A., Vontas, J. y Nauen, Ralf. 2017. "Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)". Insect Biochem Mol Biol. 80: 11-20

Shad, S.A., Sayyed, A.H. y Saleem, M.A. 2010. "Cross-resistance, mode of inheritance and stability of resistance to emamectin in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manag Sci. 66: 839-846.