



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
Instituto de Tecnología Nuclear Dan Beninson

***“UTILIZACIÓN DE LAS RADIACIONES IONIZANTES PARA
EL CONTROL DE LA POLILLA DEL TOMATE *Tuta absoluta*
(MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)”***

Tesis presentada para aspirar al título de Doctora en Tecnología Nuclear

María Verónica Yusef

Directora: Dra. Silvia Noemí López

Co-director: Dr. Severino Carlos Michelin

Lugar y fecha: Buenos Aires, 8 de agosto de 2024.



Comisión Nacional
de Energía Atómica



Universidad
Nacional
de San Martín

AGRADECIMIENTOS

A todos los que de alguna manera hicieron posible que llegara a esta instancia...

Presentaciones científicas que se realizaron con los resultados obtenidos en la Tesis

- Yusef, M.V, López, S.N., Michelin, S. C., Solís, A. (2022). Determinación del polimorfismo genético inducido por radiaciones ionizantes en la plaga *Tuta absoluta*. XLVI Reunión Anual de de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear (AATN) 19 al 22 de diciembre, Buenos Aires.
- Yusef M.V., Michelin S. C., Britos H.L., Solís A., López S.N. (2019). Efecto de la radiación gamma sobre parámetros biológicos de la polilla del tomate *Tuta absoluta* - Desarrollo de Herramientas para el Manejo Integrado de Artrópodos Perjudiciales Resúmenes de actividades del Proyecto Específico PNPV1135033 "Desarrollo de herramientas para el manejo integrado de artrópodos perjudiciales" - Programa Nacional de Protección Vegetal del INTA. Ediciones INTA. 87-89
- Yusef M.V., Michelin S. C., Britos H.L., Solís A., López S.N. (2018). Determinación de las condiciones óptimas de irradiación de insectos adultos de la polilla del tomate *Tuta absoluta* para inducir esterilidad heredada. XLV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear (AATN) 5 al 6 de diciembre Cancillería Argentina, Buenos Aires, Argentina
- Yusef M.V., López S.N., Michelin S. C., Britos H.L., Solís A., Pawlak E. S., Malter Terrada M. (2018). Alteraciones morfológicas inducidas por radiación gamma en euespermatozoides de machos de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: gelechiidae). X Congreso Argentino de Entomología, Facultad de Ciencias Agrarias, Chacras de Coria, Luján de Cuyo, Mendoza, 21 al 24 de mayo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
Presentaciones científicas que se realizaron con los resultados obtenidos en la Tesis.....	4
ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I	14
INTRODUCCION GENERAL	14
1.1. Importancia económica del cultivo de tomate	14
1.2. <i>Tuta absoluta</i> como plaga del cultivo del tomate y su distribución nacional e internacional	15
1.2.1. Morfología de <i>T. absoluta</i>	17
1.2.2. Biología de <i>T. absoluta</i>	19
1.2.3. Control de <i>T. absoluta</i>	20
1.2.4. Control Genético: Técnica del Insecto Estéril (TIE)	21
1.3. Conceptos básicos sobre los efectos biológicos de las Radiaciones Ionizantes (RI).....	22
1.3.1. Clasificación de las radiaciones	22
1.3.2. Mecanismo de acción de las RI	23
1.3.3. Lesiones inducidas en el ADN por las RI	24
1.3.4. Efectos de las RI sobre células somáticas y germinales.....	29
1.4. Utilización de las RI para la implementación de la TIE	29
1.4.1. Condiciones básicas requeridas para la aplicación de la TIE y ventajas de su aplicación	31
1.4.2. Radiosensibilidad de lepidópteros	33
1.4.3. Esterilidad Heredada (EH)	35
1.4.4. Efecto de la RI sobre el esperma	37
1.4.5. Identificación de insectos irradiados	38
1.5. Hipótesis.....	40
1.6. Objetivos	41
1.6.1. General:	41
1.6.2. Específicos:.....	41
1.7. Finalidad del trabajo.....	41

CAPITULO II	42
DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE RADIACIÓN IONIZANTE INDUCTORA DE ESTERILIDAD HEREDADA EN ADULTOS DE LA POLILLA DEL TOMATE	
<i>Tuta absoluta</i>	42
2.1. INTRODUCCIÓN	42
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.2.1. Procedimiento de obtención de insectos para la realización de los ensayos.....	44
2.2.1.1. I- Condiciones de temperatura óptima para irradiar polillas adultas de ambos sexos.....	47
2.2.1.2. II- Dosis de radiación gamma inductora de esterilidad heredada en insectos adultos de polilla del tomate.	50
2.2.1.2.1. Efecto de los rayos gamma aplicados en machos adultos y esterilidad heredada.....	50
2.2.1.2.2. Efecto de los rayos gamma aplicados en hembras adultas ...	52
2.3. RESULTADOS	52
2.3.1. I- Condiciones de temperatura óptima para irradiar polillas adultas de ambos sexos.....	52
2.3.2. II- Dosis de radiación gamma inductora de esterilidad heredada en insectos adultos de <i>T. absoluta</i>	54
2.3.2.1. Efecto de los rayos gamma aplicados en machos adultos y esterilidad heredada.....	54
2.3.2.2. Efecto de los rayos gamma aplicados en hembras adultas ...	60
2.4. DISCUSIÓN	62
2.5. CONCLUSIÓN	67
CAPÍTULO III	68
SUPRESIÓN POBLACIONAL DE <i>Tuta absoluta</i> A TRAVÉS DEL USO DE ESTERILIDAD HEREDADA.....	68
3.1. INTRODUCCIÓN	68
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	69
3.2.1. I- Evaluación del efecto de la radiación sobre la aptitud de dispersión de machos de <i>T. absoluta</i>	70
3.2.2. II- Evaluación de la supresión de la población plaga de <i>T. absoluta</i> a través de polillas irradiadas y su progenie bajo condiciones controladas	73
3.3. RESULTADOS	75
3.3.1. I- Evaluación del efecto de la radiación sobre la aptitud de dispersión de machos de <i>T. absoluta</i>	75

3.3.2. II- Evaluación de la supresión de la población plaga de <i>T. absoluta</i> a través de polillas irradiadas y su progenie bajo condiciones controladas	76
3.4. DISCUSIÓN	78
3.5. CONCLUSIÓN	81
CAPITULO IV	82
METODOLOGÍAS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE INSECTOS NORMALES, IRRADIADOS Y SU PROGENIE F1 DE <i>Tuta absoluta</i>	82
4.1. INTRODUCCIÓN	82
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	85
4.2.1. Obtención de los insectos e irradiación	85
4.2.2. I- Análisis morfológico de los paquetes de esperma eupireno y de los euespermatozoides de polillas irradiadas en estado adulto y su descendencia F1.....	85
4.2.2.1. Análisis morfológico de los paquetes de esperma eupireno ..	85
4.2.2.2. Análisis morfológico de los euespermatozoides.....	87
4.2.3. II- Análisis del polimorfismo del ADN entre insectos irradiados y no irradiados de <i>Tuta absoluta</i> mediante la técnica de RAPD-PCR	87
4.3. RESULTADOS	90
4.3.1. I- Análisis morfológico de los paquetes de esperma eupireno y de los euespermatozoides de polillas irradiadas en estado adulto y su descendencia F1.....	90
4.3.1.1. Análisis morfológico de los paquetes de esperma eupireno ..	90
4.3.1.2. Análisis morfológico de los euespermatozoides.....	92
4.3.2. II- Análisis del polimorfismo del ADN entre insectos irradiados y no irradiados de <i>Tuta absoluta</i> mediante la técnica de RAPD-PCR	94
4.4. DISCUSIÓN	102
4.5. CONCLUSIÓN	105
CONCLUSIONES GENERALES	106
BIBLIOGRAFÍA	108

ABREVIATURAS

AB: formación de sitios abásicos
ADN: ácido desoxirribonucleico
AFLP: polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
AIC: criterio de información de Akaike
alt-NHEJ: Reparación por recombinación no homóloga alternativa
ANOVA: análisis de varianza
BER: Reparación por escisión de bases
CAE: Centro Atómico Ezeiza
CNEA: Comisión Nacional de Energía Atómica
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMDS: Daños múltiples localizados
DRR: Reversión directa del daño
DSB: Reparación de rotura de doble cadena
EH: Esterilidad Heredada
Gy: Gray
ha: hectárea
HR: Reparación por recombinación homóloga
L:O: Luz:Oscuridad
LSD: diferencia mínima significativa
LP-BER: reparación por escisión de bases de parche largo
min: minutos
MIP: Manejo Integrado de Plagas
MMR: Reparación por apareamiento erróneo
NER: Reparación por escisión de nucleótidos
NEA: Noreste Argentino
NHEJ: Reparación por recombinación no homóloga
NOA: Noroeste Argentino
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PISI: Planta de Irradiación Semi Industrial

RAPD: Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico

RAPD-PCR: Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico - Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RER: Reparación por escisión de ribonucleótidos

RI: radiaciones ionizantes

SAGPyA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

seg : segundos

SNP: polimorfismo de nucleótido único

sp.: especie

spp.: especies

SP- BER: reparación por escisión de bases de parche corto

SSA: reparación por recocido de una sola hebra

SSB: reparación de rotura de simple cadena

SSR: secuencias simples repetidas

t: toneladas

TLS: Reparación translesional

TIE: Técnica del Insecto Estéril

UD: uniformidad de dosis

RESUMEN

La polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), es una plaga originaria de América del Sur y se encuentra distribuida en gran parte de las zonas productoras de tomate (*Solanum lycopersicum* Linnaeus) del mundo. En nuestro país es considerada una de las plagas de mayor importancia económica por los cuantiosos daños que causa. Su control se basa principalmente en el empleo de plaguicidas. El objetivo de esta tesis fue establecer las bases para el desarrollo de la Técnica del Insecto Estéril, mediante el empleo de la Esterilidad Heredada (EH), evaluando el efecto de la radiación gamma sobre la biología de *T. absoluta* cuando se aplica en su estado adulto. Los resultados mostraron que con una dosis de 150 Gy, las hembras resultaron totalmente estériles y los machos parcialmente estériles, resultando su descendencia totalmente estéril, por lo cual, se estableció que esta dosis es la adecuada para lograr la EH. Se constató que los individuos irradiados liberados y sus descendientes son capaces de dispersarse por el cultivo y tienen la calidad adecuada para lograr un significativo nivel de supresión de la población silvestre de *T. absoluta* cuando son liberados en una proporción de al menos 15:1 de individuos irradiados: no tratados. Se estudiaron dos métodos de diferenciación de los insectos salvajes de los irradiados y a su descendencia F1. El análisis de la morfología de los paquetes eupireno y de los euespermatozoides mostró una notoria desorganización de los núcleos del esperma en los insectos irradiados respecto a los controles, la cual es más notable en la F1. Como método alternativo, se establecieron las condiciones básicas para la implementación de una metodología basada en el análisis del polimorfismo genético causado por la irradiación, utilizando la técnica de Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RAPD-PCR). El polimorfismo más notable respecto a los controles se obtuvo utilizando los *primers* OP-H9 y OP-A8. Considerando estos resultados, el análisis del polimorfismo del ADN mediante la técnica RAPD-PCR se propone como el método más adecuado para monitorear la presencia de machos irradiados ulteriormente a la liberación en el campo y evaluar la efectividad de la EH para esta plaga.

ABSTRACT

The tomato moth, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), is a pest native to South America and is distributed in most tomato (*Solanum lycopersicum* Linnaeus) producing areas of the world. In our country it is considered one of the most economically, importance pests due to the considerable damage it causes. Its control is mainly based on the use of pesticides. The objective of this thesis was to establish the basis for the development of the Sterile Insect Technique, using Inherited Sterility (IS), evaluating the effect of gamma radiation on the biology of *T. absoluta* when applied in its adult stage. At a dose of 150 Gy results showed that, females were totally sterile, and males were partially sterile, resulting in totally sterile offspring, thus establishing that this dose is adequate to achieve IS. Released irradiated individuals and their progeny were found to be capable of dispersing throughout the crop and of adequate quality to achieve a significant level of suppression of the wild population of *T. absoluta* when released at a ratio of at least 15:1 irradiated: untreated individuals. Two methods of differentiation of wild type from irradiated insects and their F1 offspring were studied. The analysis of the morphology of the eupyrene packages and euspermatozoa showed a notorious disorganization of the sperm nuclei in irradiated insects with respect to controls, which is more noticeable in the F1. As an alternative method, the basic conditions were established for the application of a methodology based on the analysis of genetic polymorphism caused by irradiation, using the Random Amplification of Polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) technique. The most notable polymorphism with respect to the controls was obtained using primers OP-H9 and OP-A8. Considering these results, DNA polymorphism analysis using the RAPD-PCR technique is proposed as the most appropriate method to monitor the presence of irradiated males after field release and to evaluate the efficacy of IS for this pest.

CAPÍTULO I

INTRODUCCION GENERAL

1.1. Importancia económica del cultivo de tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* Linnaeus) es una planta nativa de América del Sur, originaria de la región andina del noroeste de Sudamérica, donde su domesticación data de hace más de 5.000 años. Fue introducido a México y luego, vía España, a Europa por los conquistadores españoles, aproximadamente entre 1540-1550 (López Piñero y López Terrada, 1997).

Es la segunda hortaliza cultivada en el mundo y en la Argentina, 17.000 ha de las 540.000 que se siembran con hortalizas se dedican al cultivo del tomate, siendo la especie más cultivada en invernadero (Fernández Lozano, 2006).

El mercado del tomate en Argentina, se divide principalmente en tomate para consumo fresco y tomate para industria (conservas y otros productos). La producción promedio anual de los últimos años se ubica en torno a 1.100.000 t, de las cuales, aproximadamente un 60-70% se destina a mercado para consumo en fresco y un 30-40% para industria (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía, 2023).

Las principales zonas productoras de tomate para consumo fresco son las provincias de Mendoza y San Juan (región Cuyo), Salta y Jujuy (región Noroeste Argentino (NOA)), Corrientes y Formosa (región Noreste Argentino (NEA)), Río Negro y Buenos Aires, provincia en la cual se destacan los cinturones hortícolas de La Plata y Mar del Plata. La producción alcanzó unas 767.000 t con una superficie cultivada aproximada de 11.800 ha, en la campaña 2021/2022 (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía, 2023).

Dentro de las principales zonas productoras de tomate para industria se encuentran las provincias de Mendoza y San Juan (84%), Salta y Jujuy (10%), La Rioja (4%) y Río Negro (2%) ocupando una superficie de 7.645 ha con una producción de 626.000 t en la campaña 2021/2022 (Asociación Tomate 2000, 2021).

A nivel mundial, la producción alcanza los 189.000.000 de toneladas. Los principales países productores son China, India y Turquía. Sin embargo, los principales exportadores de tomate fresco son México, Países Bajos e Irán, mientras que entre los importadores se destacan Estados Unidos, Alemania y Francia. El mercado exportador de tomate para industria es liderado por Italia, China, España y Estados Unidos, siendo China, Estados Unidos, Turquía, India y Egipto los principales productores (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía 2023).

Actualmente, la tendencia mundial de consumo de tomate se está incrementando debido a la toma de conciencia de sus propiedades beneficiosas para la salud. Forma parte de la dieta mediterránea junto al vino y el aceite de oliva. El tomate posee un alto contenido en potasio y otros minerales, vitamina C, ácido fólico y un potente antioxidante que es el licopeno (Espinosa Cuascota, 2023).

1.2. *Tuta absoluta* como plaga del cultivo del tomate y su distribución nacional e internacional

El cultivo de tomate es extremadamente susceptible al ataque de enfermedades como la mancha negra, la podredumbre gris, el mildiú, fusarium, y plagas que atacan a la planta como: moscas blancas (*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius)), pulgones (*Myzus persicae* (Sulzer), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) y *Aphis gossypii* (Glover)), trips (*Frankliniella occidentalis* (Pergande), ácaros (*Tetranychus urticae* (Koch), *Tetranychus turkestanii* (Ugarov & Nikolskii), *Aculops lycopersis* (Massee)), minadores (*Liriomyza huidobrensis* (Blanchard)) y taladros (*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae).

Una de las plagas más importantes es *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (polilla del tomate), especie que puede atacar a la planta en cualquier etapa del desarrollo (desde el almácigo hasta la cosecha).

Desde la década de los sesenta, *T. absoluta* se ha convertido en plaga clave del cultivo de tomate en varios países de América del Sur. Además de la Argentina, está presente en Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (Instituto Agronómico Nacional y

Agencia de Cooperación Internacional de Japón (IAN y JICA), 1994), siendo uno de los principales factores limitantes para la producción de tomates (Ferrara *et al.*, 2001). En Perú, apareció en la década de los cincuenta, atacando con intensidad cultivos de papa sembrados después de tomate o colindantes a cultivos de tomate (Campos, 1976). En la década de los sesenta, se introdujo en Chile desde el Perú, posiblemente por la región de Arica, causando pérdidas importantes de rendimiento en cultivos de tomate en la zona comprendida entre Arica y Santiago (González, 1989). En Uruguay apareció en la década del setenta (Betancourt y Scatoni, 1995). En Brasil fue registrada por primera vez en 1980, en el estado de San Pablo y en el litoral del estado de Paraná (Muszynski *et al.*, 1982). En pocos años se diseminó rápidamente por los estados de Bahía (Haji *et al.*, 1988), Espíritu Santo (Scardini *et al.*, 1982), Rio de Janeiro (Oliveira *et al.*, 1983), Minas Gerais (Souza y Reis, 1986), Pernambuco y Brasilia -DF (Souza *et al.*, 1983). También apareció en Paraguay a partir de 1987, en zonas tomateras como Coronel Oviedo, Posta Ybicuá y Caacupé (IAN y JICA, 1994).

En la Argentina, habría sido introducida a la provincia de Mendoza en abril de 1964 a través de una importación de frutos desde Chile (Bahamondes *et al.*, 1969). Desde 1966, se extendió por todas las zonas productoras de tomate a través de la comercialización de los frutos. En 1967, se comprobó su existencia en las provincias de Salta, Jujuy (Benavent *et al.*, 1978) y en 1976 ya se encontraba difundida en los alrededores de Buenos Aires, NOA (Tucumán, Salta y Jujuy), La Rioja, San Juan y norte de Mendoza, Santa Fe y Misiones (Bimboni, 1977). Pocos años después, su presencia fue detectada en San Juan, Córdoba y Misiones (Lietti, 2002), en el cinturón hortícola de La Plata, Corrientes (Cáceres, 1992) y en la zona hortícola de Santa Fe (Bouzo *et al.*, 2005). De esta forma, se ha convertido en una de las principales plagas en los invernaderos de Argentina (Botto, 2011) y Chile (Estay, 2000). Sin controles adecuados, el ataque de esta polilla puede resultar en una pérdida de la producción del 90 al 100% (Torres *et al.*, 2001).

Además de la planta de tomate, este insecto tiene otras especies hospederas como, la papa, *Solanum tuberosum* L., la berenjena, *Solanum melongena* L., el pepino dulce, *Solanum muricatum* L. y, en menor grado, el tabaco, *Nicotiana tabacum* L. (Mallea *et al.*, 1972). También puede hospedarse

en malezas solanáceas como, el tomatillo, *Lycium chilense* Bert., hierba mora, *Solanum nigrum* L. y, garramoño, *Datura stramonium* L. (Estay, 2001), entre otras (Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO), 2009). Otros estudios muestran que *T. absoluta* puede utilizar, revienta caballos, *Solanum elaeagnifolium* Cav., como hospedera alternativa (Cardozo *et al.*, 1994). Goldenberry, *Physalis peruviana* L., poroto, *Phaseolus vulgaris* L., *Malva sp.* y *Lycium sp.* han sido reportados como hospederas para *T. absoluta* en Italia (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MPAAF), 2009 y, correhuela, *Convolvulus arvensis* L. y, yuyo colorado, *Chenopodium album* L. en Turquía (Portakaldali *et al.*, 2013).

Dada su importancia, en nuestro país ha sido declarada “Plaga Nacional de la Agricultura” (disposición N°285/69 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación (SAGPyA)) y, por lo tanto, de control obligatorio.

En Europa, la presencia de *T. absoluta* se informó por primera vez en España en 2006, al norte de la provincia de Castellón (Desneux *et al.*, 2010) esparciéndose rápidamente por varios países de Europa como Albania, Bulgaria, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Italia, Lituania, Holanda, Portugal, Suiza, Reino Unido y otros. En el norte de África, la especie se detectó en 2008 en Argelia (Guenauoui y Ghelamallah, 2008), Marruecos (EPPO, 2008), Túnez (EPPO, 2009), Egipto, Libia, y Sudán. También en otros países de Medio Oriente como Chipre, Irak, Israel, Jordania, Arabia Saudita, etcétera. (Desneux *et al.*, 2011). Actualmente, la polilla del tomate se reporta también en India y Nepal (Bajracharya *et al.*, 2016).

1.2.1. Morfología de *Tuta absoluta*

Tuta absoluta fue originalmente descrita como *Phthorimaea absoluta* (Meyrick) a partir de un macho adulto recolectado en Huancayo, Perú, a 3.246 m de altitud por el entomólogo inglés E. Meyrick en 1917 (Meyrick, 1917; López, 2003). El género fue reemplazado por *Gnorimoschema* en 1962, y por *Scrobipalpula* en 1964. En 1987, se colocó en un nuevo género,

Scrobipalpuloides y finalmente, en 1994, Povolny le dio el nombre actual a la especie, *T. absoluta*.

El desarrollo de *T. absoluta* involucra distintos estados: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1.1 a-b-c-d). Los huevos son de forma ovalada, de 0,38 mm de largo y 0,21 de ancho (Vargas, 1970). Recién puestos son de color blanco, y en su proceso de maduración cambian a color amarillo y amarillo anaranjado (Estay, 2000), hasta llegar a una tonalidad oscura donde se puede ver el contorno negro de la cápsula cefálica a través del corion (Germain *et al.*, 2009).

La larva del primer estadio es de color blancuzca con la cabeza oscura. Cuando pasa del segundo al cuarto estadio, el color cambia de verde a verde rosado (Ramel y Oudard, 2008). El primer estadio mide 1,6 mm, el segundo 2,8, el tercero 4,7 y el cuarto estadio 7,7. Todos los estadios larvales muestran una línea dorsal rojiza a nivel del pronoto (Lebdi-Grissa *et al.*, 2010).

Las pupas recién formadas son de color verde claro, mientras que las más maduras son de color marrón oscuro (Sannino y Espinosa, 2010). Las pupas masculinas son más livianas ($3,04 \pm 0,49$ mg) y más pequeñas ($4,27 \pm 0,24$ mm de largo y $1,23 \pm 0,08$ mm de ancho) que las de las hembras ($4,67 \pm 0,23$ mg de peso, $4,67 \pm 0,23$ mm de largo y $1,37 \pm 0,07$ mm de ancho) (Fernández y Montagne, 1990).

Los adultos miden entre 5 y 7 mm de largo y tienen una envergadura alar de 10 mm. No presentan dimorfismo sexual evidente, aunque el abdomen de los machos adultos suele ser más estrecho y afinado, mientras que el de las hembras es más amplio y voluminoso (Desneux *et al.*, 2010). Los machos presentan en el abdomen escamas de color gris, que en las hembras son de color beige. Las antenas son largas y filiformes (Vargas, 1970). Las alas tienen flecos y el par anterior posee manchas negras. La disposición de los flecos en las alas difiere entre las anteriores y las posteriores; presentando los anteriores plumajes en la mitad distal mientras que todo el contorno de las alas posteriores se presenta emplumado (Sannino y Espinosa, 2010).

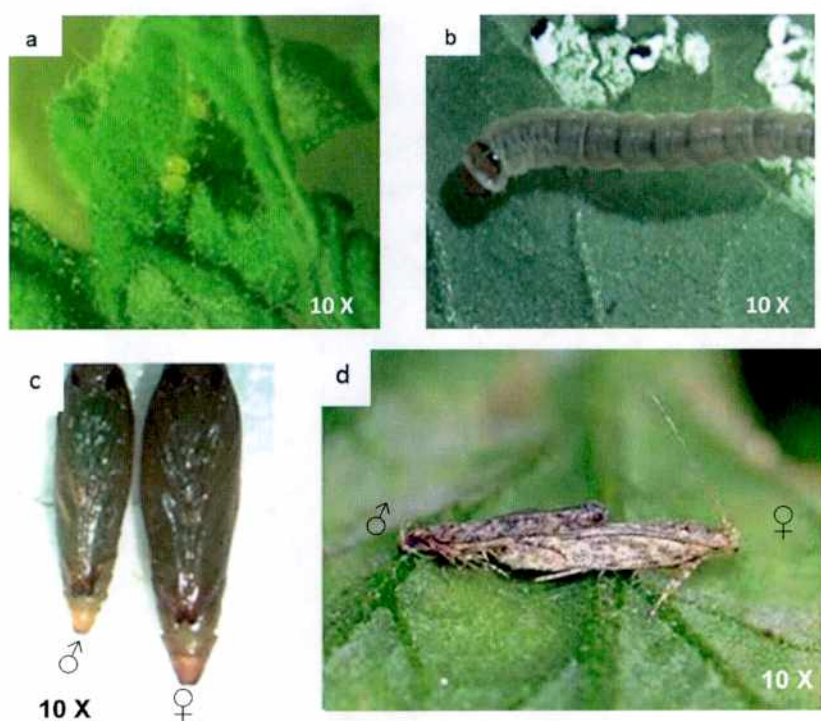


Figura 1.1. Estados de *Tuta absoluta*. a- Huevos; b- Larva; c- Pupas; d- Adultos.
MVYusef

1.2.2. Biología de *Tuta absoluta*

T. absoluta es una especie multivoltina y pueden llegar a desarrollarse de diez a doce generaciones por año siendo la relación de machos/hembras de/1,33 (Fernández y Montagne, 1990).

La duración de su ciclo de vida depende de las condiciones ambientales, especialmente de la temperatura (Tropea Garzia *et al.*, 2012). Barrientos (1997) señaló que el ciclo biológico puede durar 76,3 días a 14 °C. Guenaoui y Ghelamallah (2008) demostraron que el ciclo biológico de esta plaga puede completarse en 3 semanas en regiones mediterráneas a 27 °C. Krechmer y Foerster (2015) demostraron que las bajas temperaturas prolongan el desarrollo de *T. absoluta*, que puede tardar 4 meses a 10 °C. Cuthbertson *et al.* (2013) indicaron que el desarrollo de los insectos es óptimo cuando la temperatura varía entre 19 y 23 °C.

Este insecto pasa el invierno en estado de huevo, pupa o adulto (Barrientos, 1997); en la etapa larval *T. absoluta* no entra en diapausa mientras posea alimento disponible.

La larva del primer estadio se alimenta de los tejidos ubicados entre las dos epidermis de la hoja, formando galerías donde pueden observarse los excrementos que genera. También puede salir de la galería buscando nuevos sitios de alimentación y atacar el fruto (Tropea Garzia *et al.*, 2012). Las larvas del cuarto estadio forman un hilo por donde se dejan caer para pupar o pueden hacerlo en el interior de las galerías (Ferguson y Shipp, 1994).

Poco tiempo después de la emergencia, los adultos pueden aparearse (Uchoa-Fernandes *et al.*, 1995). Los machos adultos y las hembras viven entre 26,4 y 23,8 días, respectivamente (Fernández y Montagne, 1990). En ausencia de apareamiento, la longevidad de los adultos se prolonga (Tropea Garzia *et al.*, 2012).

En el laboratorio, la duración del apareamiento varía desde unos pocos minutos hasta 6 h 40 min, la mayoría de los huevos son puestos durante la noche y el mayor porcentaje es depositado durante el mismo día del apareamiento (Lee *et al.*, 2014). Cada hembra puede poner de 40 a 229 huevos en el envés de las hojas, en tallos jóvenes y tiernos, y en sépalos de frutos inmaduros (Gomide *et al.*, 2001).

1.2.3. Control de *Tuta absoluta*

El manejo de la polilla del tomate se basa principalmente en el empleo de productos químicos cuyo uso continuo perjudica a los organismos que no son el blanco propuesto y al ambiente (Landgren *et al.*, 2009). Esta práctica no responde a las actuales exigencias de una producción con bajo nivel de contaminantes y, por otro lado, ha provocado la aparición de fenómenos de resistencia a varios principios activos (Lietti *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2023), y el surgimiento de otras plagas como los ácaros (García y Espul, 1982).

La toma de conciencia del impacto para la salud y el medio ambiente provocado por el uso intensivo de plaguicidas impulsó el desarrollo del Manejo Integrado de Plagas (MIP). Este radica en la minuciosa consideración de todas

las técnicas disponibles para combatirlas y la posterior integración de medidas apropiadas que disminuyan su desarrollo. El MIP combina estrategias y prácticas culturales específicas de control biológico, químico, físico y agrícola para producir cultivos sanos y minimizar la utilización de plaguicidas, mitigando o reduciendo al mínimo los riesgos que plantean estos productos para la salud humana y el medio ambiente (World Health Organization (WHO), 2016). Una alternativa dentro del MIP es la Técnica del Insecto Estéril (TIE) que contribuye a minimizar los riesgos mencionados.

1.2.4. Control Genético: Técnica del Insecto Estéril

Los lepidópteros incluyen plagas de insectos clave, que requieren de intervención para evitar pérdidas significativas en muchos sistemas de cultivos, en regiones templadas, subtropicales y tropicales del mundo (Vreysen *et al.*, 2016; Ruiz Galván, 2022). Existen muchas opciones de control, pero algunas tienen problemas de costo y eficiencia. La Técnica del Insecto Estéril (TIE), sería una táctica de control adicional, que tiene un gran potencial para la supresión o erradicación de plagas clave de lepidópteros. Hay muchos ejemplos exitosos de la integración de la TIE en programas en grandes áreas contra lepidópteros (Bloem *et al.*, 2005).

La TIE se basa en la cría masiva de insectos de la especie plaga, su esterilización con radiaciones ionizantes (RI) (generalmente utilizando el ^{60}Co como fuente radiactiva) y la liberación de un número suficiente de insectos, de manera que se apareen con la población salvaje, dejando descendencia estéril o semiestéril. En la práctica, las estrategias de control químico, biológico y cultural son empleadas comúnmente en los programas integrados de gran escala, previamente a la aplicación de la TIE con el fin de lograr niveles de población adecuados que faciliten su uso eficiente (Rull Gabayet, 1997).

1.3. Conceptos básicos sobre los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes

1.3.1. Clasificación de las radiaciones

Las radiaciones pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: las electromagnéticas y las corpusculares. A su vez, de acuerdo con su energía, las electromagnéticas pueden ser no ionizantes o ionizantes de acuerdo con su energía. Las no ionizantes comprenden un amplio espectro que abarca desde las ondas de radiodifusión, infrarrojas, luz visible, hasta las ultravioletas, mientras que las ionizantes son de mayor energía y menor longitud de onda (rayos X y gamma).

Las radiaciones corpusculares están asociadas a una masa (partículas alfa, electrones, protones u otros iones y neutrones) y también son consideradas ionizantes. En la Figura 1.2 se representa el espectro de las radiaciones electromagnéticas.

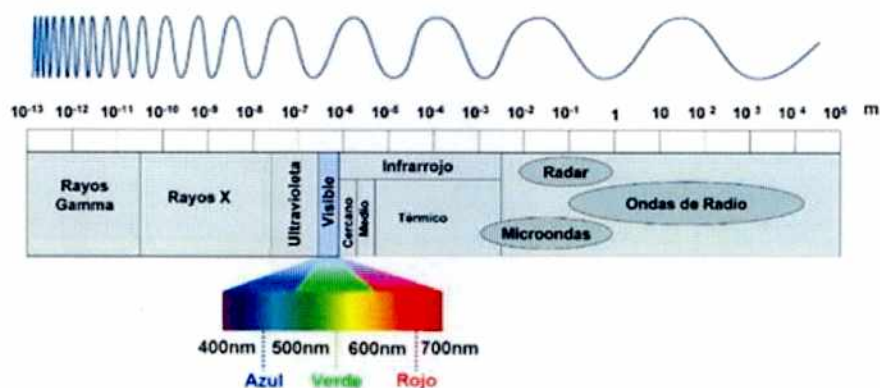


Figura 1.2. Espectro electromagnético. La longitud de onda está expresada en metros y el detalle de la luz visible expresado en nm.

https://uapas1.bunam.unam.mx/ciencias/efecto_doppler/

La interacción de la radiación con la materia genera, inicialmente, una serie de fenómenos donde los eventos primarios son excitaciones e ionizaciones de los átomos y moléculas. A continuación, la formación de especies químicas muy reactivas como los radicales libres, fundamentalmente los derivados de la radiólisis del agua, entre ellos, los radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$) altamente oxidantes, los radicales del hidrógeno ($\bullet\text{H}$), y los electrones

acuosa (e_{aq}), con gran poder reductor son los principales responsables de los daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN).

El efecto biológico final depende de variables físicas, como la dosis absorbida, cuya unidad es el Gray (Gy), que representa la energía depositada (dE) por unidad de masa (dm) según la ecuación, $D = dE / dm$ se expresa en joule/kilogramo ($J \cdot kg^{-1}$). Además de la dosis, influyen la tasa de dosis (dosis absorbida/unidad de tiempo, en Gy/min, y sus múltiplos y submúltiplos), el esquema de irradiación (única o fraccionada) y la calidad de la radiación (electromagnética o corpuscular). También influyen variables biológicas fundamentales, como los mecanismos de reparación celular, la etapa del ciclo celular, el tipo de tejido irradiado y la etapa de desarrollo en la que se encuentra el individuo, entre otros factores.

1.3.2. Mecanismo de acción de las radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes (RI) actúan sobre las moléculas de importancia biológica, principalmente sobre el ADN nuclear, sobre las membranas y sobre otros componentes celulares a través de dos mecanismos diferentes: por efecto directo y por efecto indirecto (Figura 1.3).

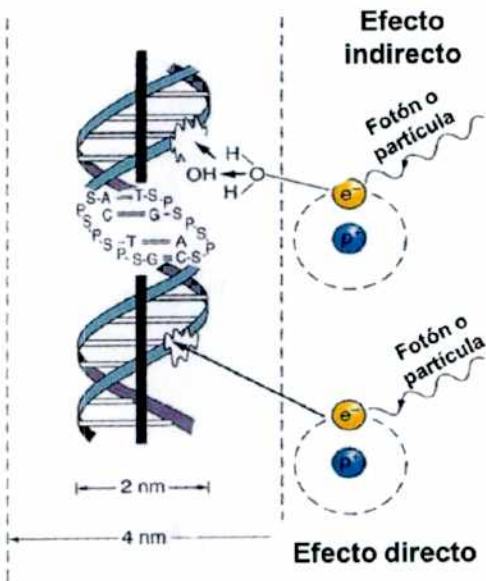


Figura 1.3. Mecanismo de acción de la radiación ionizante por efecto directo e indirecto, sobre la molécula de ADN (Hall y Giaccia, 2012).

En el efecto directo, la radiación ya sean fotones o partículas (los fotones ponen en movimiento electrones) interactúan directamente con la molécula blanco, en cambio en el efecto indirecto es un radical libre, principalmente generado por la radiólisis del agua, el que interactúa con dicho blanco.

Los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los azúcares forman parte del conjunto de macromoléculas que constituyen una célula. Entre ellas, como se expresó previamente, el ADN posee una fundamental importancia por ser el responsable de mantener y transmitir fielmente a sus descendientes las características genéticas de un individuo o de una célula.

Todo cambio en su estructura ya sea inducido por agentes físicos como las radiaciones o químicos, que no es correctamente reparado, puede conducir a mutaciones, inestabilidad génica, transformación maligna e incapacidad de reproducción y/o muerte celular (Hall y Giaccia, 2012).

1.3.3. Lesiones inducidas en el ADN por las radiaciones ionizantes

Las especies reactivas, principalmente del oxígeno y del nitrógeno, ya sean producidas por el metabolismo normal o por la radiólisis del agua, pueden inducir alteraciones en todos los componentes celulares. El número de lesiones inducidas habitualmente *in vivo* en el ADN, solamente por las especies activas del oxígeno, ha sido estimado desde algunas centenas hasta aproximadamente $4 \cdot 10^3$ por célula y por día, mientras que el número total de daños en cada célula llegaría a 10^5 (Hoeijmakers, 2009).

La radiación puede generar alteraciones como: modificaciones químicas de bases purínicas y pirimidínicas, destrucción de azúcares, formación de sitios abásicos, roturas de simple cadena y de doble cadena, así como entrecruzamientos ADN/ADN, ADN/proteínas y daños múltiples localizados (Ward, 1995). Cualitativamente, muchos de ellos son similares a los inducidos por el metabolismo celular, sin embargo, los radioinducidos no tienen las mismas consecuencias biológicas, ya que se producen en gran cantidad y en un lapso muy breve (Polycove y Feinendegen, 2003).

En la Figura 1.4 se representan esquemáticamente algunos de los tipos de daños inducidos sobre la molécula de ADN.

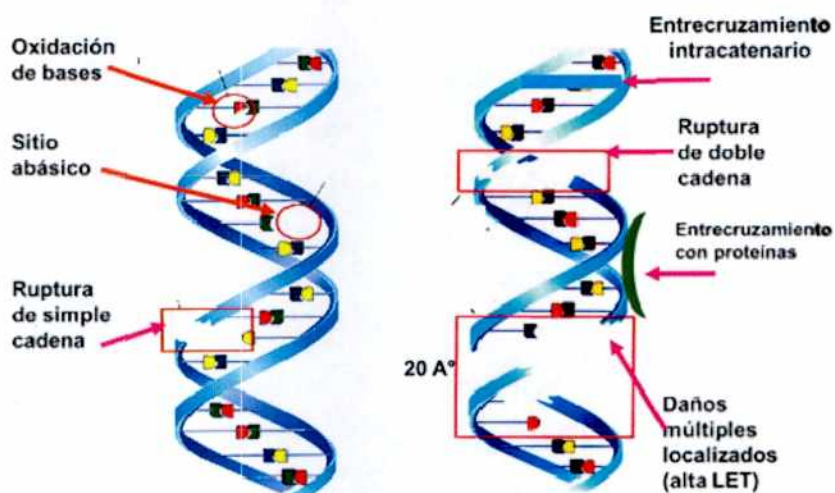


Figura 1.4. Representación esquemática de las alteraciones generadas en la molécula de ADN por la RI.

Formación de sitios abásicos. Además de las modificaciones químicas inducidas en las bases por efecto directo e indirecto de la radiación, también es frecuente la pérdida de estas y, por lo tanto, la formación de sitios abásicos (AB), los cuales son el producto de la rotura de la unión glucosídica entre la base y la desoxirribosa.

La eliminación de una base puede ser generada, entre otras causas, por otros agentes genotóxicos o normalmente como paso intermedio en el mecanismo de reparación de bases mal apareadas.

Roturas de simple cadena (Single Strand Break (SSB)). Las SSB son cortes de la cadena azúcar fosfato producidas ya sea por el propio metabolismo endógeno o por agentes externos. Pueden ser generadas: a) por acción de radicales libres, b) durante la duplicación del ADN por la intervención de las topoisomerasas que inducen cortes para liberar la torsión de la doble hélice, c) por agentes radiomiméticos, d) como resultado de interacciones directas con las radiaciones ionizantes, entre otras causas.

Son las lesiones más frecuentes producidas por la acción indirecta. Se contabilizan aproximadamente 1.000 SSB por célula de mamífero por cada Gy de radiación electromagnética (Hoeijmakers, 2001).

Roturas de doble cadena (Double Strand Break (DSB)). Se denomina DSB al corte de ambas cadenas del ADN dentro de una distancia de algunos nucleótidos. Estas roturas se forman aun en condiciones fisiológicas normales, por ejemplo, durante la recombinación somática, la síntesis de inmunoglobulinas y durante la meiosis.

Las radiaciones electromagnéticas producidas por rayos X y gamma inducen aproximadamente 40 DSB por célula y por Gy en tiempos extremadamente cortos, del orden de los 10^{-15} - 10^{-13} seg. La formación de DSB son determinantes en la letalidad radioinducida (Dikomey *et al.*, 1998).

Las lesiones remanentes luego de la reparación son el origen de aberraciones cromosómicas estables e inestables que pueden contribuir a la transformación neoplásica, a otras patologías, a la muerte celular o no manifestar alteraciones fenotípicas detectables (Pfeiffer *et al.*, 2000).

Entrecruzamientos intracatenarios e intercatenarios. Además de las alteraciones citadas hasta el momento, existe otro tipo de lesiones: los entrecruzamientos ADN-ADN y los entrecruzamientos ADN-proteínas. El primero, además, puede ser dividido en entrecruzamientos intracatenarios (dentro de la misma cadena) e intercatenarios (entre cadenas opuestas).

Los entrecruzamientos ADN-proteínas se forman por una unión covalente entre el nucleótido y una proteína o péptido. Los agentes internos que pueden dar origen a estas alteraciones son, por ejemplo, aldehídos (acetaldehído, formaldehído), los cuales son el producto de varios procesos metabólicos y enzimáticos relacionados con la replicación del ADN.

Por su parte, los radicales generados por la radiólisis del agua pueden dar inicio a otros radicales libres centrados sobre el ADN y sobre los aminoácidos de las proteínas próximas a él, lo cual genera, entrecruzamientos intra e intercadenas de ADN.

Estas lesiones, si no son reparadas, son altamente deletéreas para la célula, pues bloquean los mecanismos de replicación y de transcripción, impidiendo la separación de ambas cadenas del ADN y, además, la accesibilidad de los mecanismos de remodelado de la cromatina (Klages-Mundt y Li, 2017).

Daños múltiples localizados (DMDS). Los DMDS consisten en un conjunto de alteraciones (dos o más lesiones) que se producen simultáneamente, por ejemplo, roturas de simple y doble cadena, formación de sitios abásicos, etc., en una distancia de 10-15 nucleótidos que equivalen a una o dos vueltas de la cadena de ADN. Son característicos de las radiaciones ionizantes y la cantidad y calidad dependen del tipo de radiación.

Debido a su complejidad, los DMDS son muy difíciles de reparar, no solo por su agrupamiento, sino también por la interferencia que se produce entre los mecanismos de reparación que son reclutados en dichos sitios. Por lo tanto, resultan altamente citotóxicos y, en general, conducen a la muerte celular. Si la célula sobrevive, pueden ser el origen de mutaciones ligadas a inestabilidades genéticas susceptibles de desencadenar una neoplasia (Hall y Giaccia, 2012).

Si bien las radiaciones generan alteraciones en el ADN nuclear y mitocondrial, las células poseen distintos sistemas de reparación cuyos mecanismos no serán descritos en este trabajo. Solamente se hará referencia a alguno de ellos que estarían involucrados en la elevada radio resistencia de los lepidópteros.

- 1) Reversión directa del daño (Direct Reversal Repair, (DRR)).
- 2) Reparación por escisión de bases (Base Excision Repair, (BER)) con sus dos alternativas, short patch repair (SP-repair) y long patch repair (LP-repair)).
- 3) Reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair, (NER)) con sus dos alternativas, una acoplada a la transcripción y otra no acoplada a la transcripción.
- 4) Reparación por apareamiento erróneo (Mismatch Repair (MMR)).
- 5) Reparación por escisión de ribonucleótidos (ribonucleotide excision repair (RER)).
- 6) Reparación de rotura de simple cadena (Single Strand Break (SSB)).
- 7) Reparación de rotura de doble cadena (Double Strand Break repair (DSBR)).

Las DSB pueden ser reparadas por diversos mecanismos dependiendo de las características particulares del daño y de la etapa del ciclo celular. Los mecanismos son:

a) Reparación por recombinación no homóloga (Non-homologous DNA end Joining (NHEJ)).

b) Reparación por recombinación no homóloga alternativa (alt-Non-homologous DNA end Joining (alt-NHEJ)).

c) Reparación por recocido de una sola hebra (single strand annealing (SSA)).

d) Reparación por recombinación homóloga (Homologous recombination repair (HR)).

Independientemente de los procesos de reparación citados, determinados daños pueden ser reparados transitoriamente por ADN polimerasas capaces de efectuar un "bypass" de la lesión y continuar con la síntesis de ADN. Este mecanismo es denominado reparación translesional (Trans lesional repair (TLS)).

Por otra parte, se ha demostrado una rápida e inducible capacidad de recuperación de los daños además poseen una capacidad antioxidante muy elevada dadas por la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y otras peroxidasas que le permiten mantener el equilibrio redox aun con altas cantidades de radicales libres debido a la irradiación con altas dosis (Suman *et al.*, 2015).

Finalmente, las modificaciones remanentes sobre la molécula de ADN pueden dar origen a mutaciones cromosómicas estables o inestables. Las primeras pueden perdurar en las células durante la vida del organismo sin manifestaciones genotípicas o fenotípicas, mientras que las segundas conducen a la generación de inestabilidades génicas que son el origen de modificaciones incompatibles con la continuidad de la vida del organismo. Entre estas últimas, las más frecuentes son traslocaciones entre cromosomas, inversiones dentro del mismo cromosoma, deleciones con pérdida de una parte del cromosoma, pérdida de la heterocigosis, aneuploidías, etc. (Little, 2000).

Las deleciones adquieren fundamental importancia en organismos que poseen un solo centrómero por cada cromosoma, pues durante la división meiótica, el fragmento acentromérico no formará parte del ADN de la célula hija.

Como se describirá posteriormente, las alteraciones cromosómicas generadas en los lepidópteros poseen una evolución diferente a la observada en mamíferos durante el proceso de división mitótica y meiótica.

1.3.4. Efectos de las RI sobre células somáticas y germinales

En un organismo existen básicamente dos tipos de células con funciones diferentes, las somáticas y las germinales. Las primeras conforman casi todo el organismo, y las segundas constituyen el grupo de células que generan las gametas. Ambas poseen diferente radiosensibilidad ante una misma calidad de RI, siendo las germinales, en general, más radiosensibles. Otros factores biológicos que afectan la radiosensibilidad son la velocidad de renovación del tejido, el grado de diferenciación, el tipo celular, la etapa del ciclo celular en el momento de la irradiación, la ploidía y la especie, entre otros.

Teniendo en cuenta estos factores, y en especial los que ocurren sobre el sistema reproductor, las RI pueden producir en los insectos los siguientes efectos: aspermia en los machos, infecundidad de las hembras, inactivación del espermatozoide, inhabilidad para copular y mutaciones letales dominantes (LaChance y Graham, 1984).

1.4. Utilización de las RI para la implementación de la Técnica del Insecto estéril (TIE)

Los efectos de la radiación sobre los insectos son conocidos desde hace muchos años. En 1916, Runner demostró que el escarabajo del tabaco *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae), después de ser expuesto a rayos X produce huevos estériles (Runner, 1916). En 1928 Muller comprobó que hembras de *Drosophila* spp. no irradiadas y apareadas con machos irradiados, depositan huevos, pero estos no eclosionan (Muller, 1928). La inducción de esterilidad por irradiación comenzó a utilizarse como método de control, denominado Técnica del Insecto Estéril (TIE), en 1951, cuando Bushland y Hopkins comprobaron que un díptero parásito de los bovinos, el gusano barrenador del ganado *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae), podía ser esterilizado con rayos X (Bushland y Hopkins, 1951).

En el campo entomológico las RI pueden ser utilizadas para inducir letalidad o esterilidad parcial o total en una población, dependiendo de la dosis y de la tasa de dosis. El tipo de radiación empleado, es la radiación electromagnética producida por rayos X o gamma, siendo la radiación gamma, la más utilizada por ser la de menor longitud de onda y, por lo tanto, de mayor penetrabilidad en los tejidos. Además, su costo es relativamente bajo pues, el isótopo utilizado generalmente ^{60}Co , posee una vida media de 5 años aproximadamente.

En la práctica, en los programas integrados para control de plagas, la TIE también puede ser utilizada a continuación de las estrategias de control químico, biológico y cultural, con el fin de lograr niveles de disminución poblacional adecuados que faciliten su implementación (Rull Gabayet, 1997).

Si bien la técnica contempla la liberación exclusiva de machos, por falta de una metodología para el sexado y separación de sexos, en algunas especies se deben irradiar tanto machos como hembras.

Los insectos son más radioresistentes que los vertebrados superiores, pero menos que las bacterias, protozoos y virus. La radiosensibilidad varía ampliamente entre los distintos órdenes de insectos, por ejemplo, algunas especies del orden Orthoptera son esterilizados con dosis tan bajas como 5 Gy, mientras que para esterilizar algunos lepidópteros se requieren más de 300 Gy.

Son más de doscientas especies de insectos de importancia económica de al menos ocho órdenes taxonómicos que han sido irradiados para ser utilizados en el MIP. Al menos el 80% de esas especies pertenecen a solamente tres órdenes: Diptera, Lepidoptera y Coleoptera (Bakri *et al.*, 2005). Como ejemplos, podemos citar que la TIE ha tenido un amplio desarrollo en diversos países para el control de dípteros tales como la mosca de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en Chile, México, Argentina, Australia Guatemala, Perú, Israel, España, Japón, República Dominicana y Estados Unidos (Martín y Enkerlin, 2020), *C. hominivorax* en México y Panamá (Hendrichs *et al.*, 2002), la mosca de la fruta de Queensland, *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae) en Australia (Meats, 1996), la mosca tse-tsé, *Glossina pallidipes* (Austen) (Diptera: Glossinidae) en África (Vreysen, 2006), la mosca del melón, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) en Japón y la mosca de la fruta mexicana, *Anastrepha*

Ludens (Loew) (Diptera: Tephritidae) en México. También, en programas de control y erradicación del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: curculionidae), en Estados Unidos. Como aplicación exitosa de esta técnica contra plagas de lepidópteros, la supresión del gusano rosado del algodón *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Gelechiidae) en el sur de EE.UU. y norte de México, la polilla de la manzana *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) en el valle de Okanagan de la Columbia Británica, Canadá y la falsa polilla de la manzana *Thaumatotibia leucotreta* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) en Eastern y Western Cape, Sudáfrica. Por otra parte, se señala la erradicación de la polilla del cactus *Cactoblastis cactorum* (Berg) (Pyralidae), en dos islas de México y la polilla pintada australiana de la manzana *Teia anartoides* (Walker) (Lymantriidae) en Nueva Zelanda (Marec y Vreysen, 2019).

1.4.1. Condiciones básicas requeridas para la aplicación de la TIE y ventajas de su aplicación

De acuerdo con Knipling (1979), para obtener resultados satisfactorios en la aplicación de la TIE es necesario lograr:

- a) Inducir esterilidad con el mínimo efecto adverso sobre el vigor sexual de los machos.
- b) Reproducir masivamente al insecto a un costo que permita que la supresión de las poblaciones silvestres sea económicamente factible.
- c) Conocer la densidad, dinámica e incremento poblacional de los insectos silvestres.
- d) Conocer la distribución de la población de insectos silvestres para que los insectos irradiados liberados puedan competir por la cópula.
- e) Desarrollar métodos para separar por sexos cuando liberar hembras de la especie sea indeseable.
- f) Niveles bajos de población salvaje, para alcanzar una proporción estéril: fértil adecuada.
- g) Calidad de insectos, en cuanto al comportamiento y competitividad, similares a los individuos silvestres.

- h) Un análisis crítico previo de la especie candidata, incluyendo costos, efectividad y efectos ecológicos y métodos de control alternativos.
- i) Aislamiento del área sometida al tratamiento para prevenir la inmigración de insectos silvestres de otras áreas, especialmente cuando la meta es erradicar.
- j) La TIE debe aplicarse siguiendo el concepto de áreas amplias para evitar que hembras grávidas puedan dispersarse de las áreas no tratadas a las tratadas.
- k) Debe utilizarse como un componente más dentro de un programa de manejo integrado de plagas.

Además, se requiere de una estructura organizacional centralizada, de un esfuerzo coordinado, y de la asociación y participación de los beneficiarios de la tecnología (Liedo *et al.*, 2010).

La TIE está entre los métodos de control de plagas menos perjudiciales en cuanto al impacto sobre el ambiente. A diferencia de otros métodos, presenta ciertas ventajas (Hendrichs *et al.*, 2002). Por ejemplo: es específica, no transfiere agentes tóxicos hacia nuevos ambientes, no introduce nuevo material genético dentro de las poblaciones existentes debido a que los insectos liberados no pueden reproducirse, no tiene efecto sobre organismos benéficos (predadores, parasitoides, polinizadores etc.), entre otras ventajas.

La TIE ha demostrado ser una técnica efectiva en las siguientes circunstancias: 1) cuando las poblaciones de un determinado insecto son naturalmente bajas (ejemplo: la mosca tsé-tsé, *Glossina palpalis* Wiedemann (Diptera: Glossinidae), en el continente africano) (Rull Gabayet, 1997); 2) para controlar y evitar reinfestaciones, como con el gusano barrenador del ganado *C. hominivorax*; 3) para la eliminación de poblaciones incipientes, recién introducidas a un área, antes de que alcancen niveles altos y antes de que las infestaciones se extiendan a grandes áreas, como, por ejemplo, la mosca de la fruta de la carambola, *Bactrocera carambolae* (Drew & Hancock) (Diptera: Tephritidae) en Guayana y Norte de Brasil y finalmente, 4) para evitar desplazamientos de las poblaciones de determinado insecto hacia áreas que nunca antes habían estado infestadas, por ejemplo la mosca de la fruta mexicana *A. ludens* en el Valle de Texas (Estados Unidos) (Klassen *et al.*, 2021).

1.4.2. Radiosensibilidad de lepidópteros

En general, los insectos adultos son al menos cien veces más resistentes a las radiaciones ionizantes que los vertebrados. El rango de dosis para lograr letalidad varía entre 2 y 9 Gy para la mayoría de los mamíferos, y entre 1 y 1000 Gy para los insectos, y se calcula que al menos 600 a 1.000 genes están involucrados en los mecanismos de reparación (Koval 1996). Los lepidópteros poseen varias características citogenéticas y citológicas que los distinguen de otros órdenes de insectos y de mamíferos, las cuales contribuyen a su resistencia a las RI, que puede llegar a ser de tres a diez veces mayor en comparación con dípteros, y cincuenta a cien veces a las células de mamíferos (Koval, 1983).

Las principales características que incrementan la tolerancia a las radiaciones en los lepidópteros son:

1) las hembras son heterogaméticas, es decir, sus cromosomas sexuales son ZW. Los cromosomas homólogos se mantienen unidos formando bivalentes a través del complejo sinaptonémico. La meiosis transcurre sin la formación de quiasmas ni recombinación, hasta la segregación para formar las gametas. Contrariamente, los machos son WW y presentan un curso normal de meiosis, con segregación e intercambio de material genético entre cromosomas (Marec y Vreysen, 2019).

2) los cromosomas de los lepidópteros poseen una estructura de cromosoma holocinético, es decir, no existe una constricción única o centrómero como en otras especies, sino que el cinetocoro cubre gran parte del cromosoma y durante la división celular, los túbulos del huso mitótico se unen a lo largo de todo el cromosoma. Esto contribuye significativamente a la radioresistencia, pues los fragmentos cromosómicos que puedan ser generados por acción de la radiación no se pierden y pasan a formar parte de las gametas, aunque dando origen a traslocaciones, inserciones, etc., que contribuirán a generar alteraciones en la descendencia (Marec y Vreysen, 2019).

Los cromosomas holocinéticos fueron descritos por Federley en 1943 y se contraponen a los cromosomas monocéntricos presentes en la mayoría de los organismos (Federley, 1943). Estos cromosomas están ampliamente representados en los insectos, caracterizando a los ordenes Odonata,

Dermaptera, Zoraptera, Phthiraptera, Psocoptera, Lepidoptera, Trichoptera y Hemiptera (Mola *et al.*, 2011). En la clase Arachnida son distintivos de la familia Buthidae, Dysderoidea y Astigmata. También se encuentran en el Filo Nematoda y en las monocotiledóneas Juncaceae y Cyperaceae.

En la Figura 1.5 se esquematiza la diferencia entre cromosomas monocéntricos y holocinéticos así como el resultado del daño inducido por radiación.

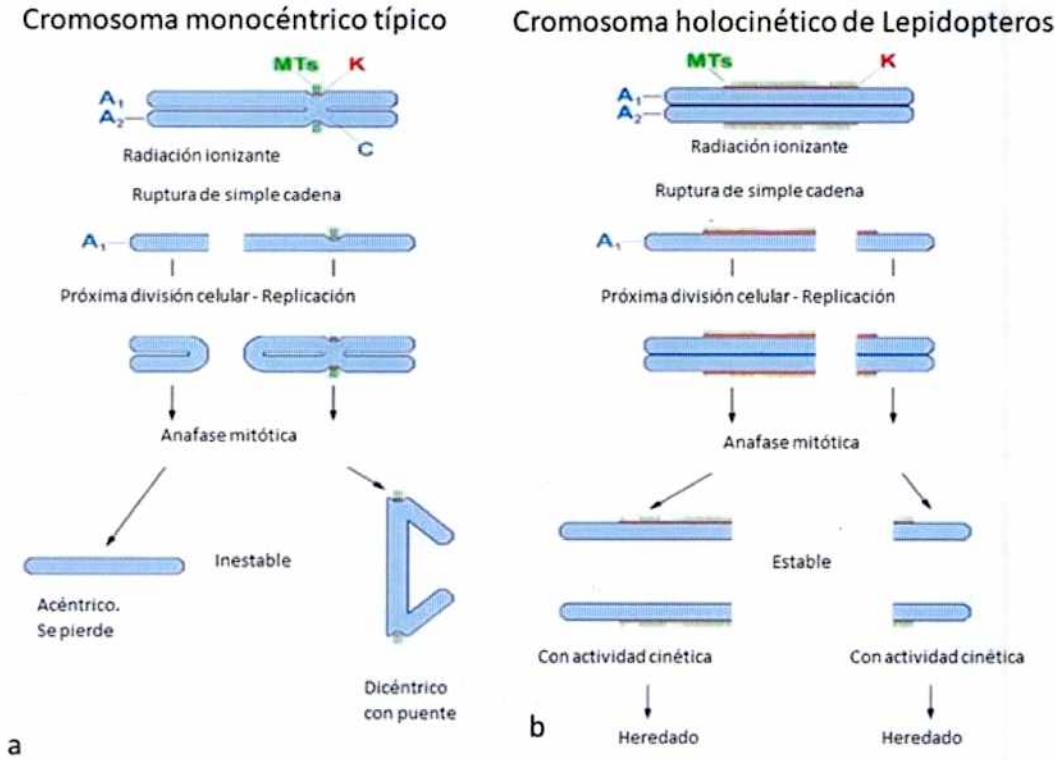


Figura 1.5. Comparación de la estructura de los cromosomas mitóticos holocinéticos y monocéntricos y consecuencias de la rotura cromosómica (a) Cromosoma monocéntrico típico, donde las cromátidas hermanas están unidas en una constricción primaria, el centrómero (C); el cinetocoro (K) se localiza en la superficie del centrómero. (b) Cromosoma holocinético de Lepidoptera con dos cromátidas hermanas (A_1 y A_2), cada una con una gran placa cinetocoro (K) que cubre aproximadamente el 50% de la superficie del cromosoma; los microtúbulos del huso (MT) están unidos al cinetocoro (modificado de Carpenter *et al.*, 2005).

Como se representa en la Figura 1.5, una fragmentación del cromosoma holocinético no es letal para la primera generación. La fragmentación estará representada en las células germinales de la filial 1 como cromosomas totalmente alterados lo cual hará que la descendencia no sea posible (Marec y Vreysen, 2019).

En estos cromosomas, las fibras del huso cromático están unidas al cromosoma en diversos puntos. Esta característica permite que los fragmentos producidos por la radiación no se pierdan durante la división meiótica, pues cada uno de ellos tiene capacidad para adherirse al huso cromático, y por lo tanto pueden ser transmitidas a la progenie.

1.4.3. Esterilidad heredada (EH)

Por las causas antes mencionadas, la aplicación de la TIE para lepidópteros tiende a ser más problemática dada su radioresistencia y, en consecuencia, la mayor dosis necesaria para su esterilización. Esta mayor dosis, puede afectar la competitividad y comportamiento del insecto irradiado que es liberado en el campo.

Knipling postuló un modelo teórico en el cual demostró que dosis subesterilizantes de radiación gamma aplicadas a machos de lepidópteros y cruzados con hembras normales dan como resultado una progenie F1 100% estéril, con la ventaja de que los machos subesterilizados presentarían una mayor competitividad de apareamiento que individuos totalmente estériles (Knipling, 1970). Este método resultó efectivo para reducir los efectos negativos de la radiación en los lepidópteros y consistió en una variación de la TIE denominada Esterilidad Heredada (EH) o Esterilidad F1.

El uso de la EH fue implementado por Proverbs (1962) y, a partir de sus trabajos, esta técnica ha sido utilizada para combatir muchas especies de lepidópteros de importancia económica (Bloem y Carpenter, 2001).

El genoma de los lepidópteros tiene un alto número de cromosomas, de tamaño pequeño y forma esférica (Carpenter *et al.*, 2005). Presentan un número cromosómico haploide cercano a 30, aunque se han observado variaciones de mayor o menor número cromosómico, debidas a procesos de fusión y fisión (Suomalainen, 1969).

Cuando los machos se cruzan con hembras silvestres (no irradiadas), las alteraciones genómicas inducidas por la radiación son heredadas por la F1, la cual posee una esterilidad mayor que sus progenitores (North, 1975). En efecto, cuando en la progenie ocurre la meiosis, las translocaciones recíprocas heredadas pueden ocasionar la formación de células germinales que contienen

un desbalance genómico. Si una de estas gametas fertiliza al huevo, ocurre la muerte del embrión. Esto es lo que se conoce como esterilidad heredada en la F1.

Los lepidópteros hembras son mucho más radiosensibles que los machos (LaChance, 1967). Esta diferencia en la sensibilidad a la radiación está relacionada con el estado de desarrollo de las células reproductivas al momento en que se realiza la irradiación. Esto permite seleccionar una dosis de radiación adecuada para que las hembras irradiadas sean completamente estériles y los machos solo parcialmente estériles.

En lepidópteros, la meiosis en hembras se detiene en la metafase I en los núcleos de los ovocitos maduros y no continúa hasta que los huevos han sido ovipositados, mientras que los machos ya tienen espermatozoides maduros al momento de la irradiación (Traut, 1977). Al ser irradiados, generalmente como pupas maduras o adultos recién emergidos, se genera la disrupción del curso normal de la meiosis en las hembras incluyendo una segregación anormal de los cromosomas y otros daños cromosómicos. Además, se debe considerar que los oocitos tienen una gran cantidad de citoplasma en comparación con los espermatozoides, y las radiaciones pueden alterar componentes citoplasmáticos que modifiquen al ADN, con un consecuente efecto sobre el desarrollo embrionario (Marec y Vreysen, 2019).

La técnica en sí contempla la liberación de los machos parcialmente estériles, pero en algunas especies, por falta de metodologías para el sexado, se deben irradiar tanto machos como hembras. Cuando estos machos parcialmente estériles se aparean con hembras fértiles, la generación F1 hereda muchos de los efectos nocivos inducidos por la radiación. A la dosis adecuada de radiación, la eclosión de los huevos de las hembras apareadas con los machos irradiados reduce y genera individuos F1 estériles y predominantemente machos (Carpenter *et al.*, 2005).

El uso de la EH ha sido investigado irradiando pupas maduras o adultos recién emergidos y de hasta 24 h de edad, resultando exitoso en varias especies de lepidópteros: el Marandová de las solanáceas, *Manduca sexta* (Linnaeus) (Lepidoptera: Sphingidae) (Bartlett y Staten, 2003), la oruga medidora, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (North y Holt, 1969), la isoca de la espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae)

(Carpenter *et al.*, 1987), la polilla de la manzana, *C. pomonella* (Proverbs *et al.*, 1978), la polilla del cactus, *Castoblastis cactarum* (Berg), (Lepidoptera: Pyralidae) (Carpenter *et al.*, 2001), el barrenador africano de la caña de azúcar, *Eldana saccharina* (Walker), (Lepidoptera: Pyralidae) (Walton *et al.*, 2011), el gusano cortador, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (Seth y Sharma., 2001), la falsa polilla de la manzana, *C. leucotreta* (Bloem *et al.*, 2003), la polilla de la harina, *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) (Marec *et al.*, 1999), el gusano rosado del algodón, *P. gossypiella* (Qureshi *et al.*, 1991), el gusano cogollero, *H. armigera* (Pransopon *et al.*, 2000) y la palomilla marrón de la manzana, *Epiphyas postvittana* (Walker), (Lepidoptera: Tortricidae) (Jang *et al.*, 2012).

Groppa (1996) estudió el efecto de distintas dosis de radiación gamma en diferentes etapas de desarrollo de *T. absoluta*, demostrando que el tratamiento de las pupas con 100 Gy provoca esterilidad de las hembras, 300 Gy es letal, y con 150 Gy los machos adultos no dejan descendencia. Estudios similares con radiación gamma aplicada a pupas maduras de *T. absoluta* fueron realizados por Yusef (2014), demostrando que una dosis de 130 Gy y tasa de dosis de 36 Gy/min es conveniente para generar EH en pupas. Cagnotti *et al.* (2012) estudiaron los efectos de diferentes dosis de rayos X en la emergencia, fecundidad y fertilidad de pupas maduras de *T. absoluta*, concluyendo que una dosis equivalente a 200 Gy y tasa de dosis equivalente a 34 Gy/ min, permite generar hembras completamente estériles y machos parcialmente estériles. Por otra parte, Zhou *et al.* (2023) hallaron esterilidad irradiando pupas de *T. absoluta* (48-72 h antes de la emergencia) con radiación gamma con una fuente de ^{137}Ce a una dosis de 300 Gy y tasa de dosis de 1 Gy/min.

1.4.4. Efecto de la radiación sobre el esperma

En Lepidoptera, así como en Diptera, Hymenoptera, Phasmida, Coleoptera y Hemiptera (Jamieson, 1987a), se observa un fenómeno llamado “polimorfismo de esperma”, por el cual los machos de una misma especie producen más de un tipo de esperma (Hayakawa, 2007). En el caso de los dípteros e himenópteros dicho polimorfismo se relaciona con la longitud del

esperma, mientras que en coleópteros y hemípteros la diferencia se observa en el tamaño y en el número de cromosomas (Swallow y Wilkinson, 2002). Los lepidópteros cuentan con dos tipos de esperma, que según su capacidad para fertilizar los huevos se clasifican en fértiles (esperma eupireno nucleado) y no fértiles (esperma apireno anucleado) (Sivinski, 1984).

El esperma apireno se cree que tiene una función nutritiva o está involucrado en la movilidad del esperma eupireno. Este último es el responsable de la fertilización representando alrededor del 10 % de los espermatozoides totales transferidos a la hembra (Cook y Wedell, 1996).

La relación en abundancia entre ambos tipos de esperma se ve alterada por la radiación (Carpenter *et al.*, 2009). Carabajal Paladino *et al.* (2016) analizaron el cariotipo, la morfología espermática y la proporción de esperma en individuos de *T. absoluta* salvajes e irradiados con rayos X. La irradiación de pupas con una dosis de 200 Gy generó diferentes reordenamientos cromosómicos incluyendo translocaciones y fragmentaciones, resultando en alteraciones en el número cromosómico. El análisis de los paquetes de espermatozoides reveló un marcado polimorfismo entre los paquetes de esperma apireno y eupireno. Asimismo, la irradiación generó deformidades en la morfología de los paquetes de esperma eupireno que fue transferido a las *bursae copultrices* de las hembras durante la cópula. Finalmente, una alta dosis (300 Gy) produjo una elevada cantidad de espermatozoides apirenos.

1.4.5. Identificación de insectos irradiados

En los programas de control de plagas, uno de los aspectos más críticos radica en monitorear el progreso antes, durante y después del tratamiento que se lleva a cabo. Cuando se utiliza la TIE, es fundamental distinguir los individuos tratados de los salvajes, para poder evaluar el desempeño de los insectos liberados y el impacto que producen (Vreysen, 2001).

Se han desarrollado diversas técnicas para “marcar” los insectos esterilizados y así poder estudiar su dispersión, abundancia y supervivencia (Schellhorn *et al.*, 2004). Los métodos utilizados incluyen marcajes con

colorantes, análisis de las alteraciones en la proporción de esperma eupireno y apireno y el uso de marcadores genéticos.

En muchos programas que involucran la TIE en dípteros, las pupas esterilizadas son pintadas con polvos fluorescentes, que hacen distinguibles a los adultos que emergen de ellas una vez que son recapturados en la zona de liberación. Al momento de la emergencia el adulto llena con hemolinfa una membrana presente en su cabeza llamada *ptilinum*. Al dilatarla bruscamente, golpea el extremo del pupario hasta romperlo, a fin de permitir su emergencia (Gállego Berenguer, 2006). Cuando las pupas son espolvoreadas con polvo de marcaje, el polvo que está sobre el pupario se transfiere al *ptilinum* durante la emergencia. Una vez finalizada, el *ptilinum* se retrae dejando una cicatriz frontal y, aunque la mayoría del polvo adherido en otras partes del cuerpo se pierde rápidamente, el que se encuentra sobre el *ptilinum* es incorporado en el tejido de la cicatriz y permanece en la cabeza durante toda la vida del insecto (Hagler y Jackson, 2001).

En el caso de los lepidópteros, y en consecuencia de *T. absoluta*, la emergencia no ocurre mediante *ptilinum*, sino mediante la secreción de compuestos químicos que degradan el pupario. Debido a este tipo diferente de emergencia, el método de marcado con polvos no es 100% efectivo, ya que el polvo se adhiere a las escamas, sobre el cuerpo del individuo, pero no se incorpora en ninguna estructura, lo que lo hace poco persistente y susceptible de ser eliminado junto con las escamas por efecto del viento, el agua o el roce entre individuos. Aún más, este procedimiento para identificación de individuos irradiados a campo tiene otras desventajas, entre las que se incluyen un alto costo, riesgo para la salud del ser humano y propensión al error (el colorante puede transferirse de un macho estéril a uno salvaje) (Hagler y Jackson, 2001).

Debido a estos inconvenientes, un método de utilidad para el monitoreo y diferenciación de machos irradiados y salvajes es la realización de preparaciones de testículos de machos capturados a campo durante la aplicación de un proyecto de EH y la detección de paquetes eupirenos deformes que se presentan en una proporción relativamente alta en los individuos irradiados con respecto a los silvestres. El inconveniente que presenta esta técnica es que tiene un uso limitado en polillas muertas en mal estado de conservación (Carpenter *et al.*, 2009).

Por otra parte, en el campo de la Entomología Agrícola, la Técnica de Amplificación del ADN a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction (PCR)) y, en particular, una de sus variantes denominada Polimorfismo derivado de la Amplificación Aleatoria de ADN (Random Amplification of Polimorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR)) (Williams *et al.*, 1990), se ha utilizado en estudios para evaluar la diversidad genética de algunas especies invasoras, tales como el minador de cítricos del género *Phyllocnistis* (Álvarez y Hoy, 2003), la mosca de la fruta, *C. capitata* (Haymer *et al.*, 1997) y la mosca blanca, *B. tabaci* (Hasan, 2006). También ha sido aplicada para la identificación de diversas especies y poblaciones de áfidos (Black *et al.*, 1992) y de dípteros (Ballinger-Crabtree *et al.*, 1992; Kambhampati *et al.*, 1992), entre otros. En base a estos antecedentes, se pensó en implementar esta técnica como método complementario y/o alternativo, pues permitiría obtener un patrón de polimorfismo genético diferente entre los individuos irradiados y no irradiados.

1.5. Hipótesis

En base a los antecedentes citados se plantean las siguientes hipótesis:

1. Existe una dosis óptima de radiación aplicada en el estado adulto, que provoca Esterilidad Heredada en *T. absoluta* y no afecta parámetros biológicos tales como la longevidad y la capacidad de dispersión.
2. Los individuos de *T. absoluta* irradiados con la dosis óptima y su descendencia, como consecuencia de la Esterilidad Heredada, son capaces de reducir una población de polillas sin tratar, bajo condiciones semicontroladas.
3. Las características morfológicas del esperma y el polimorfismo genético permiten diferenciar polillas macho de *T. absoluta* no irradiadas, irradiadas y su progenie.

1.6. Objetivos

1.6.1. General:

Establecer las bases biológicas para el desarrollo de la TIE mediante radiación gamma para el control de la polilla del tomate *T. absoluta*.

1.6.2. Específicos:

- Establecer las condiciones de temperatura adecuada para irradiar polillas adultas de ambos sexos y determinar la dosis de radiación gamma óptima para inducir esterilidad heredada en insectos adultos, con el fin de incrementar la cantidad de individuos disponibles para la aplicación de la TIE.
- Evaluar el desempeño de los insectos irradiados en relación con la supresión de poblaciones silvestres de *T. absoluta* en condiciones semicontroladas.
- .- Identificar los insectos irradiados de acuerdo con las características morfológicas del esperma e implementar la técnica RAPD-PCR como método de diferenciación de insectos irradiados y no irradiados a través del polimorfismo genético de ambos grupos de individuos.-

1.7. Finalidad del trabajo

Disponer de una herramienta de control de *T. absoluta*, amigable con el medio ambiente para ser utilizada en el contexto del Manejo Integrado de Plagas (MIP).

CAPITULO II

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE RADIACIÓN IONIZANTE INDUCTORA DE ESTERILIDAD HEREDADA EN ADULTOS DE LA POLILLA DEL TOMATE *Tuta absoluta*

2.1.INTRODUCCIÓN

En los programas EH contra lepidópteros, las polillas macho y hembra generalmente se liberan en forma simultánea, dado que el procedimiento de separación manual de los sexos es muy laborioso (Kittayapong *et al.*, 2018). Además, no se dispone de métodos de sexado que permitan la liberación de machos únicamente (Vreysen *et al.*, 2016). A diferencia de los dípteros, los lepidópteros poseen una estructura particular de sus cromosomas (holocinéticos) que determina la necesidad de aplicar altas dosis de radiación (350 a 500 Gy) para esterilizar completamente a los machos. Elevadas dosis pueden comprometer el fenotipo y el comportamiento de las polillas estériles debido al daño somático resultante (LaChance, 1985). En este marco, la selección de la dosis a utilizar es clave. En un programa de liberación, las polillas deben ser irradiadas con una dosis que les permita ser competitivas con respecto a las polillas silvestres, para inducir el nivel requerido de esterilidad en la población plaga (Seth y Sharma 2001). Las características importantes que se deben proteger son la capacidad de los machos irradiados de volar, de responder a las polillas hembra a través de las feromonas y de copularlas (Simmons *et al.*, 2010). Las dosis de radiación subesterilizantes para los machos, pero esterilizantes para las hembras, permiten obtener una descendencia F1 totalmente estéril, lo cual da como resultado la supresión de la población de la plaga a través de las sucesivas generaciones (Marec y Vreysen, 2019).

Varios estudios destacaron el gran potencial de la EH para la supresión de varias plagas de lepidópteros (Vreysen *et al.*, 2016). Algunas especies de lepidópteros como la polilla de la manzana, *C. pomonella* irradiada con 100 Gy en Canadá (Bloem *et al.*, 2005), la polilla del cactus, *C. cactorum* con dosis de 200 Gy en Estados Unidos (Marec *et al.*, 2021) y la falsa polilla de la manzana, *T. leucotreta* con dosis de 150 Gy en Sudáfrica (Hofmeyr *et al.*, 2016) son

controladas con esta técnica. Para pupas de *T. absoluta*, Groppo (1996) y Arthur (2004) determinaron el efecto de la radiación gamma encontrando que la esterilidad total de las hembras se alcanzaba con una dosis de 100 Gy, mientras que Yusef (2014) lo observó que una dosis de 130 Gy. Cagnotti *et al.*, (2012), irradiando con rayos X, establecieron la dosis de 200 Gy y Zhou *et al.*, (2023) la dosis de 300 Gy con ^{137}Ce , para generar EH en esta plaga.

Un aspecto importante asociado a la dosis a aplicar, es el estado de desarrollo del insecto y las condiciones ambientales en los que se efectúa la irradiación. Los procedimientos para los programas operativos actuales de aplicación de TIE en lepidópteros se basan en la obtención de polillas adultas, que requieren protocolos optimizados para mantener una alta calidad y bajas tasas de mortalidad de los insectos estériles para su liberación. Esto se debe en parte a que, en muchos sistemas de cría de insectos, las larvas pupan dentro de la dieta y son difíciles de separar. Además, en comparación con sistemas de cría masiva de dípteros, las pupas en procedimientos de cría de lepidópteros tienen una edad fisiológica menos uniforme, que va desde pupas jóvenes a pupas faradas de varios días de edad. Hay reducciones significativas en la calidad de las polillas y las tasas de emergencia al irradiar pupas que están menos desarrolladas que las de edad adecuada para irradiar. De hecho, los trabajos previos realizados por Yusef (2014) evidenciaron que la irradiación de pupas trae aparejada una alta mortalidad en este estado (de alrededor del 50 %) y una baja emergencia de adultos. Si bien hay algunos programas a pequeña escala basados en la irradiación y liberación de pupas, existen importantes obstáculos para que un programa más amplio adopte estos métodos (Simmons *et al.*, 2021). Por ese motivo, una opción deseable es irradiar adultos de hasta un día de edad.

Como se indicó anteriormente, los estudios realizados de EH para la supresión de *T. absoluta* se llevaron a cabo sobre pupas (Groppo, 1996; Arthur, 2004; Yusef, 2014, Cagnotti *et al.*, 2012 y Zhou *et al.*, 2023). No existen antecedentes sobre el efecto de las RI aplicadas en el adulto de la especie.

Otro aspecto para tener en cuenta es el de las condiciones ambientales, fundamentalmente la temperatura, bajo las cuales efectuar el proceso de irradiación. Se ha demostrado que el enfriamiento a una temperatura adecuada permite un manejo de los insectos más eficiente y con baja probabilidad de

deterioro. En el caso de *C. pomonella*, se recolectan adultos en un ambiente de baja temperatura para evitar el deterioro de las alas y el apareamiento, y para reducir el envejecimiento fisiológico (Batiste y Olson, 1973). Los adultos enfriados se manipulan fácilmente para pesarlos, contarlos, sexarlos e irradiarlos. Sin embargo, Bloem *et al.* (1998) descubrieron que el enfriamiento durante demasiado tiempo puede ser perjudicial para los adultos destinados a ser liberados en el campo. En el caso de *T. absoluta*, no se conoce el efecto del enfriamiento y su posterior irradiación en frío sobre parámetros de calidad de las polillas tales como longevidad y tiempo de cópula.

Se plantearon dos objetivos específicos: a) establecer las condiciones de temperatura óptima para irradiar polillas adultas de ambos sexos y b) analizar el efecto de diferentes dosis de radiación gamma sobre la fecundidad, fertilidad, longevidad y proporción sexual de *T. absoluta* en las generaciones parentales y su descendencia.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Procedimiento de obtención de insectos y condiciones de irradiación para la realización de los ensayos

Se estableció una colonia de *T. absoluta*, en el laboratorio de Control de Plagas del Centro Atómico Ezeiza, a partir de polillas de la cría de *T. absoluta* del Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica (IILB), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), CICVyA- INTA Castelar. A esta última cría, mantenida desde 2009, se le incorporan periódicamente individuos traídos del campo.

Las polillas se criaron sobre plantas de tomates (Figura 2.1) bajo condiciones controladas, T: 24 ± 1 °C, HR: $70 \pm 1\%$ y 14:10 (L: O). Se colocaron 200 adultos (100 ♂ y 100 ♀), dentro de una jaula rectangular de vidrio de 70 cm alto x 40 cm largo x 40 cm ancho, cubierta con tela de *voile* (Figura 2.2), con cuatro plantas de tomate con más de ocho hojas cada una y agua azucarada al 15%, que se suministró en bebederos plásticos (recipientes de 5,6 cm alto x 4,1 cm diámetro) con la tapa perforada y una tela absorbente embebida en la solución.

Después de 4 días, las plantas con los desoves (Figura 2.3) se colocaron en jaulas metálicas de 100 cm alto x 80 cm largo x 30 cm ancho, cubiertas con *voile*, para el desarrollo de las larvas. Periódicamente, se agregaron plantas para que las larvas tuvieran alimento a disposición (Figura 2.4).

A los 14 días posoviposición, la mayoría de las larvas en el cuarto estadio se colocaron en bandejas plásticas de 35 cm largo x 20 cm ancho x 10 cm alto, intercalando el material vegetal con papeles absorbentes. Las bandejas, cubiertas con *voile*, fueron colocadas en una cámara Conviron CMP 4030 a T: $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, HR: $60 \pm 1\%$ y 14:10 (L: O) hasta la obtención de pupas (alrededor de 5 días) (Figura 2.5).



Figura 2.1. Plantas de tomate para la cría de *Tuta absoluta* en invernáculo. MVYusef



Figura 2.2 Jaula de cría de *Tuta absoluta*. MVYusef



Figura 2.3. Huevos de *Tuta absoluta* sobre hoja de tomate. MVYusef



Figura 2.4. Plantas y hojas de tomate atacadas con larvas de *Tuta absoluta*. MVYusef



Figura 2.5. Pupas de *Tuta absoluta*. MVYusef

Las irradiaciones se realizaron en la Planta de Irradiación Semi Industrial (PISI) de la CNEA ubicada en el Centro Atómico Ezeiza (CAE). La PISI cuenta con un irradiador panorámico donde la fuente se encuentra en varios lápices radiactivos dispuestos en un plano. Para la irradiación las muestras se colocan frente a la fuente, por lo que la muestra recibe la radiación de un solo lado a la vez. Para mejorar la uniformidad espacial de la dosis, la muestra se gira a 180° después de haber transcurrido la primera mitad del tiempo total de irradiación. Para verificar que la variabilidad de la dosis fuera aceptable se realizó el mapeo de las dosis recibidas en los distintos puntos de la caja a irradiar (Figura 2.7) en el Laboratorio de Dosimetría de Altas Dosis del CAE –CNEA por el personal calificado del sector. Para determinar las regiones de dosis máxima y mínima, se colocaron en el recipiente de la muestra, en un patrón de cuadrícula regular específico, dosímetros de alanina (rango de detección entre 50 Gy y 100 KGy con un error del $\pm 5,32\%$). Por otra parte, se controlaron, monitorearon y documentaron, los valores de todos los parámetros del proceso que pudieran afectar la dosis (tamaño del contenedor, cualquier arreglo específico de las polillas dentro del contenedor, posición del contenedor, tiempo de irradiación, y la velocidad y rotación del contenedor. Se estableció el valor menor del 2% como límite de variación de dosis entre los distintos puntos calculado como uniformidad de dosis, como el cociente entre la dosis máxima y la dosis mínima ($UD = D_{\text{máx}}/D_{\text{mín}}$).

2.2.1.1. I- Condiciones de temperatura óptima para irradiar polillas adultas de ambos sexos

Pupas de *T. absoluta* fueron separadas por sexo. Las hembras se distinguen por la posición de la abertura genital en el octavo y noveno segmento abdominal y el cremáster formando dos lóbulos en el décimo segmento en las hembras (Figura 2.6). En los machos, el poro genital se ubica en el noveno segmento y el orificio anal en el décimo segmento (Coelho y Franca, 1987). Las pupas sexadas se colocaron sobre papeles absorbentes humedecidos dentro de bandejas plásticas de 35 cm de largo x 20 cm de ancho x 10 cm de alto, las cuales fueron mantenidas en cámara de cría a T: $24 \pm 1^\circ\text{C}$, HR: $60 \pm 1\%$ y 14:10 (L: O) hasta la emergencia de los adultos.

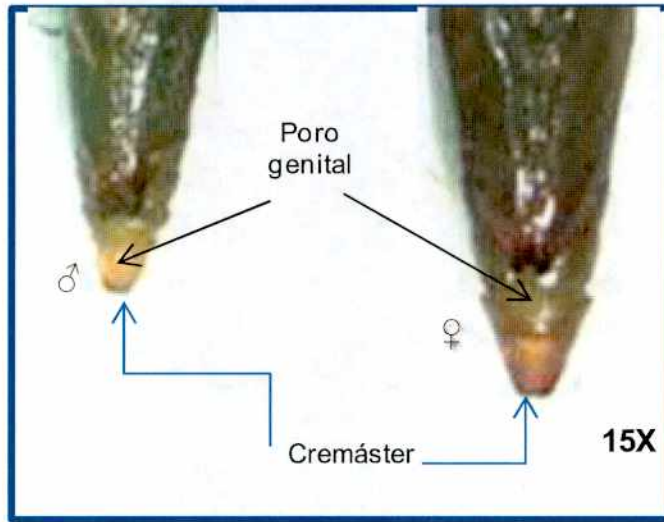


Figura 2.6. Pupas de *Tuta absoluta*, macho (poro genital en el 9° segmento y cremáster) y hembra (poro genital en el 8° segmento y cremáster). MVYusef

Las polillas machos y hembras recién emergidas (< 24 h de edad) se acondicionaron en diez envases cilíndricos (5,5 cm de altura y 4 cm de diámetro) para cada sexo, colocando diez polillas en cada uno. Estos fueron almacenados en una caja de Telgopor (32 cm de largo x 24 cm de ancho x 26 cm de alto) con refrigerantes para alcanzar las temperaturas de 0°C, 2°C y 5 °C durante 6, 4 y 2 h respectivamente (Figura 2.7). Como controles se utilizaron polillas a 24 °C. La irradiación fue realizada con una fuente de ⁶⁰Co, con dosis de 0 (control) y 150 Gy, tasa de dosis de 36 Gy/min y UD: 1.1, seleccionada sobre la base de estudios previos (Yusef, 2014).



Figura 2.7. Caja de Telgopor con refrigerantes utilizada para la irradiación de polillas de *Tuta absoluta* a diferentes temperaturas MVYusef

Luego de la irradiación de las polillas, los insectos se colocaron en envases individuales y fueron apareados con polillas sin irradiar, en un ambiente a 24 °C. En cada una de las parejas establecidas se comprobó en forma visual, si la cópula se hacia efectiva. Producida la cópula, se registró el tiempo del apareamiento desde el comienzo hasta la terminación de la misma.



Figura 2.8. Polillas de *Tuta absoluta* apareándose post irradiación MVYusef

Posteriormente, los insectos apareados fueron colocados en cajas de Petri con papel de filtro humedecido sobre hojas de tomate frescas en cámara de cría a T: $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, HR: $60 \pm 1\%$ y 14:10 (L: O). Diariamente se registró la longevidad de las polillas machos y hembras irradiadas y controles.

Las posibles diferencias en la duración de la cópula y en la longevidad de adultos machos y hembras irradiados con 0 y 150 Gy y enfriados a 0°C , 2°C , 5°C y 24°C , durante la irradiación, se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de tres factores (temperatura, sexo y dosis de irradiación). Se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para la separación de medias cuando se produjeron diferencias significativas ($p < 0,05$) (StatSoft, 2005).

2.2.1.2. II- Dosis de radiación gamma inductora de esterilidad heredada en insectos adultos de polilla del tomate.

2.2.1.2.1. Efecto de los rayos gamma aplicados en machos adultos y evaluación de la esterilidad heredada

Machos de *T. absoluta* de hasta 24 h de emergidos y enfriados a 2°C se irradiaron con 0 Gy, 130 Gy, 150 Gy y 200 Gy con tasa de dosis de 36 Gy/min y UD:1.1. Luego de la irradiación con cada dosis, diez machos irradiados se cruzaron con diez hembras no irradiadas (σ^{I} (irradiados) x σ^{N} (no irradiadas)), estableciéndose de este modo la generación parental (F0). El apareamiento de cada pareja se confirmó mediante observación visual. Posteriormente, cada pareja se colocó individualmente en una jaula cilíndrica de acetato (24,5 cm de alto y 7,5 cm de diámetro) con una gota de miel en las paredes para la alimentación del adulto y una planta de tomate como sustrato de oviposición. La planta se renovó tres veces con un intervalo de 5 días. Las dos primeras plantas fueron cuidadosamente examinadas para contar los huevos puestos por cada hembra durante los primeros 10 días de vida. Este procedimiento garantizó que se registrara aproximadamente el 90% de la fecundidad (Pereyra y Sánchez, 2006). La tercera planta permaneció en la jaula hasta que murieron los adultos, registrándose la longevidad de adultos machos y hembras.

Las plantas con huevos se colocaron individualmente sobre papel absorbente humedecido en un recipiente rectangular de plástico (26 cm de largo x 18 cm de ancho x 5 cm de alto). Después de 7 días, se contaron las larvas F1 y se transfirieron a hojas nuevas de plantas de tomate para permitir su desarrollo hasta el estado de pupa. Estas fueron contabilizadas, se separaron por sexo y se acondicionaron para permitir la emergencia de los adultos.

Para cada dosis se registraron las siguientes variables: a) fecundidad parental (F0) (número de huevos totales/hembra), b) longevidad del adulto F0 (días), c) número de larvas F1/hembra, d) número de pupas F1/ hembra, e) fertilidad F0 (número de larvas F1 / número de huevos) y f) proporción de sexos F1 ($\sigma / (\sigma + \varphi)$).

Para analizar los efectos hereditarios, se utilizaron adultos F1 emergidos para cada una de las dosis de acuerdo con los siguientes cruzamientos: $\sigma IF1 \times \varphi N$ y $\varphi IF1 \times \sigma N$ (donde $\sigma IF1$: macho descendiente de un macho irradiado, σN : macho no irradiado, φN : hembra no irradiada y $\varphi IF1$: hembra descendiente de un macho irradiado). Se realizaron cinco repeticiones para cada cruzamiento. Las parejas se mantuvieron en una planta de tomate en una jaula como se describió anteriormente. La fecundidad F1, la longevidad de adultos F1, el número de larvas F2/hembra, el número de pupas F2/hembra, la fertilidad F1 (número de larvas F2/número de huevos) y la proporción de sexos F2 se registraron para todos los cruzamientos.

Los efectos de las diferentes dosis de radiación sobre la fecundidad y longevidad de la F0, el número de larvas y pupas desarrolladas en la F1, la fecundidad y longevidad de la F1 y el número de larvas y pupas desarrolladas en la F2 se analizaron mediante regresión binomial negativa, utilizando el procedimiento de modelo lineal generalizado del software Statgraphics Centurión XVIII Versión 18.1.12 (StatPoint Technologies, Inc. 1982 – 2011). La fertilidad de la F0 y la F1 y la proporción de sexos en la F1 y en la F2 se analizaron mediante regresión logística con la dosis como variable independiente. La significancia de los parámetros se analizó utilizando el estadístico Wald y el ajuste de los modelos mediante la prueba de razón de verosimilitud (StatSoft, 2005).

2.2.1.2.2. Efecto de los rayos gamma aplicados en hembras adultas

Hembras de *T. absoluta* de hasta 24 h de emergidas y enfriadas a 2°C se irradiaron con 0 Gy, 130 Gy, 150 Gy y 200 Gy, tasa de dosis de 36 Gy/min y uniformidad de dosis (UD): 1.1. Luego de la irradiación fueron cruzadas con machos no irradiados, estableciéndose la generación parental ♀I x ♂N (F0). Se mantuvieron diez parejas para cada dosis (repeticiones) en una planta de tomate en una jaula de acetato cilíndrica como se describió anteriormente. El apareamiento de cada pareja fue confirmado por observación visual.

Se registraron la fecundidad F0, la longevidad F0, el número de larvas F1 y pupas F1/hembras, la fertilidad F0 (número de larvas F1/número de huevos) y la proporción de sexos F1 ($\frac{\text{♂}}{\text{♂} + \text{♀}}$). El efecto de las diferentes dosis de radiación sobre la fecundidad y longevidad de la F0 y el número de larvas y pupas desarrolladas en la F1 fueron analizados por Regresión Binomial Negativa utilizando el procedimiento de modelo lineal generalizado del software Statgraphics Centurión XVIII Versión 18.1.12. La fertilidad F0 y la proporción de sexos en la F1 se analizaron mediante regresión logística con la dosis como variable independiente [StatSoft, 2005]. La significancia de los parámetros se analizó utilizando el estadístico Wald y el ajuste de los modelos mediante la prueba de razón de verosimilitud [StatSoft, 2005].

2.3. RESULTADOS

2.3.1. I- Condiciones de temperatura óptima para irradiar polillas adultas de ambos sexos

No se observaron diferencias significativas en la duración del apareamiento en los insectos sometidos a temperaturas de 2°C y 5 °C que fueron cruzados con polillas sin irradiar con respecto a los controles sometidos a 24 °C, mientras que en las polillas expuestas a 0°C, el tiempo de apareamiento fue menor respecto de los otros tratamientos (temperatura: F3,156: 374,8 p < 0,05). No se observaron diferencias entre sexos y dosis de radiación (sexo: F1,158: 0,10 p > 0,05; dosis de radiación: F1,158: 0,26 p > 0,05)

(Figura 2.8). Las interacciones entre la temperatura y el sexo ($F_{3,158}$: 0,63 $p > 0,05$), entre la temperatura y la dosis de radiación ($F_{3,158}$: 1,29 $p > 0,05$) y entre el sexo y la dosis ($F_{1,158}$: 2,59 $p > 0,05$) no fueron significativas. Finalmente, no se observó interacción entre la temperatura, la dosis y el sexo ($F_{3,158}$: 1,73 $p > 0,05$) (Figura 2.9).

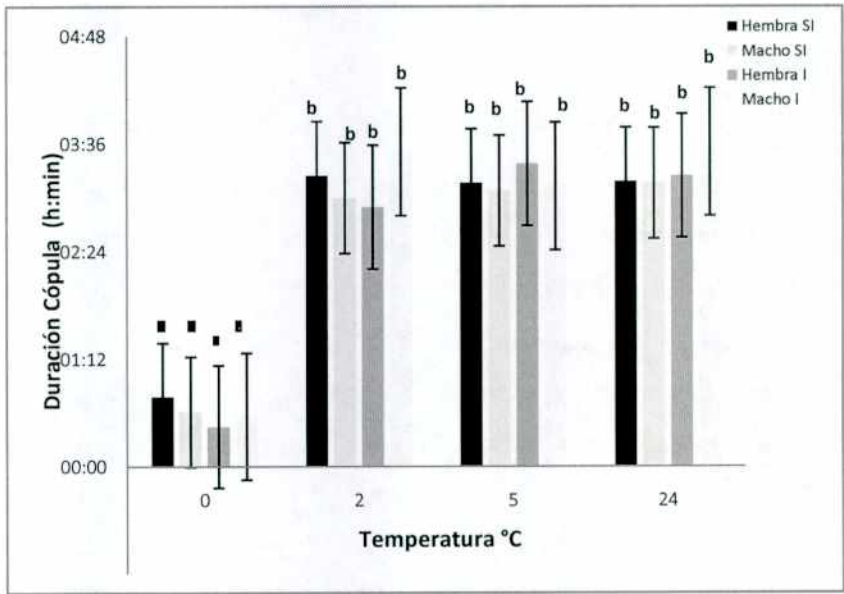


Figura 2.9. Duración de la cópula de polillas de *Tuta absoluta* irradiadas a diferentes temperaturas. (SI: sin irradiar; I: irradiado 150 Gy) (Media $\pm$ ES). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

La longevidad de los insectos irradiados a 2 °C y 5 °C fue similar a la de las polillas que estuvieron a 24 °C; sin embargo, se observó una disminución significativa en las polillas irradiadas a 0 °C (temperatura: $F_{3,156}$: 24,69 $p < 0,05$; sexo: $F_{1,158}$: 0,86 $p > 0,05$; dosis de radiación aplicada: $F_{1,158}$: 0,0034 $p > 0,05$) (Figura 2.10). Las interacciones entre la temperatura y el sexo ($F_{3,158}$: 0,39 $p > 0,05$), entre la temperatura y la dosis de radiación ($F_{3,158}$: 0,38 $p > 0,05$) y entre el sexo y la dosis ($F_{1,158}$: 0,00204 $p > 0,05$) no fueron significativas. Para concluir, no se observó interacción entre la temperatura, la dosis y el sexo ($F_{3,158}$: 0,39 $p > 0,05$).

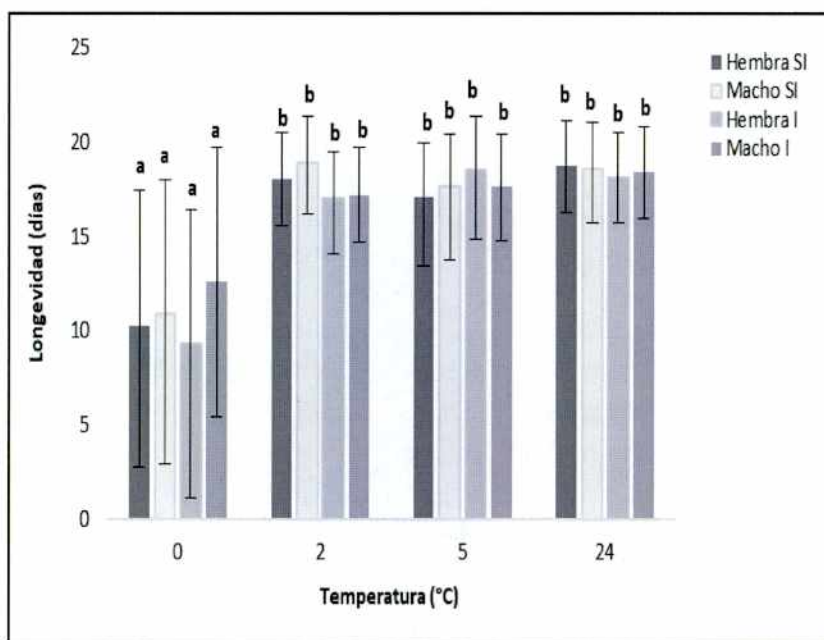


Figura 2.10. Longevidad de polillas de *Tuta absoluta* irradiadas a diferentes temperaturas. (SI: sin irradiar; I: irradiado 150 Gy) (Media $\pm$ ES). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

2.3.2. II- Dosis de radiación gamma inductora de esterilidad heredada en insectos adultos de polilla del tomate.

2.3.2.1. Efecto de los rayos gamma aplicados en machos adultos y esterilidad heredada

La fecundidad de las hembras de *T. absoluta* apareadas con machos irradiados (F0) disminuyó significativamente con la dosis de radiación (Wald = 117,61 $p < 0,05$, χ^2 (1) = 88,17 $p < 0,05$). Se observó el mismo patrón para el número de larvas F1 (Wald = 77,06 $p < 0,05$, χ^2 (1) = 63,05 $p < 0,05$) y pupas F1 (Wald = 86,54 $p < 0,05$, χ^2 (1) = 72,94, $p < 0,05$) (Figuras 2.11 a, b, c).

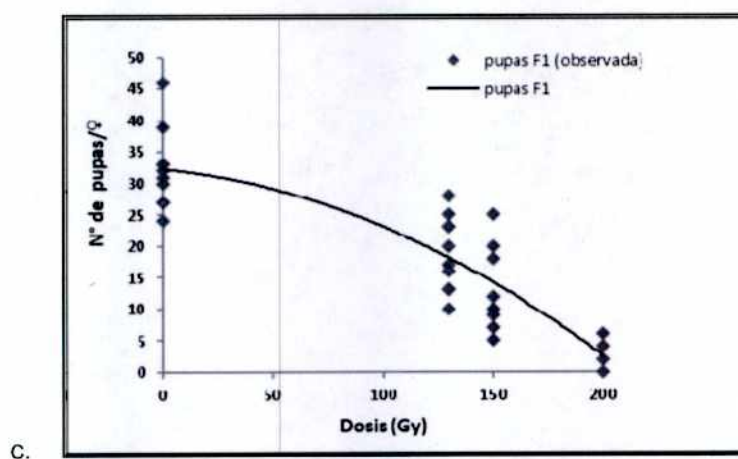
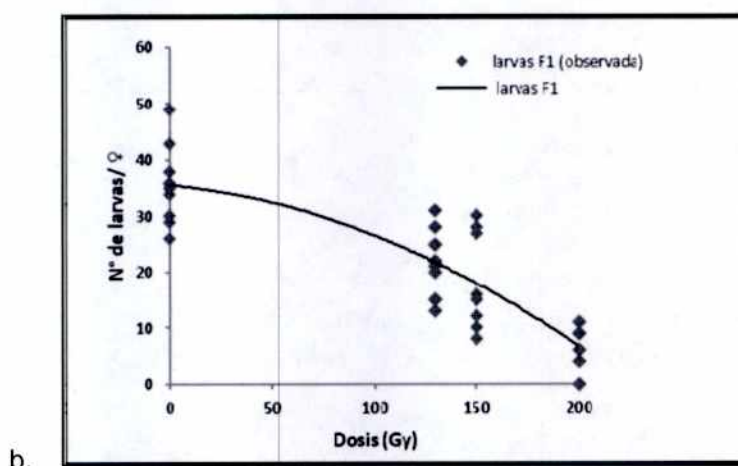
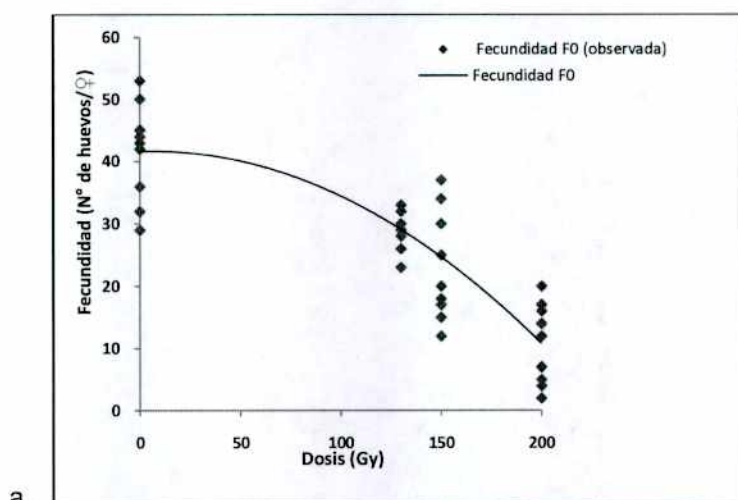


Figura 2.11. Efecto de la radiación sobre: a: fecundidad parental (número de huevos/hembra), b: número de larvas F1/hembra y c: número de pupas F1/hembra cuando los machos de *Tuta absoluta* se irradiaron como adultos y se aparearon con hembras sin tratar.

La fertilidad disminuyó significativamente cuando los adultos machos parentales se irradiaron con dosis crecientes (Wald = 80.16 $p < 0,05$, $\chi^2 (1) = 56.23$ $p < 0,05$) (Figura 2.11).

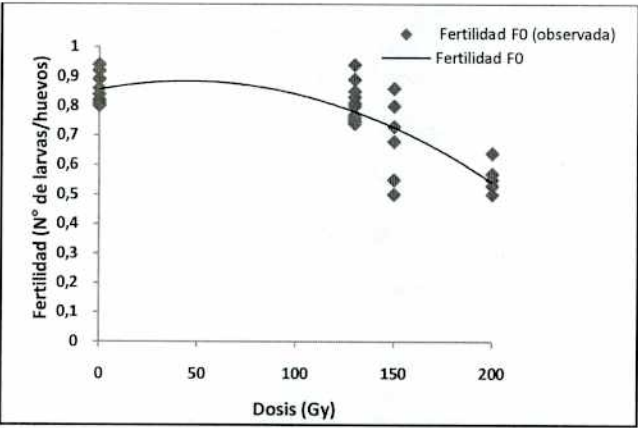


Figura 2.12. Efecto de la radiación sobre la fertilidad parental (número de larvas/número de huevos) cuando los machos de *Tuta absoluta* se irradiaron como adultos y se aparearon con hembras no tratadas.

La longevidad de los machos parentales irradiados no se vio afectada por la dosis aplicada (Wald = 2,21 $p > 0,05$, $\chi^2 (1) = 2,27$ $p > 0,05$). La longevidad media fue de $18,35 \pm 3$ días.

La dosis de radiación tuvo efecto sobre la proporción de machos en la generación F1 (Wald = 11,58 $p < 0,05$, $\chi^2 (1) = 15,19$ $p < 0,05$) incrementando el número de los machos con respecto a la proporción de hembras (Figura 2.13).

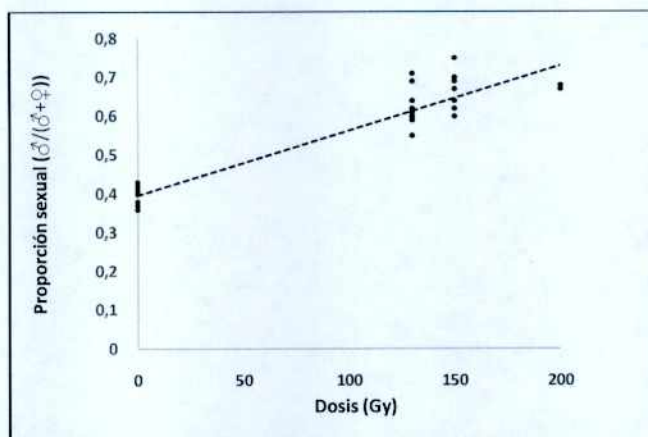


Figura 2.13. Efecto de la radiación sobre la proporción de sexos en la generación F1 de *Tuta absoluta* ($\frac{\sigma}{\sigma+\phi}$) descendiente del cruzamiento entre machos irradiados y hembras no irradiadas (F0)

La fecundidad de los adultos de la F1 apareados con insectos no tratados se vio afectada por la dosis de radiación gamma aplicada a sus padres (Wald = 23,99 $p < 0,05$, $\chi^2(1) = 23,13$ $p < 0,05$), independientemente del cruzamiento realizado ($\sigma F1 \times \phi N$ y $\phi F1 \times \sigma N$) (Wald = 1,32 $p > 0,05$, $\chi^2(1) = 1,33$ $p > 0,05$). El mismo patrón se observó para el número de larvas (dosis: Wald = 23 $p < 0,05$, $\chi^2(1) = 26,10$ $p < 0,05$; tipo de cruzamiento: Wald = 0,076 $p > 0,05$, $\chi^2(1) = 0,077$ $p > 0,05$) y el número de pupas de la generación F2 (dosis: Wald = 21,22 $p < 0,05$, $\chi^2(1) = 26,5$ $p < 0,05$; tipo de cruzamiento: Wald = 0,067 $p > 0,05$, $\chi^2(1) = 0,068$ $p > 0,05$) (Figuras 2.14 a, b, c).

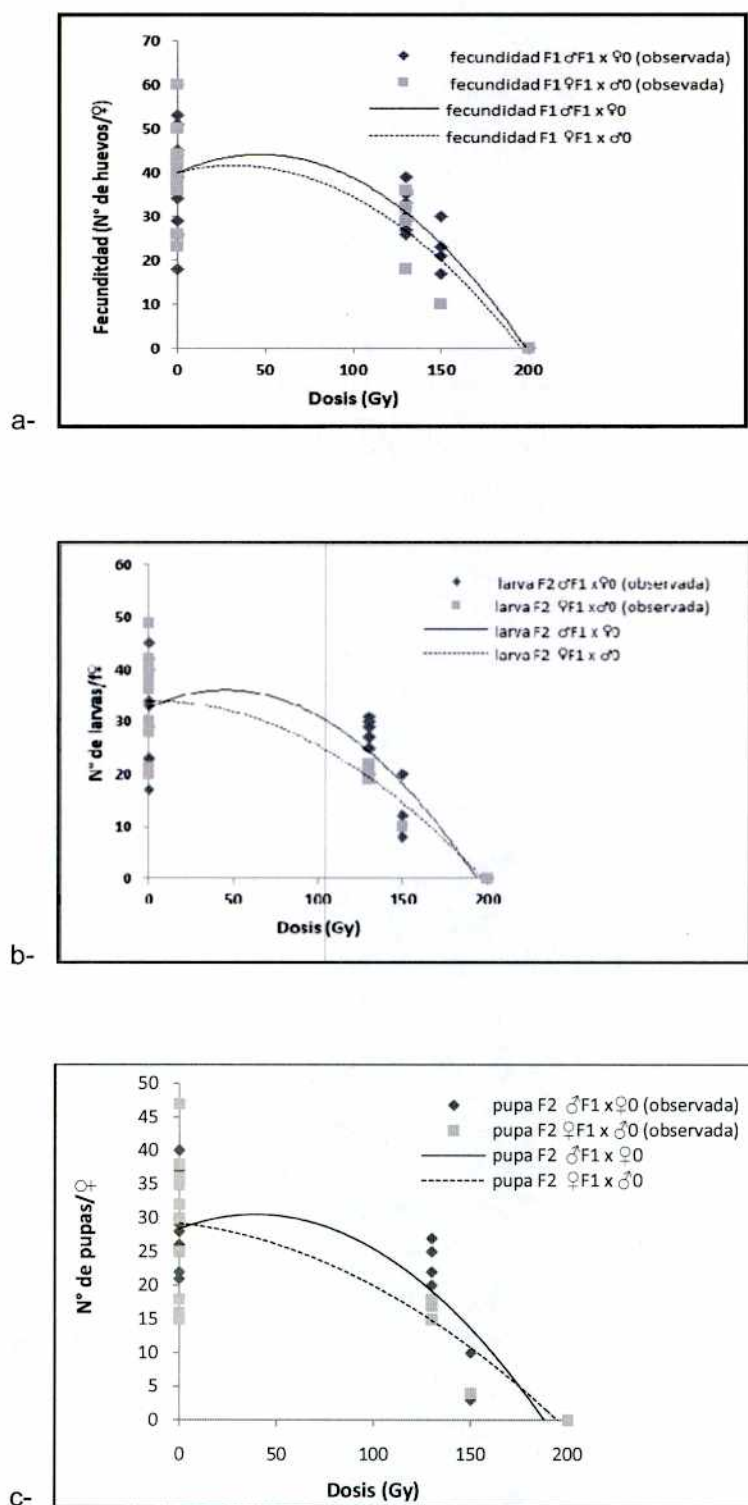


Figura 2.14. Para ambos tipos de cruzamientos (macho F1 x hembra sin tratar y macho sin tratar x hembra F1), efecto de la radiación sobre a: fecundidad de la progenie F1 (número de huevos/hembra), b: número de larvas F2/hembra y c: número de pupas F2/hembra F1, F2: primera y segunda generación de descendientes de adultos irradiados. SI: sin irradiar.

La fertilidad de la generación F1 disminuyó significativamente con el aumento de la dosis de radiación (Wald = 20,84 $p < 0,05$, $\chi^2 (1) = 21,14$ $p < 0,05$). El efecto fue independiente del tipo de cruzamiento ($\sigma F1 \times \varphi N$ o $\varphi F1 \times \sigma N$) (Wald = 0,18 $p > 0,05$, $\chi^2 (1) = 0,185$ $p > 0,05$) (Figura 2.15). Con dosis de 130 Gy algunos descendientes alcanzaron el estado de pupas y adultos. Con 150 Gy, los efectos sobre la EH se manifestaron en una reducción de la fecundidad y fertilidad de la F1 y de la cantidad de larvas y pupas producidas. Debe destacarse que con esta última dosis las pupas de la F2 no llegaron al estado adulto.

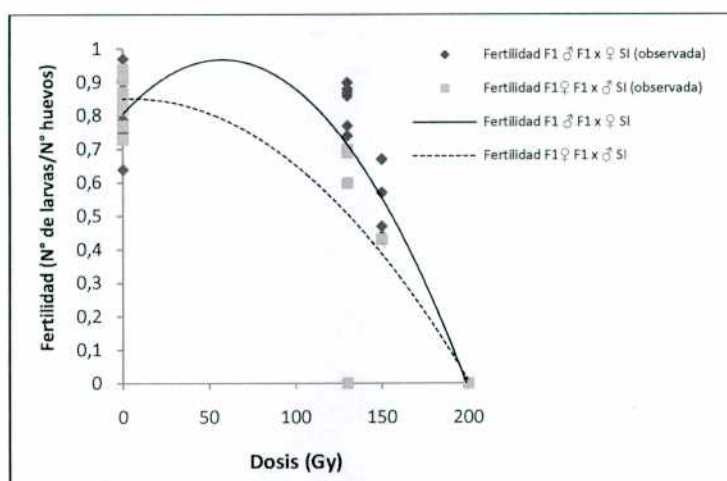


Figura 2.15. Para ambos tipos de cruzamientos, efecto de la radiación sobre la fertilidad de la progenie F1 de *Tuta absoluta* (número de larvas/número de huevos). F1: primera generación de descendientes de adultos irradiados. SI: sin irradiar.

La dosis de radiación tuvo efecto sobre la proporción sexual en la generación F2 con un sesgo a favor de los machos (Wald = 62,79 $p < 0,05$, $\chi^2 (1) = 44,31$ $p < 0,05$), independientemente del tipo de cruzamiento ($\sigma F1 \times \varphi N$ o $\varphi F1 \times \sigma N$) (Wald = 0,88 $p > 0,05$, $\chi^2 (1) = 0,9$ $p > 0,05$) (Figura 2.16).

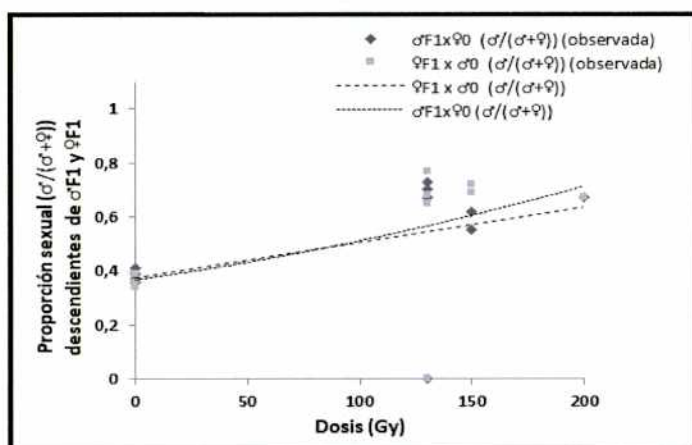


Figura 2.16. Efecto de la radiación sobre la proporción de sexos en la generación F2 de *Tuta absoluta* para ambos tipos de cruzamientos (macho F1 x hembra no tratada y macho no tratado x hembra F1). F1, F2: primera y segunda generación de descendientes de adultos irradiados.

No hubo diferencias significativas en la longevidad de los adultos F1 entre las diferentes dosis (Wald = 1,62 $p > 0,05$, $\chi^2 (1) = 1,36$ $p > 0,05$) y tipos de cruzamientos (Wald = 0,39 $p > 0,05$, $\chi^2 (1) = 0,38$ $p > 0,05$). La longevidad media fue de $17,43 \pm 2,62$ días.

2.3.2.2. Efecto de los rayos gamma aplicados en hembras adultas

La fecundidad de las hembras irradiadas (F0) disminuyó significativamente al aumentar las dosis de irradiación (Wald = 26,59 $p < 0,05$, $\chi^2 (1) = 38,53$ $p < 0,05$). El mismo resultado se observó para el número de larvas F1 (Wald = 19,86 $p < 0,05$, $\chi^2 (1) = 55,11$ $p < 0,05$). Cuando las polillas hembras fueron irradiadas con una dosis igual o superior a 150 Gy, no pusieron huevos (Figura 2.17).

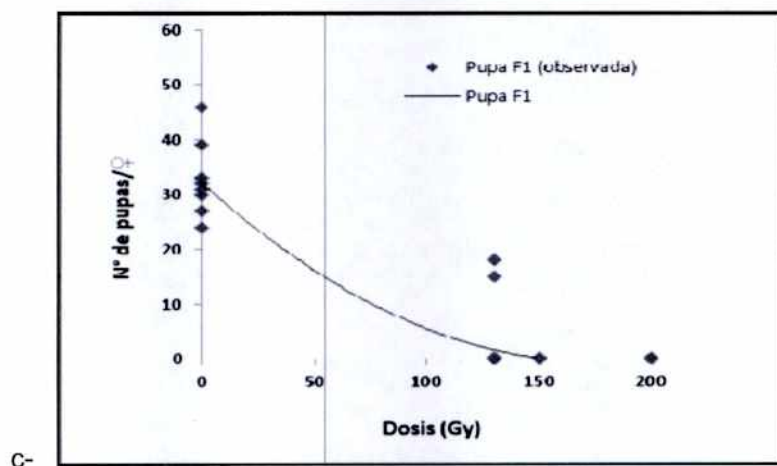
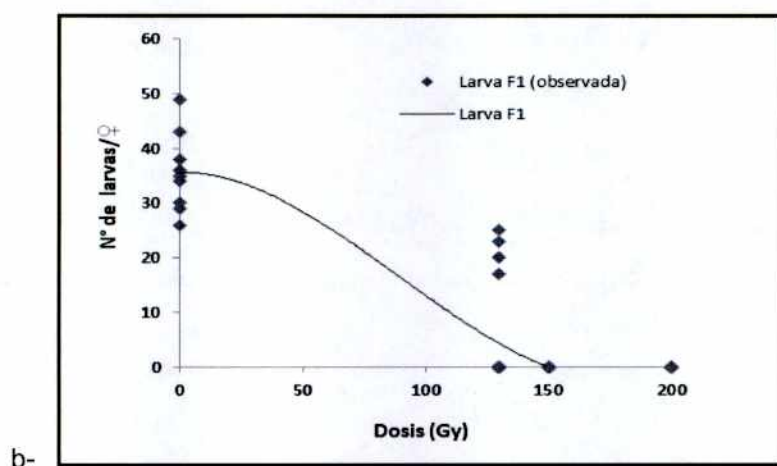
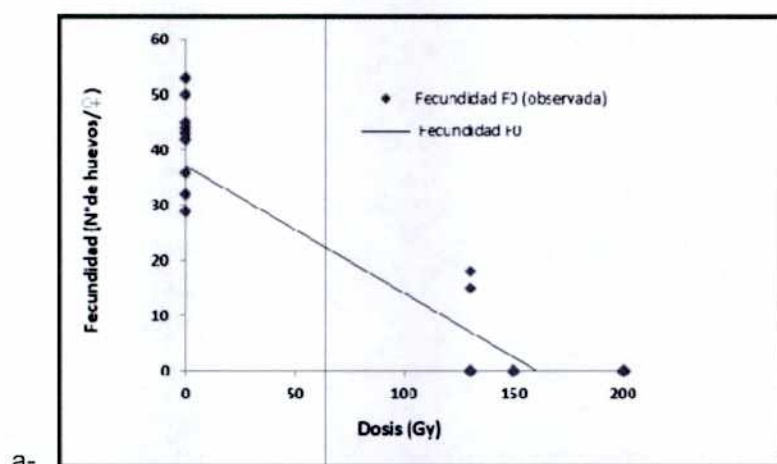


Figura 2.17. Efecto de la radiación sobre: a: fecundidad parental (número de huevos), b: número de larvas F1/hembra y c: número de pupas F1/hembra cuando las hembras de *Tuta absoluta* fueron irradiadas como adultas y apareadas con machos no tratados.

Se observó que la fertilidad de las hembras de la F0 disminuyó significativamente con el aumento de la radiación (Wald = 24,78 $p < 0,05$, $\chi^2 (1) = 48,56$ $p < 0,05$) (Figura 2.18).

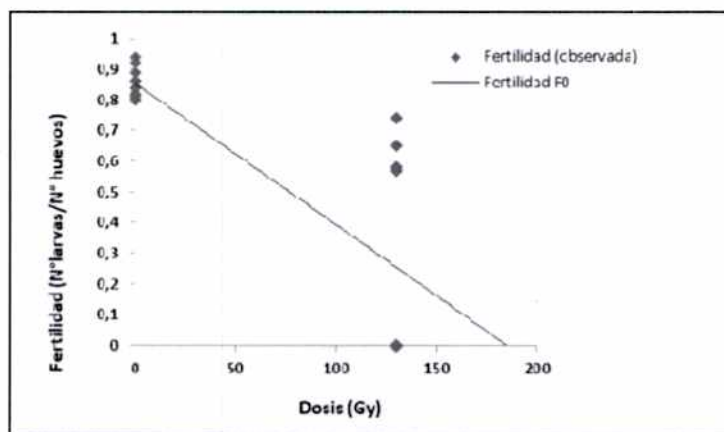


Figura 2.18. Fertilidad parental (número de larvas/número de huevos) cuando las hembras de *Tuta absoluta* fueron irradiadas como adultas.

La longevidad de las hembras tratadas no se vio afectada por la dosis de radiación aplicada a las polillas (Wald = 0,178 $p > 0,05$, $\chi^2 (1) = 0,172$ $p > 0,05$). La longevidad media fue de $17,87 \pm 4$ días.

2.4. DISCUSIÓN

Los insectos utilizados en los programas de TIE deben ser de una alta calidad para asegurar la eficacia de los insectos estériles cuando se liberan en el campo (Vreysen *et al.*, 2006). Calkins y Parker (2005) sostienen que lo fundamental de la TIE es la capacidad de los machos estériles liberados para competir por una hembra. El ambiente de cría, la dieta, los métodos de manipulación y la irradiación tienen un impacto en la calidad de los insectos estériles (Calkins y Parker, 2005). El uso de altas dosis de radiación puede comprometer la competitividad del insecto en el campo, lo que es un conflicto para los lepidópteros, porque requieren altas dosis de radiación para tornarse totalmente estériles. Por lo tanto, es de suma importancia esterilizar a los insectos utilizando la menor dosis de radiación posible para mejorar su

capacidad de dispersión, fecundidad y competitividad (Carpenter *et al.*, 1997). Asimismo, resulta relevante determinar cuáles son las mejores condiciones ambientales para efectuar el proceso de irradiación de modo de provocar el menor efecto nocivo sobre los insectos (Bakri *et al.*, 2005).

Los resultados de este estudio muestran que variables biológicas básicas como el tiempo de cópula y la longevidad de las polillas machos y hembras no se vieron afectados al aplicar enfriamiento en el procedimiento de irradiación. Esta disminución de la temperatura es necesaria para un correcto manejo de los insectos en los momentos previos, durante e inmediatamente después de la irradiación y hasta su liberación en el campo. Resultado similar se observó y se aplica con los adultos de *C. pomonella* que son manipulados e irradiados en un ambiente de baja temperatura (Batiste y Olson, 1973). Sin embargo, Bloem *et al.* (1998) descubrieron que el enfriamiento durante un tiempo excesivo puede ser perjudicial para los adultos de *C. pomonella* (12 h con respecto a 36 h). En el presente trabajo los adultos de *T. absoluta* estuvieron sometidos a bajas temperaturas durante no más de 6 h. Futuros ensayos serán necesarios para analizar durante cuánto tiempo se puede aplicar el proceso de enfriamiento sin afectar la calidad biológica de los adultos.

En los estudios de radiación realizados se observó que la fertilidad de la generación F1 procedente de machos irradiados fue menor que la de la F0. Esta diferencia fue mayor cuando se aumentó la dosis de radiación. Esto sugiere que los efectos nocivos de la radiación inducida en los machos F0 se transmitieron a la generación F1 de *T. absoluta*. Estos datos son consistentes con los informados Cagnotti *et al.* (2012), Yusef (2014) y Zhou *et al.* (2023) para *T. absoluta* y para varias especies de lepidópteros como la polilla de la fruta seca *Plodia interpunctella* (Guenée) Lepidoptera: Pyralidae (Brower, 1979), *P. gossypiella* (Qureshi *et al.*, 1993), el barrenador del tallo *Diatraea saccharalis* (Fabricius) Lepidoptera: Crambidae (Sanford, 1976), el taladro del maíz *Ostrinia nubilalis* (Hübner) Lepidoptera: Crambidae (Osouli *et al.*, 2020), *C. pomonella* (Blomefield *et al.*, 2010), *E. kuehniella* (Marec *et al.*, 1999), *C. cactorum* (Marec *et al.*, 2021), *S. litura* (Seth *et al.*, 2001), *T. leucotreta* (Bloem *et al.*, 2003), la polilla de la vid *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermuller) Lepidoptera: Tortricidae (Saour y Martin, 2014) y *H. armígera* (Osouli *et al.*,

2021). Dado que la pérdida de la capacidad de apareamiento en los machos irradiados no sería la causa de la disminución de la fertilidad en las hembras, una posible explicación podría ser una transferencia inadecuada de esperma o fluido de glándulas accesorias durante el apareamiento (Carabajal Paladino *et al.*, 2016). North y Holt (1971) y Koudelová y Cook (2001) observaron que el volumen de esperma producido o transferido por el macho disminuye al aumentar las dosis de radiación en las especies *T. ni* y *E. kuehniella*, respectivamente.

Los adultos emergentes de las generaciones F1 y F2 de machos irradiados mostraron un sesgo a favor de los machos. Esta distorsión de la proporción de sexos en las generaciones filiales a favor de los machos con dosis crecientes de radiación gamma ha sido también informada para especies de lepidópteros como *D. saccharalis* (Sanford, 1977), *S. litura* (Seth *et al.*, 2001), *E. cautella* (Al-Taweel *et al.*, 1990); *P. xylostella* (Nguyen y Nguyen, 2001); *T. leucotreta* (Bloem *et al.*, 2003). Sin embargo, Cagnotti *et al.* (2012) y Carpenter *et al.*, (2001) no observaron esta distorsión para *T. absoluta* y *C. cactorum*, respectivamente. El sesgo en la proporción de sexos registrado en la mayoría de las especies en los estudios de irradiación podría ser el resultado de mutaciones letales recesivas inducidas en los cromosomas sexuales Z por la irradiación, para los cuales la hembra es heterocigota (Traut y Marec, 1997; Marec y Vreysen 2019).

En los lepidópteros, las hembras son más radiosensibles que los machos. Por lo tanto, con una dosis adecuada de radiación, las hembras logran la esterilidad total y los machos la esterilidad parcial (LaChance, 1985). En el presente trabajo la fertilidad de las hembras irradiadas de *T. absoluta* apareadas con machos no irradiados mostró una disminución significativa con el aumento de las dosis de radiación. Este resultado coincide con lo hallado para esta misma especie por otros autores irradiando pupas maduras (Groppo, 1996; Arthur, 2004; Cagnotti *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2023) y para otros lepidópteros como *P. Gossypiella* (Henneberry y Clayton, 1988), la polilla de la col *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) (Sutrisno *et al.*, 1991) y *E. saccharina* (Walton y Conlong, 2016).

Se registró esterilidad completa para hembras irradiadas como adultas de hasta 1 día de edad a la dosis de 150 Gy. En trabajos anteriores irradiando pupas maduras de hembras de *T. absoluta* con radiación gamma se obtuvo la esterilidad total con 130 Gy y tasa de dosis de 34 Gy/min (Yusef, 2014). Por su parte, Groppo (1996) y Arthur (2004), observaron la esterilidad de las hembras de *T. absoluta* aplicando 100 Gy y tasa de dosis de 18.5 Gy/min en estado de pupa. Cagnotti *et al.*, (2012) encontraron que las hembras de *T. absoluta* irradiadas con rayos X como pupas maduras eran completamente estériles a una dosis equivalente a 200 Gy y una tasa de dosis de 36 Gy/min. Finalmente, Zhou *et al.* (2023) hallaron la esterilidad total de las hembras de la polilla cuando irradiaron pupas (48-72 h antes de la emergencia) con 300 Gy de radiación gamma con una fuente de ^{137}Ce y tasa de dosis de 1 Gy/min, no afectando la competitividad de apareamiento de los machos irradiados. Esta diferencia en la dosis según la fuente de radiación (^{60}Co y ^{137}Ce) fue registrada también en el gusano de la hoja del algodón *Spodoptera littoralis* (Boisduval) Lepidoptera: Noctuidae por Abd El-Kader (2013). Este autor encontró que, para la misma dosis aplicada en pupas, la irradiación con ^{60}Co con tasa de dosis de 0,5 Gy/min fue más efectiva para generar EH que con ^{137}Ce tasa de dosis de 6 Gy/min. Para proporcionar el mismo rendimiento, las fuentes de cesio, debido a la menor energía de los fotones, requieren aproximadamente cuatro veces más actividad que las fuentes de cobalto (Bakri *et al.*, 2021).

La disparidad de resultados hallados por los distintos autores al determinar la dosis requerida para generar esterilidad en las hembras de *T. absoluta* puede deberse a distintos factores. Entre ellos deben destacarse: a) el estado de desarrollo irradiado ya que los insectos adultos son más resistentes a la radiación que las pupas (Dongre *et al.*, 1997); b) el tipo de radiación utilizada y la fuente de radiación (rayos X / rayos gamma y ^{60}Co / ^{137}Ce) que difieren en sus espectros de energía (Mehta, 2009) y en su eficacia biológica (Hill, 2004); c) la tasa de dosis puesto que menores tasas reducen los efectos adversos inducidos por la radiación (Bakri *et al.*, 2021). Otros factores como la temperatura, la presencia de oxígeno, el estado nutricional del insecto y el estado de hidratación pueden contribuir también a esta divergencia (Bakri *et al.*, 2005).

Aunque los irradiadores de rayos X tienen la ventaja de no tener problemas de transporte ni de residuos radiactivos, son nuevos en el campo y su robustez aún está por demostrarse. Mientras que los irradiadores gamma han demostrado solidez ya que han funcionado muy bien en programas operativos durante décadas, lo que hace que la radiación gamma sea el método más utilizado en los programas TIE hasta el momento (Bakri *et al.*, 2021).

Con respecto a otras especies de Gelechiidae como *P. gossypiella* y la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), la esterilidad completa de las hembras adultas tratadas con rayos gamma se logró con dosis de 150 Gy y 200 Gy, respectivamente (Henneberry y Clayton, 1988; Makee y Saour, 2003). En polillas hembras de *S. litura*, irradiadas y apareadas con polillas macho no tratados, se observó que una dosis de 130 Gy produjo un 100% de esterilidad (Seth *et al.*, 2016).

La aplicabilidad de un programa combinado de irradiación y liberación de insectos cuando no es posible realizar la separación de sexos se fundamenta principalmente en la esterilización completa de las polillas hembras, que actuarían como sumideros de esperma para los machos salvajes presentes en el campo. En el caso de *T. absoluta*, una dosis de radiación de 150 Gy podría considerarse adecuada para irradiar a ambos sexos al mismo tiempo, pudiendo liberarse simultáneamente polillas hembra completamente esterilizadas y polillas macho subesterilizadas. Las hembras irradiadas estériles, al conservar su aptitud reproductiva, podrán dispersar sus feromonas y aparearse con machos silvestres, pero sin dejar descendencia. Para que este postulado se cumpla, es importante que la irradiación, especialmente con dosis altas, no afecte negativamente la producción y secreción de feromonas interfiriendo en la comunicación intraespecífica entre las polillas (Abdu *et al.*, 1985). En el caso de *T. absoluta* este es un aspecto para evaluar en futuras investigaciones.

2.5. CONCLUSIÓN

Un rango de temperaturas de 2 a 5 °C es adecuado para la conservación y manipuleo de los adultos en el proceso de irradiación, esto es, desde que son colectados en la cría hasta que finaliza la aplicación de la radiación. Aspectos biológicos básicos como su capacidad de apareamiento y su longevidad no se ven afectados por este enfriamiento.

Una dosis de 150 Gy, tasa de dosis de 36 Gy/min y UD: 1.1 resulta ser adecuada para generar Esterilidad Heredada en *T. absoluta*. Esta dosis permitiría liberar polillas hembras totalmente estériles, que podrán aparearse con los machos presentes sin dejar descendencia, y machos parcialmente esterilizados, que dejarán descendientes predominantemente machos y menos fértiles.

CAPÍTULO III

SUPRESIÓN POBLACIONAL DE *Tuta absoluta* A TRAVÉS DEL USO DE ESTERILIDAD HEREDADA

3.1. INTRODUCCIÓN

La selección de la dosis de radiación óptima para esterilizar a los machos es un paso crítico en el desarrollo de un programa de EH. Un balance entre el nivel de esterilidad y la calidad de los machos irradiados es necesario para asegurar la eficacia del control del insecto en el campo (Bakri *et al.*, 2021). Es esencial que los insectos liberados tengan rasgos fisiológicos y de comportamiento de alta calidad (Chambers, 1977). La capacidad de volar y la respuesta al llamado de las hembras son particularmente cruciales para los insectos, ya que les permite dispersarse y localizar parejas potenciales en el campo, contribuyendo significativamente al apareamiento exitoso (Vreysen *et al.*, 2010). Se ha documentado la reducción de la capacidad de vuelo y dispersión y el aumento de la mortalidad debido a las condiciones de confinamiento de la cría masiva y/o la irradiación (Smith *et al.*, 1981). En este sentido, la EH es una técnica ventajosa en relación con el uso de polillas macho completamente estériles ya que se ha registrado una mayor calidad y competitividad de apareamiento de las polillas irradiadas liberadas a medida que se reduce la dosis de radiación utilizada para inducir la esterilidad (Jang *et al.*, 2012).

La comunicación química está involucrada en el apareamiento, la alimentación y otras interacciones ecológicas claves de los insectos (Matthews y Matthews, 1978). Los bioensayos basados en el uso de atrayentes de largo alcance con feromonas son muy útiles para evaluar la distribución de insectos silvestres y estériles, monitorear las tasas de inundación (Vreysen, 2005) y evaluar aspectos específicos de la calidad del macho estéril (Calkins y Parker 2005).

Establecida su habilidad para dispersarse, es esencial poder determinar el desempeño de los insectos irradiados como supresores de la plaga. Esto es, analizar si efectivamente, son capaces de disminuir el tamaño poblacional de la

población plaga, mediante bioensayos simples y económicos, ya sea en laboratorio o en condiciones semicontroladas de invernáculo/campo mediante el uso de jaulas de campo. En tal sentido, el potencial del uso de la EH mediante este tipo de experimentos ha sido estudiado para especies de lepidópteros como *P. xylostella* (Nguyen y Nguyen, 2001), *P. gossypiella* (Ahmad *et al.*, 2002), *P. operculella* (Saour, 2004), *C. cactorum* (Hight *et al.*, 2005) y *Conopomorpha sinensis* Bradley (Lepidoptera: Gracillariidae) (Hu *et al.*, 2012). En la polilla del tomate *T. absoluta*, Cagnotti *et al.* (2016) observó que la liberación de polillas estériles irradiadas con rayos X en una proporción de 15:1 respecto de polillas sin tratar fue capaz de reducir la población en un cultivo de tomate y su potencial integración con el control biológico a través del uso de un depredador mírido en invernadero (Cagnotti *et al.*, 2016).

Determinada la dosis adecuada para generar esterilidad completa en hembras y parcial en machos (Capítulo II), los pasos subsecuentes tuvieron los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto de la radiación gamma sobre la aptitud de dispersión de machos de *T. absoluta*.
- Evaluar la supresión de la población plaga de *T. absoluta* provocada por polillas irradiadas y su progenie bajo condiciones semicontroladas.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en un invernáculo (15 m de largo x 10 m de ancho) ubicado en el predio del Departamento Aplicaciones Agropecuarias, División Aplicaciones Agronómicas, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Centro Atómico Ezeiza (CAE) (Figura 3.1). Las condiciones de temperatura y humedad relativa se registraron con un termohigrógrafo HOBO. Los individuos de *T. absoluta* utilizados en los experimentos se obtuvieron de la colonia de cría del laboratorio de Control de Plagas (ver Capítulo II, Materiales y Métodos, procedimiento de obtención de insectos).

Las irradiaciones se realizaron en el CAE, en la Planta de Irradiación

Semi Industrial (PISI), con una fuente de cobalto 60 (^{60}Co). Las dosis fueron medidas con dosímetros de alanina (rango de detección 50 Gy a 100 kGy con un error del $\pm 5,32\%$) y una tasa de dosis de 36 Gy/min.



Figura 3.1. Invernáculo donde se realizaron los ensayos de aptitud de dispersión y supresión de machos de *T. absoluta*. MVYusef

3.2.1. I- Evaluación del efecto de la radiación sobre la aptitud de dispersión de machos de *T. absoluta*

El efecto de la radiación en la dispersión de los machos de *T. absoluta* fue analizado tanto en individuos irradiados de la generación parental como en su descendencia F1. Para la obtención de machos F1, se irradiaron adultos de la polilla con 150 Gy mantenidos a 2 °C luego de lo cual se cruzaron con hembras sin irradiar. Cada pareja se colocó en una jaula con una planta de tomate para la oviposición. El desarrollo de la F1 se observó hasta llegar al estado de pupa. Estas fueron sexadas y los machos acondicionados en bandejas plásticas con papel *tissue* hasta la emergencia del adulto.

La dispersión se evaluó mediante la respuesta de las polillas machos a las señales de feromonas sexuales sintéticas, a través de un experimento de marcado-liberación-recaptura. Los machos irradiados con 150 Gy (tasa de dosis de 36 Gymin y UD: 1.1), machos de la F1 y machos normales fueron identificados con polvos fluorescentes (Day Glo Color, Cleveland, OH United States) de distintos colores (verde, magenta y naranja, respectivamente) según

los métodos de Bloem *et al.* (2004). Esto se hizo girando suavemente las polillas en un recipiente de 250 ml hasta que estuvieran cubiertas uniformemente con el polvo.

El ensayo se realizó en la temporada de verano 2023, en el invernáculo del Departamento Aplicaciones Agropecuarias, de 15 m de largo x 10 m de ancho (Figura 3.1). Las condiciones de temperatura y humedad relativa se registraron con un termohigrógrafo HOBO. En uno de los extremos del invernáculo, considerando su largo, a 14,5 m de la puerta de entrada, se colocó una trampa tipo delta con un difusor de caucho natural con forma de cápsula conteniendo feromona de hembras de *T. absoluta* (acetato de (3E,8Z,11Z)-tetradeca-3,8,11-trienilo y acetato de (3E,8Z)-tetradeca-3,8-dienilo) en una concentración de 0.5 mg y piso engomado (Figura 3.2), de modo que los insectos atraídos quedaran adheridos a las trampas. Las polillas de cada tratamiento 50 ♂_I, 50 ♂_{F1} y 50 ♂_N se colocaron en frascos de plástico transparente de 500 mL con tapa y se llevaron al punto de liberación (puerta de entrada del invernáculo). Para liberar las polillas, se quitó suavemente la tapa del frasco, para permitir que salieran volando. A las 48 y 96 h se hicieron nuevamente dos liberaciones de 50 ♂_I, 50 ♂_{F1} y 50 ♂_N cada una a 1, 3 y 5 días de edad de las polillas liberadas. Por otra parte, fuera del invernáculo, a 20 y 40 m desde el punto de liberación de los insectos, se colocaron otras dos trampas (Figura 3.3), para evaluar si los machos liberados alcanzaban a dispersarse a mayores distancias desde el punto de liberación, debido a que el invernáculo no cuenta con una antesala y una doble puerta para tener acceso a su interior.



Figura 3.2. Trampa tipo Delta con feromona colocada dentro del invernáculo. MVYusef

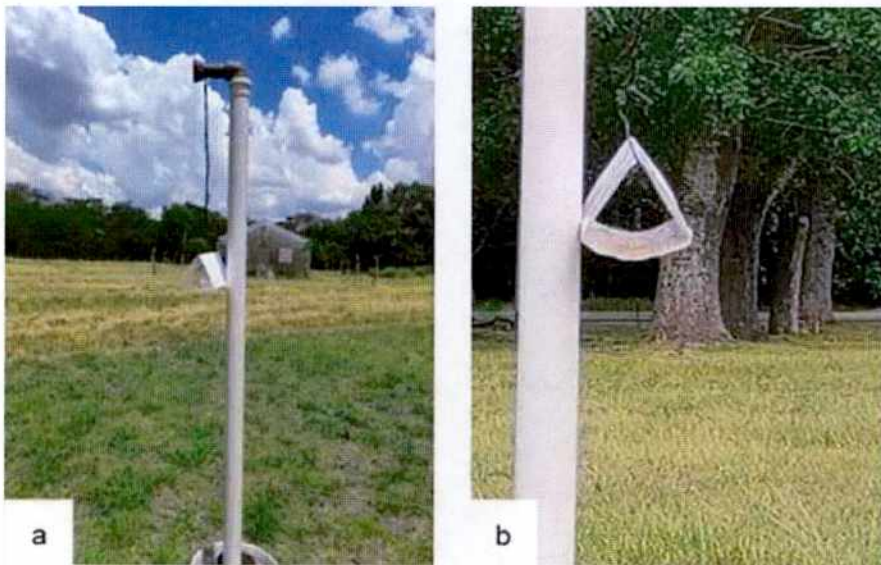


Figura 3.3. **a** y **b** trampas ubicadas fuera del invernáculo. MVYusef

Las trampas fueron revisadas cada 24 h y hasta 4 días después de cada liberación registrando el número de machos de cada grupo capturado. Se colocaron nuevos pisos adhesivos cuando al menos se encontraba una polilla capturada. En el laboratorio los pisos fueron examinados bajo luz ultravioleta

para diferenciar las polillas de cada tratamiento. Se contabilizó el número de machos de cada grupo capturado. Diferencias en la cantidad de machos irradiados, machos F1 y machos no irradiados capturados en cada una de las observaciones fueron analizadas mediante una prueba de Friedman para muestras dependientes con un nivel de significancia de 0,05.

3.2.2. II- Evaluación de la supresión de la población plaga de *T. absoluta* a través de polillas irradiadas y su progenie bajo condiciones controladas

Machos y hembras de polilla de hasta 24 h de edad fueron colocados en viales de policarbonato (5,5 cm de altura y 4 cm de diámetro) e irradiadas con 150 Gy, tasa de dosis de 36 Gy/min y UD: 1.1 a 2°C. Se contó con jaulas de 1 m de alto x 1 de lado x 0,30 de ancho, en cuyo interior se colocaron 4 plantas de tomate con 6 a 8 hojas (Figura 3.4). El ensayo se realizó en la temporada de verano 2024, por un periodo de 12 semanas. Las condiciones de temperatura y humedad relativa se registraron con un termohigrógrafo HOBO.

Se evaluó el efecto de la introducción de individuos irradiados sobre la supresión poblacional de la plaga utilizando una tasa de liberación de polillas irradiadas respecto de no irradiadas de 15:1, siguiendo la metodología propuesta por Cagnotti *et al.* (2016). Las jaulas fueron asignadas al azar a uno de los siguientes tratamientos: 1) control (0 ♀_I: 0 ♂_I: 3 ♀_N: 3 ♂_N) y 2) con liberación de individuos irradiados (45 ♀_I: 45 ♂_I: 3 ♀_N: 3 ♂_N). Se realizaron cinco réplicas por tratamiento. Una vez a la semana durante 3 meses, se registraron la cantidad de huevos, larvas chicas (correspondiente a los primeros estadios larvales) y larvas grandes (correspondiente a los últimos estadios larvales). Para ello se seleccionó aleatoriamente una hoja por estrato superior, medio e inferior de la planta observándose el haz y el envés de cada hoja.



Figura 3.4. Jaulas utilizadas para el ensayo de supresión de *Tuta absoluta*. MVYusef

El efecto de los tratamientos sobre la cantidad de huevos, larvas pequeñas y larvas grandes por jaula fue evaluado en cada pico poblacional. Se realizó un Modelo Lineal Generalizado mediante el software R versión 4.3.1. (<http://www.r-project.org>) utilizando la función Generalizada de Cuadrados Mínimos del Modelo de Efectos Mixtos Lineales y No Lineales. Para cumplir con el supuesto de normalidad, los datos fueron transformados mediante la transformación de Box-Cox. Se eligió una estructura de error en la cual la correlación entre fechas se asumió con la forma de una matriz de simétrica compuesta. La estructura de varianza – covarianza fue evaluada mediante el criterio de información de Akaike (AIC). Se usaron pruebas de Máxima Verosimilitud para comparar los tratamientos.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. I- Evaluación del efecto de la radiación sobre la aptitud de dispersión de machos de *T. absoluta*

Durante el ensayo, las temperaturas y la humedad relativa mínimas y máximas (media $\pm$ EE) fueron $19,4 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ / $36,8 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $40,6 \pm 1 \text{ } \%$ / $90,1 \pm 3 \text{ } \%$.

La prueba de Friedman no mostró diferencias significativas en la dispersión entre machos de *T. absoluta* irradiados, F1 y no tratados ($T^2= 2,33$ $p > 0,05$) (Figura 3.5). En el transcurso del experimento se liberó un total de 450 machos de polilla, de los que se capturaron 108 (24 %) luego de 4 días de la liberación y considerando en conjunto las tres liberaciones. De ellos, 40 machos fueron no irradiados, 35 fueron tratados con 150 Gy (generación parental) y 33 correspondieron a la generación F1.

Fuera del invernáculo, quedaron atrapados 2 machos (sin tratar) y 4 machos (2 sin tratar, 1 irradiado con 150 Gy y 1 F1) en las trampas ubicadas a 20 y a 40 m del punto de liberación, respectivamente.

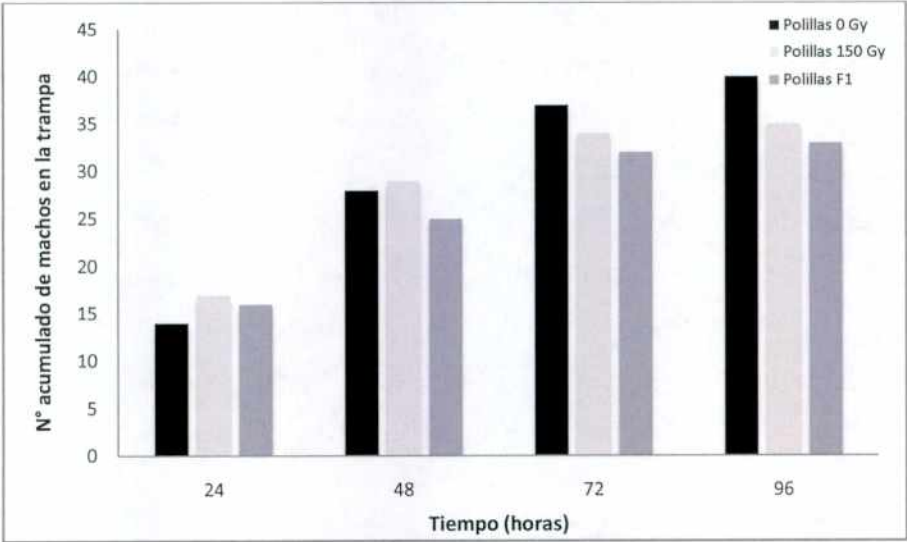


Figura 3.5. Número acumulado de machos irradiados con 150 Gy, machos F1 y machos normales durante cuatro días en la trampa de feromona colocada en el interior del invernáculo.

3.3.2. II- Evaluación de la supresión de la población plaga de *T. absoluta* a través de polillas irradiadas y su progenie bajo condiciones controladas

Las condiciones meteorológicas a lo largo del ensayo fueron: $38,75 \pm 0,89^{\circ}\text{C}$ y $16,02 \pm 0,79^{\circ}\text{C}$ de temperatura media máxima y mínima, respectivamente. La humedad relativa media máxima y mínima fue de $91,47 \pm 2,6\%$ y $25,99 \pm 3 \%$, respectivamente.

Las variables registradas (número de huevos, número de larvas pequeñas y número de larvas grandes) mostraron tres picos a lo largo del período de tiempo estudiado, correspondientes a tres generaciones de la plaga (Figura 3.6 a-b-c).

Los tres picos poblacionales de huevos ocurrieron en las semanas 1, 5 y 8-9. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el número de huevos en el primer y tercer pico poblacional ($F_{1,8} = 7,74$ $p < 0,05$ y $F_{1,36} = 6,26$ $p < 0,05$, respectivamente) pero no en el segundo pico ($F_{1,16} = 2,33$; $p > 0,05$). Diferencias significativas entre semanas se observaron en el primer y tercer pico ($F_{1,8} = 16,93$ $p < 0,05$ y $F_{1,36} = 80,87$ $p < 0,05$; respectivamente) mientras que en el segundo pico no hubo diferencias significativas entre semanas ($F_{1,26} = 1,65$ $p > 0,05$) (Fig. 3.6 a).

En los tres picos poblacionales, el número de larvas pequeñas fue mayor en las jaulas control respecto de las jaulas donde se introdujeron las polillas irradiadas (pico 1: $F_{1,16} = 23,09$ $p < 0,05$; pico 2: $F_{1,36} = 24,50$ $p < 0,05$; pico 3: $F_{1,46} = 50,29$ $p < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre fechas en el pico 1 y el pico 2 ($F_{1,16} = 2,53$ $p > 0,05$ y $F_{1,36} = 3,72$ $p > 0,05$, respectivamente), pero si se encontraron diferencias significativas en el pico 3; ($F_{1,46} = 135,84$ $p < 0,05$) (Figura 3.6 b). Los picos poblacionales de larvas se encontraron en las semanas 2-3, 6 y 10.

Del mismo modo, el número de larvas grandes fue significativamente diferente entre tratamientos en los tres picos, siendo mayor en el control (pico 1: $F_{1,16} = 56,96$ $p < 0,05$; pico 2: $F_{1,26} = 25,90$ $p < 0,05$; pico 3: $F_{1,46} = 57,36$ $p < 0,05$). Por otro lado, no hubo diferencias entre semanas en el primer y el segundo pico (pico 1: $F_{1,16} = 0,66$ $p > 0,05$ y pico 2: $F_{1,26} = 0,13$ $p > 0,05$). En el tercer pico, el número de larvas grandes fue significativamente diferente entre

fechas ($F_{1,46}= 11,35$ $p < 0,05$) (Figura 3.6 c). Los picos poblacionales se hallaron en las semanas 4, 7-8 y 11-12 de iniciado el ensayo.

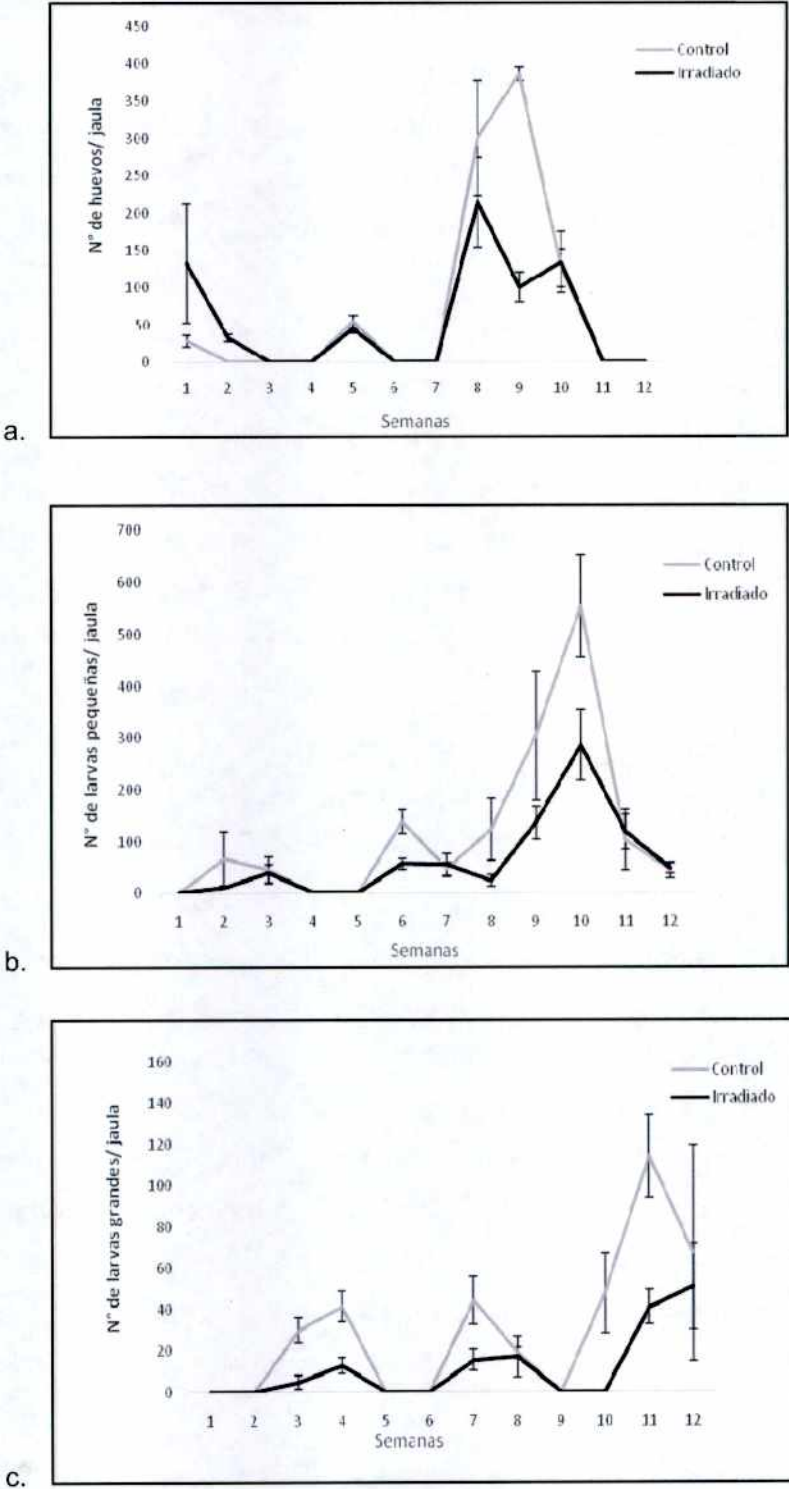


Figura 3.6. a-b-c Supresión poblacional de una población de *Tuta absoluta* por polillas irradiadas y su progenie en el transcurso de 12 semanas. a) Número de huevos. b) Número de larvas pequeñas. c) Número de larvas grandes. Líneas verticales indican ES

3.4. DISCUSIÓN

Un desafío importante al momento de desarrollar la técnica de la EH para el control de una determinada plaga es confirmar que las liberaciones de individuos irradiados efectivamente son capaces de tener un impacto sobre la población silvestre. Esto es, son capaces de provocar una disminución en los tamaños poblacionales con el transcurrir de las generaciones. Dado que la calidad de las polillas (capacidad de vuelo, respuesta a las feromonas y competitividad de apareamiento) podría verse afectada por el uso de radiación ionizante durante el procedimiento de esterilización, el análisis del desempeño de los insectos es un factor esencial con miras a que la técnica sea exitosa (Sorensen *et al.*, 2012). Ciertos parámetros necesarios para que los insectos criados y esterilizados sean aptos en el campo incluyen una buena movilidad, competitividad y compatibilidad de apareamiento con un insecto salvaje, transferencia de esperma y fluidos de glándulas accesorias exitosa y una larga supervivencia (Calkins y Parker, 2005). La capacidad de vuelo es un aspecto particularmente importante que puede ser analizado a través de bioensayos de laboratorio y de campo que contemplan el uso de feromonas sexuales atrayentes (Carpenter *et al.*, 2013).

Los métodos de control de plagas que utilizan feromonas volátiles se enfocan en la percepción de estos compuestos. Las feromonas son señales químicas emitidas por un insecto que le permiten comunicarse con otros individuos de su misma especie, induciendo un cambio en la fisiología o el comportamiento del insecto. En el caso de las feromonas sexuales, ante un determinado nivel de feromona emitida por la hembra, los machos producen como respuesta inicial un comportamiento de vuelo orientado hacia la fuente de feromona, desencadenándose una serie de eventos epigámicos (Giebultowicz y Zdarek, 1996) que conducen al apareamiento (Borrero-Echeverry *et al.*, 2018). Desde hace años, el número de polillas macho capturadas en trampas con hembras vírgenes o cebadas con feromonas se consideró una buena medida de la competitividad de los machos en programas de EH (Bloem *et al.*, 1999). Los atrayentes de largo alcance son muy útiles para evaluar la distribución de insectos silvestres y estériles, monitorear las tasas de inundación (Vreysen 2005) y evaluar aspectos específicos de la calidad de los

machos estériles (Calkins y Parker, 2005). La respuesta adecuada de las polillas macho irradiadas y sus descendientes F1 hacia las trampas cebadas con feromonas es uno de los parámetros clave que suministran indicaciones de que el apareamiento seguramente sea exitoso.

Los resultados del ensayo de dispersión indican que los machos de *T. absoluta* irradiados con 150 Gy y machos F1 se dispersan hacia la fuente de feromona con la misma eficacia que los machos controles sin irradiar. Al mismo tiempo, los datos no mostraron diferencias marcadas en la tasa de recuperación de machos irradiados con 150 Gy, sus hijos e individuos no tratados. Hallazgos similares fueron informados por Bloem y Carpenter, (2001) en *C. pomonella* y por Kumano *et al.* (2007) en el gorgojo de la batata, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Brentidae). Si bien no se midió qué sucede a grandes distancias, en la práctica durante la aplicación de un programa de EH como en el caso de *C. pomonella*, los individuos irradiados se liberan en varios puntos a lo largo de la línea de cultivo. De esta forma, considerando el resultado obtenido en el presente estudio de liberación-recaptura y siguiendo un esquema de liberación similar al utilizado para la liberación de la polilla de la manzana, estaría asegurada la dispersión de los machos irradiados y machos F1 de la polilla del tomate en un radio de al menos 14,5 m durante un espacio de tiempo de hasta 96 h.

En el ensayo de supresión poblacional de la polilla del tomate en jaulas utilizando una tasa de liberación de 15:1 (polillas irradiadas: polillas no tratadas) se observaron diferencias significativas en el número de huevos en el primer y el tercer pico entre los tratamientos. El mayor número de huevos al inicio fue observado en las jaulas con individuos irradiados, resultado lógico considerando que allí se realizó la liberación de un mayor número de hembras que en las jaulas control. Sin embargo, este resultado se revirtió hacia el tercer pico en el que el mayor número de huevos fue observado en las jaulas control, lo que manifiesta los efectos de la EH. Con respecto a las larvas pequeñas y grandes, la cantidad registrada en las jaulas donde se realizaron las liberaciones de individuos irradiados fue significativamente menor respecto de las jaulas control a través de las tres generaciones estudiadas. Estos resultados indican que el tratamiento de las polillas con una dosis de radiación de 150 Gy produjo esterilidad total en hembras y esterilidad parcial en machos,

sin afectar la competitividad de estos últimos para copular con las hembras no tratadas en condiciones experimentales. Como resultado, se obtuvo una progenie F1 estéril que fue reduciendo el incremento de la población de los individuos en el transcurso del ensayo. Sumado a esto, es probable que las hembras irradiadas de *T. absoluta* liberadas en las jaulas desempeñaran un rol primordial en la disminución de larvas dentro de las jaulas compitiendo con las hembras fértiles por el limitado esperma fértil disponible producido por los machos no tratados.

Experiencias realizadas con otras especies de lepidópteros mostraron resultados semejantes de supresión de la población plaga. En estudios realizados en polillas de las coles, *P. xylostella*, el número de adultos en las generaciones F1 y F2 se redujo significativamente cuando se liberaron machos irradiados en jaulas de campo junto con polillas fértiles en las tasas 5:1 o 10:1 (Nguyen y Nguyen 2001). En la polilla de la papa, *P. operculella* la liberación de polillas irradiadas y no irradiadas en una proporción de 5:1 junto con parasitoides del género *Trichogramma* fue eficaz para reducir la progenie F1 (Saour, 2004). Dentro del desarrollo de un programa de liberación de insectos estériles contra la polilla invasora del cactus, *C. cactorum*, Hight *et al.* (2005), la liberación de individuos irradiados en una proporción de 5:1 pudo suprimir eficazmente a la polilla en jaulas de campo, siendo más eficiente la introducción de ambos sexos juntos respecto de solo machos. Ahmad *et al.* (2002) registraron una disminución significativa de la población silvestre de *P. gossypiella* liberando individuos tratados en una proporción 20:1 respecto de no tratados en jaulas de campo. Finalmente, la liberación de machos subestériles (pupas tratadas con rayos X a una dosis equivalente a 200 Gy) de *T. absoluta* en jaulas de campo a una proporción de 15:1 respecto de machos no tratados provocó una disminución significativa en la población de la polilla del tomate (Cagnotti *et al.*, 2016).

Es importante mencionar que en el presente ensayo se probó una única dosis de liberación (quince individuos irradiados: un individuo no tratado) seleccionada sobre la base de estudios previos con la especie (Cagnotti *et al.*, 2016). La proporción óptima de liberación puede diferir entre especies de lepidópteros según sus características intrínsecas (tasa de reproducción, longevidad, daño por radiación), y para una misma especie, según el tipo de

radiación utilizada o las condiciones del ensayo, esto es, uso de jaula versus liberación a campo. En esta última condición no confinada, las proporciones de inundación de individuos irradiados necesarias para lograr la supresión de la población plaga son en general mayores (Bloem *et al.*, 2005). Esto podría estar relacionado con una mayor mortalidad en una situación de campo abierto o invernáculo debido a las inclemencias del tiempo, la depredación y la necesidad de una mayor dispersión para encontrar a la hembra con quien aparearse. Por lo tanto, podemos esperar que el número de machos estériles de *T. absoluta* a liberar deba ser mayor que el probado en este ensayo para lograr una reducción de la población silvestre en los cultivos de tomate. Serán necesarios más estudios a futuro en condiciones de invernadero o campo abierto para probar esta hipótesis.

3.5. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados presentados en este capítulo, podemos concluir que las polillas de *T. absoluta* macho irradiadas con dosis de 150 Gy y sus descendientes F1 son capaces de dispersarse por el cultivo como lo hacen las polillas sin irradiar. Por otra parte las polillas liberadas a una tasa de al menos 15:1 respecto de individuos no tratados tienen la performance adecuada para lograr un significativo nivel de supresión de *T. absoluta* en polillas no irradiadas.

CAPITULO IV

METODOLOGÍAS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE INSECTOS NORMALES, IRRADIADOS Y SU PROGENIE F1 DE *Tuta absoluta*

4.1. INTRODUCCIÓN

En los programas de control de plagas, uno de los aspectos más críticos radica en monitorear el progreso antes, durante y después del tratamiento que se lleva a cabo. En el caso de la TIE, para evaluar su efectividad, es fundamental distinguir los individuos irradiados de los salvajes, con el fin de conocer su comportamiento cuando son liberados y el impacto que producen en la población a controlar (Vreysen, 2001). Con este objetivo son utilizadas distintas técnicas de marcado que permiten conocer, en el terreno, las proporciones de insectos estériles y silvestres y, de este modo, confirmar el éxito o fracaso de la metodología empleada (Kean y Suckling, 2005). El marcado de los insectos adultos requiere que no modifique su comportamiento, especialmente el vuelo y la orientación hacia una fuente de feromonas sexuales (Araujo *et al.*, 2022). Además, es importante que no perjudique el ambiente, sea económico y fácil de usar (Hagler y Jackson, 2001).

Con este objetivo, a partir de la década de 1930, se han descrito varias técnicas como ser: el uso de etiquetado (Fletcher, 1936), mutilación (Querci, 1936), tintes / tinciones (Mac Cord *et al.*, 1983), polvos fluorescentes (Chang, 1946), colorantes internos (Bailey *et al.*, 1962), colorante alimentario (Williams, 1962), marcadores de proteínas (Hagler *et al.*, 1992), radioisótopos (Zhou *et al.*, 2004) y, más recientemente, isótopos estables (Faiman *et al.*, 2019).

Los métodos enumerados presentan algunas ventajas y limitaciones para su implementación, como la necesidad de equipos específicos de muy alto costo para la determinación de radioisótopos y de isótopos estables, impactos negativos en el comportamiento de los insectos, variabilidad en la eficacia, riesgos para la salud y la seguridad humanas, y pérdida del marcador (El Sheikh, 2019), lo cual puede representar una limitación operativa importante para la aplicación de los programas de TIE (Dyck, 2010).

Como se detalló en el capítulo I, para el marcado en dípteros se aplican polvos fluorescentes en estado de pupa y cuando el imago está listo para

emerger del interior del pupario, evagina y distiende el ptilinum, quedando incorporado el marcador. Por el contrario, en los lepidópteros la emergencia se produce mediante la degradación química del pupario, con lo que el polvo queda sobre las escamas de las polillas, pero no incorporado en una estructura corporal. Esta técnica pierde eficacia, pues se va perdiendo con el tiempo o puede quedar sobre polillas silvestres que entran en contacto con las irradiadas, ocasionando una identificación errónea (Proverbs 1982). Además, se ha demostrado que la aplicación excesiva de polvos fluorescentes afecta el comportamiento de los adultos, en particular la respuesta olfativa de los machos al llamado de las hembras (Logan y Proverbs, 1975).

Otro aspecto fundamental para tener en cuenta en los lepidópteros es que la EH permite el desarrollo de machos estériles en la generación F1 que también contribuyen al control de la población plaga. Entonces, al momento de evaluar el desarrollo y éxito del programa no solo interesa identificar las polillas irradiadas liberadas sino también los machos estériles descendientes. En este marco es pertinente pensar en el desarrollo de métodos alternativos para la diferenciación de insectos normales e irradiados y sus descendientes, basados en conceptos totalmente diferentes, tales como la morfología del esperma y el polimorfismo genético.

Los machos de lepidópteros producen dos tipos de esperma: el eupireno y el apireno, ambos contenidos en paquetes (Meves, 1903; Friedländer, 1983). En el esperma eupireno, los espermatozoides tienen sus núcleos ordenados y distribuidos en la cabeza del paquete. Estos espermatozoides, que representan alrededor del 10% de los totales transferidos a la hembra, son esenciales para la fertilización y se los denomina euespermatozoides (Sakai *et al.*, 2019). Por el contrario, los espermatozoides del tipo apireno, presentan sus núcleos con una ordenación anárquica, son infértiles y se los denomina paraespermatozoides apirenos (Jamieson, 1987b). Los espermatozoides apirenos son necesarios para la migración de los espermatozoides eupirenos desde la bolsa copulatoria a la spermateca.

Carabajal Paladino *et al.*, (2016) analizando los paquetes de espermatozoides de *T. absoluta* observaron un polimorfismo marcado entre los paquetes de esperma apireno y eupireno. En individuos irradiados como pupas maduras, con rayos X con un rango de dosis equivalente a 100 - 250 Gy, no se

constató un efecto significativo en la proporción de esperma apireno: eupireno; mientras que en los insectos irradiados con dosis mayores a 300 Gy, la proporción de apireno fue mayor. Por otra parte, la morfología de los paquetes de esperma eupireno se vio modificada con las distintas dosis de radiación con respecto a los individuos sin irradiar.

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido un análisis muy detallado del genoma de innumerables especies y la influencia de factores propios del organismo o externos a él sobre su composición y funcionamiento. Una de las metodologías para este tipo de estudios es la técnica denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite obtener en pocas horas millones de copias de una secuencia particular de ADN que es motivo de estudio. A partir de 1990, una modificación de la PCR, denominada, reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD-PCR) permitió utilizarla para amplificar un conjunto de locus distribuidos aleatoriamente a través del genoma, sin el conocimiento previo de secuencias específicas, facilitando el análisis genómico poblacional y taxonómico de distintas especies (Guirao *et al.*, 1994). Esta técnica ha sido utilizada para estudiar la diversidad genética de insectos, tales como el minador de hojas de cítrico *Phyllocnistis citrella* (Staiton) Lepidoptera: Gracillariidae (Álvarez y Hoy, 2003), la mosca de la fruta *C. capitata*, (Haymer *et al.*, 1997), la mosca blanca del tomate *B. tabaci* (Hasan 2006) y la polilla del tomate *T. absoluta* (Bettaibi *et al.*, 2012). También ha permitido identificar los posibles orígenes a partir de los cuales se dispersaron ya sea a zonas vecinas o a países de otros continentes (Bettaibi *et al.*, 2012).

Considerando los antecedentes mencionados, el objetivo del presente capítulo fue generar conocimientos útiles para el desarrollo de un método alternativo de diferenciación de insectos irradiados y su progenie de aquellos no irradiados. Al respecto, se analizaron los siguientes aspectos citológicos:

- 1) las alteraciones morfológicas inducidas en los paquetes de esperma y en el esperma eupireno responsable de la fertilidad, en individuos irradiados con dosis de 150 Gy y en sus descendientes de la generación F1.
- 2) el polimorfismo genético en insectos irradiados y sus descendientes F1 analizado mediante la técnica RAPD-PCR.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Obtención de los insectos e irradiación

Los individuos de *T. absoluta* utilizados en los experimentos se obtuvieron de la colonia de cría del Laboratorio de Control de Plagas (ver Capítulo II, Materiales y Métodos, procedimiento de obtención de insectos e irradiación). Para la obtención de machos F1, polillas machos de hasta 24 h de edad se irradiaron con 150 Gy luego de lo cual se cruzaron con hembras sin irradiar. Cada pareja se colocó en una jaula con una planta de tomate para la oviposición. Una vez desarrolladas las pupas de la generación F1, se sexaron y los machos se acondicionaron en bandejas plásticas con papel *tissu* hasta su emergencia.

4.2.2. I- Análisis morfológico de los paquetes de esperma eupireno y de los euespermatozoides de polillas irradiadas en estado adulto y su descendencia F1

4.2.2.1. Análisis morfológico de los paquetes de esperma eupireno

Para el análisis morfológico de los paquetes de esperma y de los euespermatozoides, machos irradiados con 150 Gy, de la F1 y controles no irradiados fueron sacrificados por congelación y colocados en microtubos tipo Eppendorf de 1,5 ml en freezer a -20 °C para su preservación hasta su disección.

Para la extracción de los testículos, los machos fueron sujetos sobre un bloque de parafina negra bajo estereomicroscopio (Figura 4.1). Cada testículo se disecó en solución fisiológica, se transfirió a un portaobjetos con 15 µl de ácido acético 60%, y su contenido se analizó bajo microscopio estereoscópico (Carl Zeiss) y microscopio óptico de contraste de fases (Olympus BX40), contabilizando la cantidad de los paquetes de esperma eupireno observados. La tinción del preparado se realizó con el agregado de 5 µl de orceína acética. Las muestras se analizaron bajo microscopio invertido con contraste de fase Olympus IMT-2 con aumento de 200x. Los paquetes

observados se clasificaron según su morfología en eupireno normal y eupireno deforme (Carabajal Paladino *et al.*, 2016). Se analizaron los paquetes de esperma de diez individuos para cada uno de los tratamientos.

Se realizó el conteo visual en zig-zag de los paquetes de esperma. Se clasificaron según su morfología en eupireno normal y eupireno deforme. Se calculó la proporción de esperma eupireno normal y de esperma eupireno anormal respecto del esperma eupireno total en los machos de cada tratamiento (parental irradiado, generación F1 y no irradiados). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor con tres niveles (control, parental irradiado con 150 Gy y descendiente F1). Las medias entre los tratamientos se compararon mediante una prueba LSD con un nivel de significancia de 0,05 (StatSoft, 2005).



Figura 4.1. Testículo de *Tuta absoluta* sin irradiar. MVYusef

4.2.2.2. Análisis morfológico de los euespermatozoides

Para el análisis morfológico de los euespermatozoides, los testículos fueron colocados en un tubo tipo Eppendorf con 100 µl de una solución de ácido acético 60% / tritón 5%. Se agitó vigorosamente en Vortex por 10 seg para favorecer la disgregación y se centrifugó 5 min a 14.000 RPM. El precipitado se suspendió en 15 µl de ácido acético 60 % y se colocó en una plancha térmica a 55 °C para su fijación, se tiñó con colorante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), provisto por Thermo Fisher Scientific. Se observó la morfología del esperma con microscopio de epifluorescencia, Carl Zeiss Axiolab, clasificándolo en euespermatozoides normales y anormales (Carabajal Paladino *et al.*, 2016) utilizando un aumento total de 400x. Se analizó el esperma de diez individuos para cada uno de los tratamientos. Se calculó la proporción de euespermatozoides normales y de euespermatozoides anormales respecto del total de euespermatozoides. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor con tres niveles (control, parental irradiado y descendiente F1). La comparación de medias se hizo mediante la prueba LSD con un nivel de significancia de 0,05 (Statistica for Windows version 7.1).

4.2.3. II- Análisis del polimorfismo del ADN entre insectos irradiados y no irradiados de *Tuta absoluta* mediante la técnica de RAPD-PCR

Se extrajo el ADN genómico de diez polillas individuales de cada variante: no tratadas (control), irradiadas con 150 Gy y descendientes F1 de machos irradiados con 150 Gy. El ADN fue aislado según las indicaciones del fabricante (Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen)). Previamente se realizó una disgregación mecánica previa utilizando una solución conteniendo Tris-ClH 50 mM, pH=8, EDTA 10 mM, ClNa 10 mM SDS 0,5% y proteinasa K 100 µg/ml finales y una incubación a 37 °C durante 3 h. La cuantificación y la pureza del ADN obtenido se determinaron por espectrofotometría (DeNovix DS-11 Spectrophotometer) a las longitudes de onda de 260 y 280 nm, obteniendo un

valor de la relación 260/280 entre 1,8 y 2 totalmente aceptable. La integridad del ADN fue evaluada utilizando un gel de agarosa al 0,8% (dato no mostrado).

Para el análisis del polimorfismo por medio de la aplicación de la técnica de RAPD-PCR ADN las reacciones de amplificación de cada muestra de ADN fueron realizadas en un volumen final de 30 µl conteniendo 50 ng de ADN, 10 µM de uno de los *primers* y el volumen necesario de solución Premixed 2X de Taq DNA Polymerase, dNTPs (Promega).

La amplificación se realizó de la siguiente manera: inicialmente 5 min a 94 °C como paso previo a los 41 ciclos. Cada ciclo estuvo constituido por 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 34 °C (hibridación de los *primers*), 1 min a 72°C (extensión por la ADN polimerasa) y luego de los 41 ciclos, 10 min a 72°C para extensiones adicionales. Se utilizó un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

El análisis del tamaño de los fragmentos amplificados se realizó mediante una electroforesis con agarosa 2% en buffer 1X TBE (Tris-hidroxiometil-aminometano) Borato (Ácido Bórico) EDTA (Ácido Etilendiamino tetra acético) (SIGMA–ALDRICH) y 0,5 ug/ml de colorante (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain-Biotium) durante 2 h a 80 V constante. El registro fotográfico se realizó mediante un analizador de imágenes (D-DiGit Gel Scanner) y la determinación del tamaño de los fragmentos utilizando un marcador de 1kb DNA ladder (Promega)

Los cinco oligonucleótidos utilizados como *primers* fueron sintetizados y provistos por Biodynamics Argentina con las secuencias propuestas por Bettaibi *et al.* (2012) (Tabla 4.1).

Primer	Secuencia 5' - 3'
OP-H9	TGT AGC TGG G
OP-A17	GAC CGC TTG T
OP-A8	GTG ACG TAG G
OP-D12	CAC CGT ATC C
OP-D13	GGG GTG ACG A

Tabla 4.1. Secuencia de nucleótidos de primer usados para el análisis de RAPD-PCR (Bettaibi *et al.*, 2012)

Para evaluar la diversidad genética entre tratamientos, se generó una matriz binaria en la que los datos fueron 1 o 0 según la presencia o ausencia de bandas para cada uno de los *primers* y para cada variante (controles, irradiados con 150 Gy y F1). Las bandas en cada tratamiento se compararon utilizando la fórmula del índice de similitud de Nei y Li (1979), que refleja el grado de compartición de bandas entre individuos para datos moleculares (Dice, 1945; Nei y Li, 1979). Este índice promedia los valores de similitud por par de individuos, mediante la siguiente ecuación:

$$S_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Dónde:

S_{ij} = similitud entre los individuos i y j ;

a = número de loci compartidos por i y j ;

b = número de loci presentes en i pero ausentes en j ; y

c = número de loci presentes en j pero ausentes en i .

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Análisis morfológico de los paquetes de esperma eupireno y de los euespermatozoides de polillas irradiadas en estado adulto y su descendencia F1

4.3.1.1. I- Análisis morfológico de los paquetes de esperma eupireno

El análisis de los paquetes eupireno presentes en los testículos de los individuos irradiados permitió diferenciar alteraciones morfológicas respecto a los controles, inducidas por la radiación gamma. Estas alteraciones se manifiestan ya sea en la morfología de los paquetes como en la distribución en su interior de los euespermatozoides.

En los machos control, los núcleos de los euespermatozoides se encuentran agrupados y dispuestos de manera ordenada en la misma dirección. Sus núcleos se tiñen de manera homogénea, lo cual indica que los euespermatozoides presentan cantidades similares de cromatina (Figura 4.2). Por el contrario, en los machos irradiados con dosis de 150 Gy, se observa una desorganización del material nuclear. La tinción de los núcleos permite observar que estos están distribuidos en forma no homogénea, desordenados, tanto en la cabeza como en el centro del paquete. Por otra parte, los paquetes presentan una mayor ondulación con respecto a los de los individuos no tratados (Figura 4.3).

En los machos de la F1, se observa una mayor desorganización de los núcleos con respecto a los controles e inclusive en comparación con los irradiados con 150 Gy. Estos se encuentran dispuestos de manera discontinua, observándose patrones de tinción irregular (Figura 4.4). Este grupo de núcleos teñidos heterogéneamente revelan que la cantidad de material de cromatina en cada núcleo de los euespermatozoides de machos estériles F1 es aún más variable y desorganizada en comparación con las polillas irradiadas con 150 Gy, y que los paquetes presentan varias ondulaciones que no se presentan en las polillas controles ni en las irradiados con 150 Gy.



Figura 4.2. Paquete de esperma eupireno en macho de *Tuta absoluta* normal sin irradiar. La flecha blanca indica la posición de los núcleos en la cabeza del paquete. MVYusef

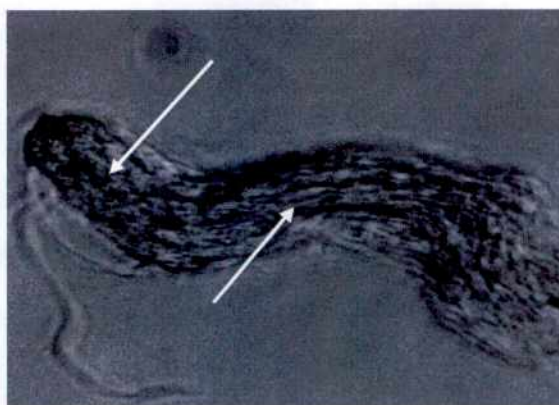


Figura 4.3. Paquete de esperma eupireno en macho de *Tuta absoluta* irradiado con dosis de 150 Gy. Las flechas blancas indican la posición de los núcleos. MVYusef



Figura 4.4. Paquete de esperma eupireno en macho hijo de padre irradiado de *Tuta absoluta* (F1). Las flechas blancas indican la posición de los núcleos. MVYusef

La proporción de paquetes de esperma eupireno normal/esperma eupireno total fue de 0,92 para las polillas no irradiadas. Esta proporción disminuyó a 0,63 y 0,27 para los individuos irradiados y su progenie F1, respectivamente (Figura 4.5). Estas diferencias entre los tratamientos fueron estadísticamente significativas ($F_{1,19} = 53,29$, $p < 0,05$).

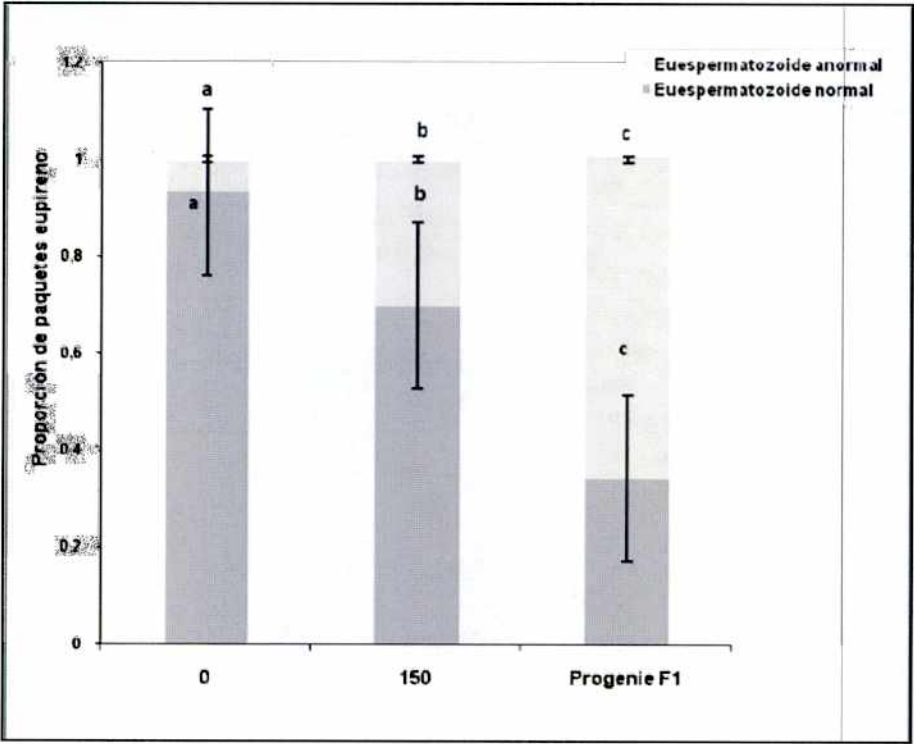


Figura 4.5. Proporción de paquetes de esperma eupireno normal y anormal en testículos de machos de *Tuta absoluta* con diferentes dosis de radiación gamma aplicada y sus descendientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$).

4.3.1.2. *Análisis morfológico de los euespermatozoides*

El análisis morfológico del esperma permitió observar alteraciones en la cabeza de euespermatozoides provenientes de insectos irradiados, F1 y controles. Las cabezas de los euespermatozoides en los machos normales son ligeramente onduladas (Figura 4.6), mientras que en los machos irradiados

presentan un ángulo particular en forma de V (Figura 4.7) y en sus hijos se observan enruladas (Figura 4.8).

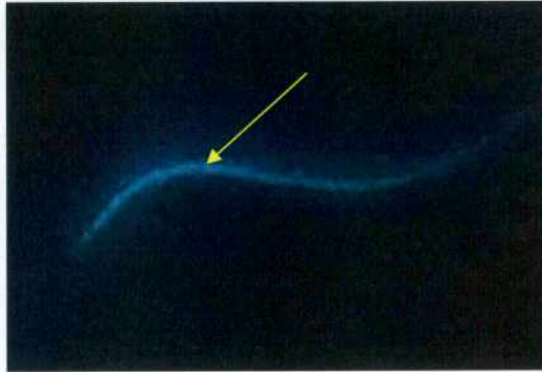


Figura 4.6 Cabeza de euespermatozoide en macho de *Tuta absoluta* normal. MVYusef

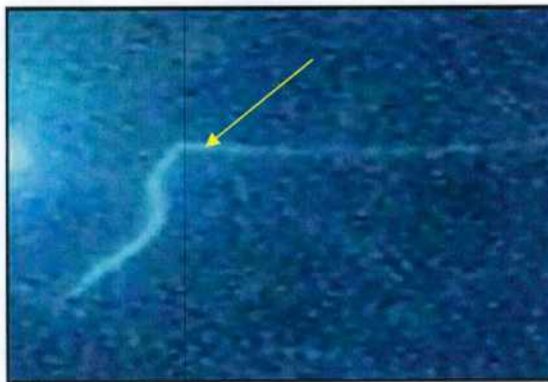


Figura 4.7 Cabeza de euespermatozoide en macho de *Tuta absoluta* irradiado con 150 Gy. MVYusef



Figura 4.8 Cabeza de euespermatozoide en macho de *Tuta absoluta* progenie F1 de padre irradiado con 150 Gy. MVYusef

La proporción de euespermatozoides normales anormales / euespermatozoides total fue de 0,93, 0,70 y 0,34 en los individuos normales, irradiados y descendientes F_1 , respectivamente (Figura 4.9). Estas diferencias entre los tratamientos fueron estadísticamente significativas ($F_{1,19} = 92,15$ $p < 0,05$).

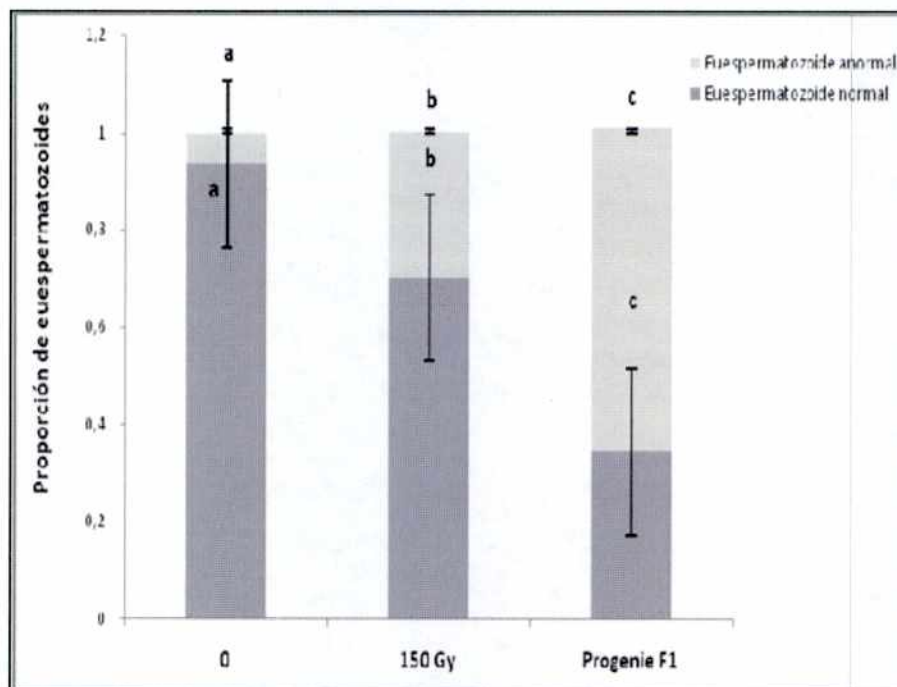


Figura 4.9: Proporción de euespermatozoides normales y anormales en testículos de machos de *Tuta absoluta* con diferentes dosis de radiación gamma aplicada y sus descendientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$).

4.3.2. II- Análisis del polimorfismo del ADN entre insectos irradiados y no irradiados de *Tuta absoluta* mediante la técnica de RAPD-PCR

El análisis del polimorfismo del ADN de los tres grupos (control, 150 Gy y F_1), con los *primers* utilizados, reveló que el número total de fragmentos amplificados fue de 65, distribuidos en 15 para el *primer* OP-H9, 18 para OP-A17, 12 para OP-A8, 10 para OP-D13 y 10 fragmentos con el OP-D12. El tamaño de estos varió entre 417 pb con el *primer* OP-D12 y 66 pb con el *primer* OP-D13.

Los tres tratamientos compartieron fragmentos amplificados de distintos tamaños según el *primer* utilizado: con el *primer* OP-H9 fragmentos de 230 y 76 pb; con el OP-A17 fragmentos de 238, 181, 156, 123 y 112 pb; con el OP-A8 un fragmento de 196 pb; con el OP-D13 fragmentos de 354, 172, 153, 128, 107, 89 y 66 pb y con el OP-D12 fragmentos de 309, 175 y 155 pb (Figuras 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 y Tablas 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6).

En los controles se observaron 11, 12, 7, 9 y 8 fragmentos con los *primers* OP-H9, OP-A17, OP-A8, OP-D13 y OP-D12, respectivamente (Figuras 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 y Tablas 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6). Por otro lado, se observaron 6 bandas de 310, 198, 147, 134, 108 y 105 pb; 5 bandas de 384, 311, 284, 260, 161 y 97 pb; 2 bandas de 159 y 137 pb; 3 bandas de 417, 258 y 229 pb con los *primers* OP-H9, OP-A17, OP-A8 y OP-D12, respectivamente, específicas de los controles y no halladas en los individuos irradiados y en su progenie F1 (Figuras 4.10, 4.11, 4.13, 4.14 y Tablas 4.2, 4.3, 4.4, 4.6).

En los adultos irradiados con 150 Gy se observaron fragmentos de tamaños específicos de 99 y 88 pb con el *primer* OP-H9; fragmentos de 99 y 94 pb con el *primer* OP-A17; un fragmento de 82 pb con el *primer* OP-A8 y dos fragmentos de 122 y 108 pb con el *primer* OP-D12 (Figuras 4.10, 4.11, 4.12, 4.14 y Tablas 4.2, 4.3, 4.4, 4.6).

En la progenie F1 de padres irradiados con 150 Gy, se observaron fragmentos específicos de 142 pb con el *primer* OP-H9, fragmentos de 217, 204 y 103 pb con el *primer* OP-A17; fragmentos de 150, 133 y 105 pb con el *primer* OP-A8 y un fragmento de 206 pb con el *primer* OP-D13 (Figuras 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 y Tablas 4.2, 4.3, 4.4, 4.5).

Tanto las polillas irradiadas como sus descendientes compartieron fragmentos en común de tamaños de 126 pb con el *primer* OP-H9; de 147 pb con el *primer* OP-A17 y de 118 pb con el *primer* OP-A8 (Figuras 4.12, 4.13, 4.14 y Tablas 4.2, 4.3, 4.4).

No se observaron fragmentos específicos en el tratamiento de irradiación con el *primer* OP-D13 y en su progenie F1 con el *primer* OP-D12 (Figuras 4.13, 4.14 y Tablas 4.5, 4.6)

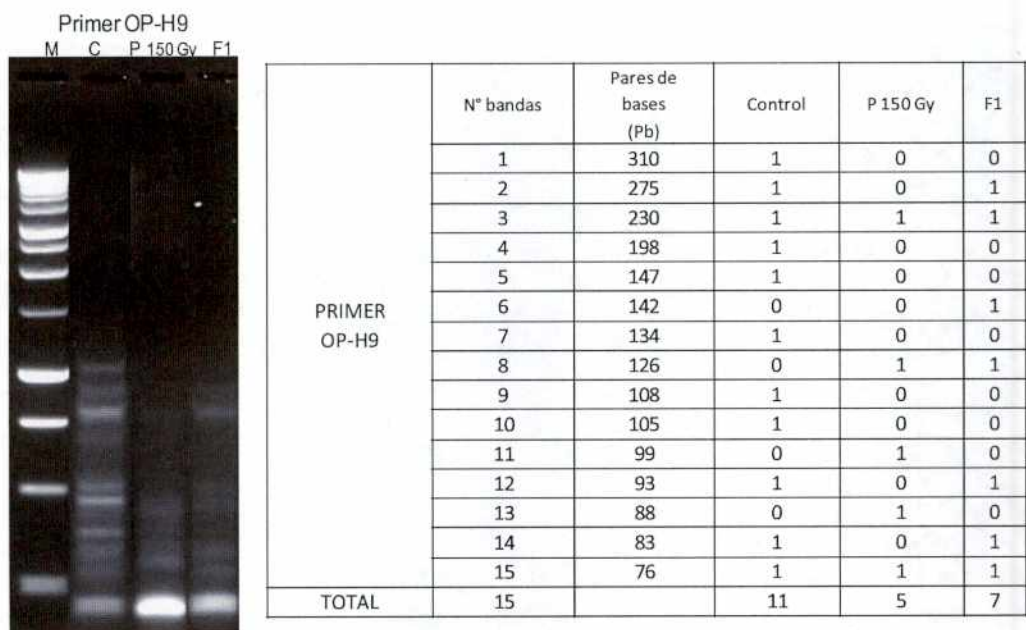


Figura 4.10. Patrón representativo de RAPD-PCR en geles de agarosa al 2 % resultante de la amplificación del ADN genómico de machos adultos de *Tuta absoluta* utilizando el *primer* OP-H9. M: marcador, C: control, P 150 Gy: padre irradiado con 150 Gy, F1 hijo de padre irradiado.

Tabla 4.2. Polimorfismo de ADN de *Tuta absoluta* usando amplificación aleatoria de ADN (RAPD) con *primer* OP-H9 para control sin tratar, padres tratados con 150 Gy, progenie F1. 1: significa la presencia de la banda.0: significa la ausencia de banda.

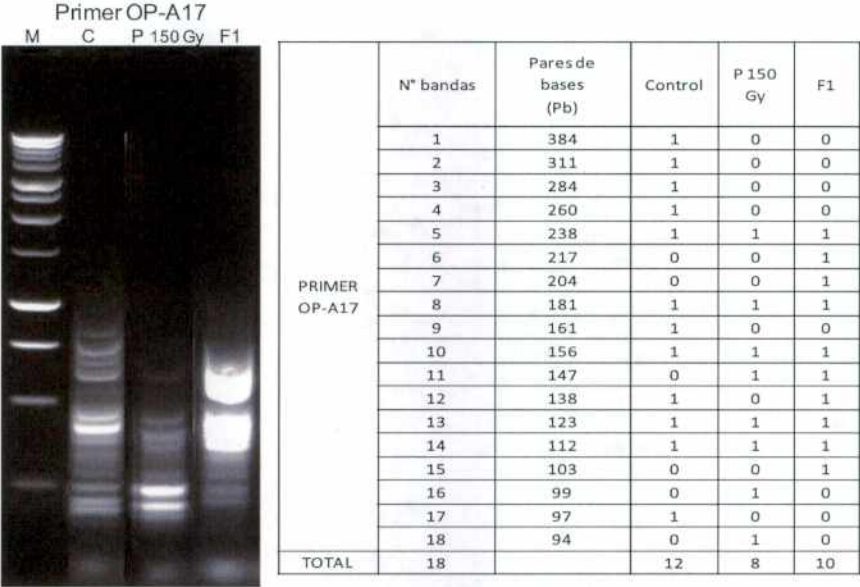


Figura 4.11. Patrón representativo de RAPD-PCR en geles de agarosa al 2 % resultante de la amplificación del ADN genómico de machos adultos de *Tuta absoluta* utilizando el *primer* OP-A17. M: marcador, C: control, P 150 Gy: padre irradiado con 150 Gy, F1 hijo de padre irradiado.

Tabla 4.3. Polimorfismo de ADN de *Tuta absoluta* usando amplificación aleatoria de ADN (RAPD) con *primer* OP-A17 para control sin tratar, padres tratados con 150 Gy, progenie F1. 1: significa la presencia de la banda.0: significa la ausencia de banda.

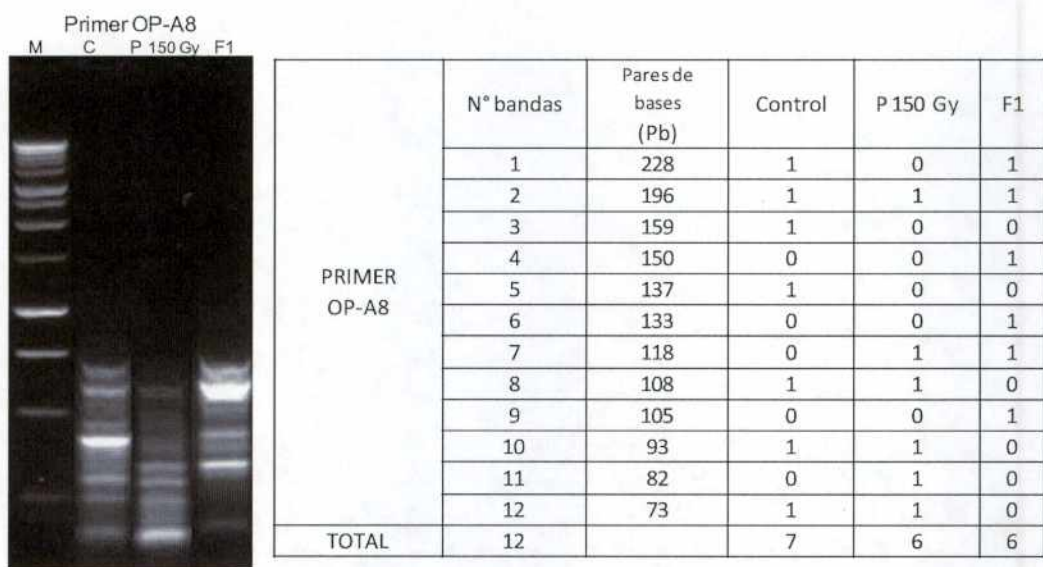


Figura 4.12. Patrón representativo de RAPD-PCR en geles de agarosa al 2 % resultante de la 4.12amplificación del ADN 4.4genómico de machos adultos de *Tuta absoluta* utilizando el *primer* OP-A8. M: marcador, C: control, P 150 Gy: padre irradiado con 150 Gy, F1 hijo de padre irradiado.

Tabla 4.4. Polimorfismo de ADN de *Tuta absoluta* usando amplificación aleatoria de ADN (RAPD) con *primer* OP-A8 para control sin tratar, padres tratados con 150 Gy, progenie F₁. 1: significa la presencia de la banda.0: significa la ausencia de banda.

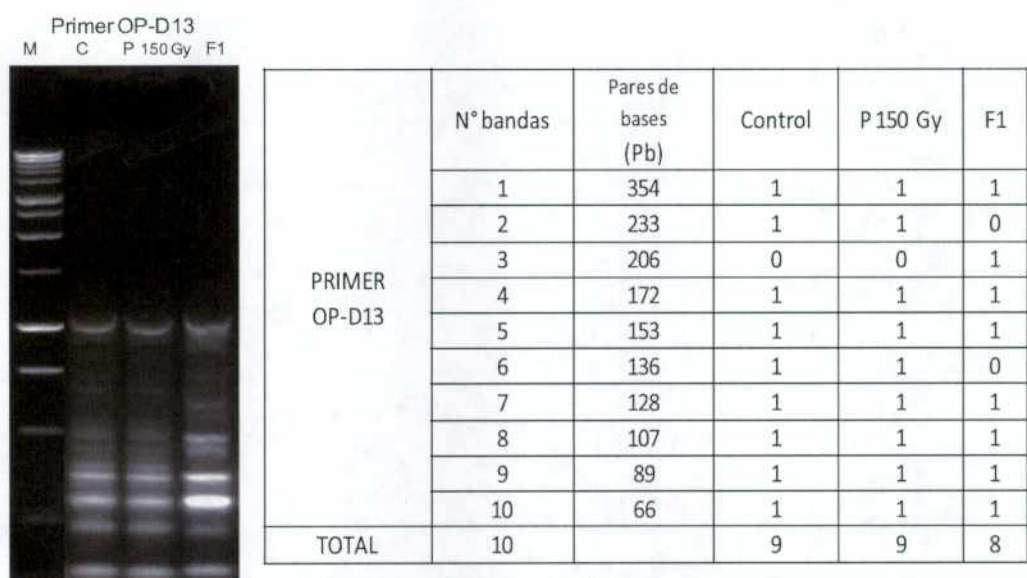


Figura 4.13. Patrón representativo de RAPD-PCR en geles de agarosa al 2 % resultante de la amplificación del ADN genómico de machos adultos de *Tuta absoluta* utilizando el *primer* OP-D13. M: marcador, C: control, P 150 Gy: padre irradiado con 150 Gy, F1 hijo de padre irradiado.

Tabla 4.5. Polimorfismo de ADN de *Tuta absoluta* usando amplificación aleatoria de ADN (RAPD) con *primer* OP-D13 para control sin tratar, padres tratados con 150 Gy, progenie F1. 1: significa la presencia de la banda.0: significa la ausencia de banda.

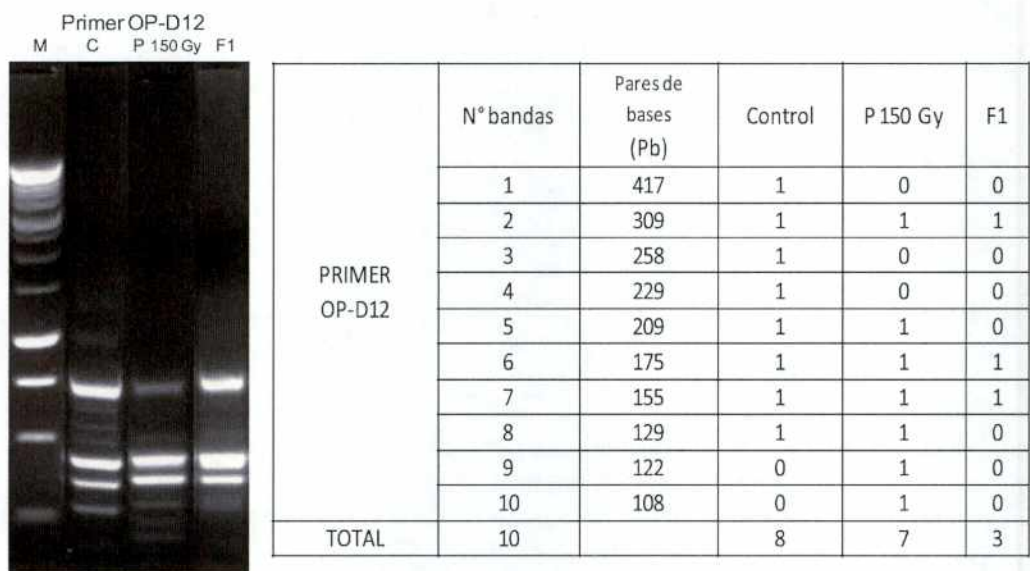


Figura 4.14. Patrón representativo de RAPD-PCR en geles de agarosa al 2 % resultante de la amplificación del ADN genómico de machos adultos de *Tuta absoluta* utilizando el *primer* OP-D12. M: marcador, C: control, P 150 Gy: padre irradiado con 150 Gy, F1 hijo de padre irradiado.

Tabla 4.6. Polimorfismo de ADN de *Tuta absoluta* usando amplificación aleatoria de ADN (RAPD) con *primer* OP-D12 para control sin tratar, padres tratados con 150 Gy, progenie F₁. 1: significa la presencia de la banda. 0: significa la ausencia de banda.

Los mayores porcentajes de polimorfismos se obtuvieron con los *primers* OP-H9 y OP-A8 con valores de 87 % y 92 %, respectivamente. Mientras que con el *primer* OP-D13 se obtuvo solo un 30% de polimorfismo (Tabla 4.7).

Primer	Bandas Polimórficas	Bandas Monomórficas	Bandas Totales	% Polimorfismo
OP-H9	13	2	15	87
OP-A17	13	5	18	72
OP-A8	11	1	12	92
OP-D12	7	3	10	70
OP-D13	3	7	10	30
	47	18	65	

Tabla 4.7. Número total de productos de amplificación (bandas polimórficas y monomórficas) de los diferentes tratamientos: control, padre irradiado con 150 Gy e hijo F₁ de polillas macho de *Tuta absoluta* para los cinco *primers* evaluados.

La máxima similitud se observó para el *primer* OP-D13 entre las polillas control y las polillas tratadas y su descendencia, así como entre estas dos últimas (IS= 1, 0,82 y 0,82, respectivamente). Por el contrario, la menor similitud se observó con el *primer* OP-A8 entre la progenie F1 y el control y sus padres (IS= 0,15 y 0,33, respectivamente). También se observó una baja similitud con el *primer* OP-H9 entre el control y los irradiados y su descendencia (IS= 0,25 y 0,39, respectivamente) (Tabla 4.8).

	CONTROL	P 150 Gy	F1
OP-H9			
CONTROL	1	0,25	0,39
P 150 Gy		1	0,5
F1			1
OP-A17			
CONTROL	1	0,5	0,54
P 150 Gy		1	0,45
F1			1
OP-A8			
CONTROL	1	0,61	0,15
P 150 Gy		1	0,33
F1			1
OP-D12			
CONTROL	1	0,67	0,54
P 150 Gy		1	0,6
F1			1
OP-D13			
CONTROL	1	1	0,82
P 150 Gy		1	0,82
F1			1

Tabla 4.8. Índice de similitud de Nei - Li del ADN de polillas de *Tuta absoluta* entre los diferentes tratamientos (Control, P 150 Gy: padre irradiado con 150 Gy y F1: hijo de la generación F1). Rojo: baja similitud; azul: alta similitud.

4.4. DISCUSIÓN

Las radiaciones ionizantes generan distintos tipos de lesiones y la existencia de mecanismos de reparación permite la corrección de la mayoría de estas alteraciones dependiendo de la dosis, la tasa de dosis y del tipo celular, entre otras variables (Hall y Giaccia, 2012). Dado que algunas alteraciones no pueden ser corregidas, las células mueren o pueden sobrevivir portando mutaciones. Ha sido demostrado desde hace mucho tiempo que las células germinales son muy radiosensibles (Riemann y Flint, 1967) y un individuo puede resultar estéril debido al daño causado en el ADN de estas células (Dohino y Tanabe, 1994).

En el caso particular de Lepidoptera, la espermatogénesis del esperma eupireno es altamente sensible a las radiaciones ionizantes (Friedländer, 1997). Por lo tanto, es razonable que se produzcan reordenamientos nucleares en los euespermatozoides luego de la irradiación. La morfología de la cabeza de los espermatozoides está determinada por patrones específicos de agregación de la cromatina (Bao y Dolder 1991). Debido a la generación de rearreglos cromosómicos provocados por la radiación, la morfología de la

cabeza de los espermatozoides se altera y esto, a su vez, determina que los espermatozoides se distribuyan de una forma anómala dentro del paquete, lo cual ha sido descrito en distintas especies de lepidópteros irradiados (Carpenter *et al.*, 2009). Este tipo de alteraciones en los espermatozoides podría explicar la observación de los paquetes eupirenos deformes en los machos de *T. absoluta*.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la distribución del esperma dentro del paquete en los machos irradiados fue muy variable y desorganizada en comparación con machos controles. Esta característica es aún más notable en los individuos de la F1. Estos resultados son consistentes con los hallazgos de Carabajal Paladino *et al.* (2016), quienes observaron que individuos irradiados con dosis de radiación X equivalente a 100, 150, 200 y 250 Gy mostraron diferencias en la morfología de los paquetes y en el esperma eupireno. Por otra parte, Tothová y Marec (2001), señalaron que varios tipos de translocaciones cromosómicas generan gametos genéticamente desequilibrados en la progenie F₁ proveniente de padres irradiados en *E. kuehniella*. Carpenter *et al.* (2009), analizando los paquetes de espermatozoides de 6 especies de lepidópteros la polilla de la manzana (*C. pomonella*); la polilla sudamericana del cactus (*C. cactorum*); la polilla dorso de diamante (*P. xylostella*); la polilla pintada de la manzana (*T. anartoides*), la isoca de la espiga (*H. zea*) y el cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)), mostraron una disposición ordenada y agrupada de los espermatozoides en uno de los extremos del paquete, lo cual es una característica de los individuos no irradiados. Por otra parte, observaron que los machos F1 (estériles) de padres irradiados se pueden distinguir de los machos fértiles en función de la homogeneidad de la tinción de los paquetes de esperma eupireno independientemente de la familia evaluada. Del mismo modo, las diferencias observadas en la morfología de los paquetes de esperma y en la distribución de los espermatozoides dentro del paquete en los machos irradiados de *T. absoluta* y su progenie F1 podrían ser utilizadas para diferenciar el origen de polillas atrapadas en las trampas de monitoreo en programas de liberación de polillas estériles. La limitante que presenta esta técnica del análisis de paquetes de esperma y esperma individual es que no puede utilizarse con polillas muertas recolectadas en las trampas que se

encuentran en malas condiciones ya que no es posible procesar las gónadas para coleccionar el esperma (Carpenter *et al.*, 2009).

Otra herramienta alternativa que no depende de las condiciones en la que se encuentra la polilla en la trampa, puede ser el uso de marcadores moleculares, esto es, segmentos de ADN que permiten identificar variaciones entre individuos y determinar su diversidad genética. Varias metodologías se han utilizado siendo las más comunes: la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), las secuencias simples repetidas (SSR) y los polimorfismo de nucleótido único (SNP) (Njambere *et al.*, 2010). Ceñis *et al.* (1993) afirmaron que la amplificación aleatoria de ADN polimórfico - reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) era una opción factible para diferenciar especies dentro del género *Aphis* (Hemípteros: Aphididae). Del mismo modo, Zaghloul (2004) estudió los patrones de fragmentos amplificados por PCR de los coleópteros *Callosobruchus maculatus* de ambos sexos irradiados y normales demostrando la aparición de algunas bandas adicionales y la desaparición de otras como resultado de la irradiación, atribuyéndolo al mecanismo de reparación que se produce en el ADN dañado. Rizk y Mikhael (2008) estudiaron los patrones de fragmentos amplificados de ADN de padres machos adultos y machos F1 de *S.cerealella* y demostraron que la exposición a la radiación gamma provocaba muy frecuentemente la aparición de algunas bandas extra y deficiencia de otras, así como la similitud en los patrones de ADN entre insectos normales. Similares resultados fueron obtenidos por Abulyasid *et al.* (2007) en *S. littoralis* y Abd-ElAziz y Haiba (2008) en *P. operculella*.

Estas variaciones en los patrones de los fragmentos amplificados entre los individuos irradiados y su descendencia y especímenes normales son dependientes del *primer* utilizado, de la dosis, del tipo de radiación y de la especie de insecto. En esta tesis, la utilización de cinco *primers* permitió amplificar y analizar los tamaños de diferentes fragmentos de ADN provenientes de adultos de polilla del tomate no tratados y de individuos tratados y su descendencia. Particularmente, el empleo de los *primers* OP-H9 y OP-A8 indicó un alto grado de polimorfismo entre los tres grupos con lo cual se podría usar como método de identificación de los insectos irradiados liberados

y de su descendencia F1. La aparición de nuevas bandas en los insectos irradiados o de la F1 puede ser debida a rearrreglos cromosómicos o mutaciones que generaron nuevos sitios complementarios a los *primers* utilizados.

El uso de la técnica de la PCR-RADP se presenta como una alternativa factible de utilizar respecto del análisis espermático en el caso de polillas que no se encuentren en buenas condiciones de preservación. Estos métodos podrían determinar directamente el origen/historial de la polilla atrapada en las trampas dentro de un programa de EH y podrían adaptarse para otras plagas de lepidópteros a ser utilizadas en programas de control de plagas a través del uso de esta técnica.

4.5. CONCLUSIÓN

La radiación gamma provoca un aumento en la proporción de euespermatozoides anormales en los individuos irradiados y en sus descendientes. El análisis morfológico de los paquetes de esperma y del esperma individual permite distinguir los machos fértiles normales de los insectos irradiados y su progenie F1 por la morfología de los paquetes y por la disposición y forma de los núcleos de los euespermatozoides.

La alteración inducida por la radiación gamma en adultos de *T. absoluta* genera un polimorfismo que puede ser detectado a través de la aparición y desaparición de algunas bandas en los geles de agarosa a través de la técnica de RAPD-PCR. La utilización de los primer OP-H9 y OP- A8 permitiría detectar el mayor grado de polimorfismo entre insectos controles, irradiados y sus descendientes F1.

Debido a que la técnica del análisis morfológico de los paquetes de esperma y el esperma tiene un uso limitado en polillas muertas que se encuentran en un estado importante de deterioro, se propone como método más adecuado el análisis del polimorfismo del ADN mediante la técnica RAPD-PCR, siendo los primers recomendados el OP-H9 y el OP- A8.

CONCLUSIONES GENERALES

Pese al uso de insecticidas de amplio espectro para controlar muchas plagas de insectos de importancia agropecuaria, los daños provocados por ellas antes o después de la cosecha contribuyen significativamente a la pérdida de alimentos en el mundo. Por lo tanto, se necesitan tácticas y estrategias nuevas e innovadoras para el control de plagas que sean efectivas y ambientalmente no perjudiciales. Como parte del conjunto de tácticas de control respetuosas con el ambiente, la EH ha demostrado ser una herramienta muy eficaz contra diversas plagas de insectos.

La presente tesis ha contribuido con la generación de conocimientos acerca del efecto de la radiación gamma sobre parámetros biológicos de *T. absoluta*, siendo este un aporte de base para el desarrollo de la EH. Asimismo, se ha probado la capacidad de esta técnica de suprimir poblaciones silvestres de la polilla en condiciones semicontroladas mediante el uso de jaulas en invernáculo. Por otra parte, se generó información sobre métodos de identificación de insectos irradiados y sus descendientes, lo cual es fundamental para evaluar la efectividad de la EH a campo. Todas estas contribuciones son de importancia para evaluar a futuro el uso de la EH para el control de la polilla del tomate en cultivos comerciales en invernáculo y a campo.

Los resultados alcanzados permiten llegar a las siguientes conclusiones generales:

- La aplicación de radiación gamma sobre adultos de *T. absoluta* puede ser utilizada para generar Esterilidad Heredada (EH).
- Un rango de temperaturas de 2 a 5 °C es adecuado para la conservación y manipuleo de los adultos en el proceso de irradiación.
- La exposición de los adultos de *T. absoluta* a una dosis de radiación gamma de 150 Gy, tasa de dosis de 36 Gy/min y uniformidad de dosis (UD) de 1.1, permite obtener hembras totalmente estériles y machos parcialmente estériles con capacidad competitiva para la dispersión y la cópula en relación con los machos no irradiados.

- Los individuos irradiados y sus descendientes son capaces de provocar una disminución en el tamaño poblacional de polillas de *T. absoluta* sin irradiar a través del tiempo.
- La diferencia observada en la morfología y distribución de los espermatozoides de *T. absoluta* entre machos irradiados y su progenie F1 respecto de machos normales puede ser utilizada para diferenciar el origen de polillas atrapadas en las trampas de monitoreo en programas de liberación de polillas estériles. Sin embargo, esta metodología tiene un uso limitado puesto que solo podría aplicarse a especímenes en buen estado de conservación.
- El análisis del polimorfismo del ADN hallado entre individuos irradiados, sus descendientes y normales mediante el uso de la técnica de la PCR-RADP se presenta como una alternativa factible de utilizar en el caso de polillas que no se encuentren en buenas condiciones de preservación. Estos métodos podrían determinar directamente el origen/historial de la polilla atrapada en las trampas dentro de un programa de EH y podrían adaptarse para otras plagas de lepidópteros a ser utilizadas en programas de control de plagas a través del uso de la EH.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-El Aziz, M.F. y Haiba, I.M. (2008). *Effect of γ radiation on the genomic DNA of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera – Gelechiidae)*. Isotope and Radiation Research 40(3):779–791.
- Abd El-Kader, T.S.E. (2013). *Inherited sterility in the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*, (Boisd), and changes in the DNA pattern as a result of using gamma radiation*. Theses (Ph.D.) 301 p.
- Abdu, R.M., Abdel-Kader, M.M., Hussein, M.A. y Abdel-Rahman, H.A. (1985). *Biological effects of gamma radiation on stored product insects. 4-radiation effects on sex pheromone production and perception by the rust-red flour beetle *Tribolium castaneum* (herbst)*. Qatar University Science. 5:286–289.
- Abulyazid, I., Ibrahim, S.M., El-Shikh, M.A. y Abdlhamid, W. A. (2007). *Effect of pupal substerilizing doses 200 and 250 Gy upon the genetic material of the genetic material of the cotton leaf moth *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)*. Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development 8(1):19–27.
- Ahmad, N., Ashraf, M., Hussain, T., y Qureshi, Z.A. (2002). *Feasibility of integrating radiation-induced F1 sterility and biological control for population suppression of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*, in Pakistan* (IAEA-TECDOC-1283). International Atomic Energy Agency (IAEA); Final research co-ordination meeting on evaluation of Lepidoptera population suppression by radiation induced sterility; Penang (Malaysia); 28 May - 2 Jun 1998. 69-79.
- Al-Taweel, A. A., Ahmed, M.S.H., Kadhum, S. S. y Hameed, A. A. (1990). *Effects of gamma radiation on the progeny of irradiated *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) males*. Journal of Stored Products Research. 26: 233–236.
- Álvarez, J.M., y Hoy, M.A. (2003). *Molecular markers in classical biological control of the citrus leaf miner: taxonomic and ecological evaluations*. In Driesche, R.G. (ed.) Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods, Honolulu, Hawaii. 14-18 January 2002. USDA-Forest Service Forest Health Technology Enterprise Team, Morgantown, West Virginia, USA.
- Araujo, M.M.; Salas, F.J.S. y Arthur, V. (2022). *Marcação de insetos para estudos ecológicos*. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. 121: 1-14.
- Arthur, V. (2004). *Use of gamma radiation to control three Lepidopteran pests in Brazil. Irradiation as a phytosanitary treatment of food and agricultural commodities*. In: Proceeding sof the final research coordination meeting organized by the joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, 2002, Vienna, Austria. 45–50.

- Asociación Tomate 2000. (2021). *Programa para el aumento de la competitividad de la industria del tomate (PACIT) Informe progresos 2020-2021*. INTA Centro Regional Mendoza – San Juan Estación Experimental Agropecuaria La Consulta, La Consulta, San Carlos, Mendoza, Argentina Ediciones INTA. 301 p.
- Bahamondes, L.A. y Mallea, A.R. (1969). *Biology in Mendoza of Scrobipalpula absoluta (Meyrick) Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), a new species for the Argentine Republic*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (Argentina). 15: 96-104.
- Bailey, S.F., Eliason, D.A. y Iltis, W.G. (1962). *Some marking and recovery techniques in Culex tarsalis Coq. flight studies*. Mosquito News. 22(1): 1-10.
- Bajracharya, A.S.R., Mainali, R.P., Bhat, B., Bista, S., Shashank, P.R. y Meshram, N. M. (2016). *The first record of South American tomato leaf miner, Tuta absoluta (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Nepal*. Journal of Entomology and Zoology Studies. 4(4): 1359–1363.
- Bakri, A., Mehta, K. y Lance, D.R. (2021). *Sterilizing insects with ionizing radiation*. In V. A. Dyck, J. Hendrichs, y A. S. Robinson (Eds.), *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* 2nd ed., 355–398.
- Bakri, A., Mehta K. y Lance, D.R. (2005). *Sterilizing insects with ionizing radiation*. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS (eds.) *Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer, Dordrecht, 233–268.
- Ballinger-Crabtree, M. E.; Black, W.C. y Miller, B.R. (1992). *Use of genetic polymorphisms detected by RAPD-PCR for differentiation and identification of Aedes aegypti subspecies and populations*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 47: 893-901.
- Bao, S.N., y Dolder, H. (1991). *Abnormal characteristics observed in spermatogenic cells during spermiogenesis in the RA mutant of Ceratitis capitata (Diptera, Tephritidae)*. Revista Brasileira de Genética (Brazilian Journal of Genetics); (Brazil), 14(2).
- Barrientos, R. (1997). *Determinación de la constante térmica de desarrollo para la polilla del tomate, Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Tesis Ing. Agr. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 44p.
- Bartlett A.C. y Staten R.T. (2003). *The Sterile Insect Release Method and other generic control strategies*. <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bartlett.htm>
- Batiste, W.C. y Olson, W.H. (1973). *Codling moth: mass production in controlled environment rearing units*. Journal of Economic Entomology. 66: 383–388.

- Benavent, J., Kueffner, E. y Vigiani, A. (1978). *Organización y planificación de la investigación para el desarrollo de un programa de control integrado de la polilla del tomate *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick), Lepidoptera: Gelechiidae, en la República Argentina*. Curso de Perfeccionamiento en Control Integrado de Plagas. Compendio, Tomo II. Buenos Aires, INTA. 16p.
- Betancourt, C. M. y Scatoni, I. B. (1995). *Description of the development stages of the "tomato borer", *Scrobipalpuloidea absoluta* (Meyrick) (Lep. Gelechiidae)*. Boletín de investigación, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. 45: 1-14.
- Bettaibi, A., Mezghani, K.M., Bouktila, D., Makni, H. y Makni, M. (2012). *Genetic variability of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae), in Tunisia, in ferred from RAPD-PCR*. Chilean Journal of Agricultural Research. 2: 212-216.
- Bimboni, H.G. (1977). *Polilla del tomate*. INTA Estación Experimental de San Pedro. Asociación Cooperadora; Boletín Rural nº 104.
- Black, W.C., DuTeau, N.M., Puterka, G.J., Nechols, J.R., y Pettorini, J.M. (1992). *Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae)*. Bulletin of Entomological Research. 82(2): 151-159.
- Bloem, K. A., Bloem, S. y Carpenter, J. E. (2005). *Impact of moth suppression/eradication programmes using the sterile Insect Technique or Inherited Sterility* In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS (eds) Sterile insect technique principles and practice in area-wide integrated pest management. Springer, Netherlands. 7(3): 677-700.
- Bloem, S., Bloem, K.A., Carpenter, J.E. y Calkins, C.O. (1999). *Inherited sterility in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): effect of substerilizing doses of radiation on insect fecundity, fertility, and control*. Annals of the Entomological Society of America. 92: 222-229.
- Bloem, S., Bloem, K.A. y Knight, A.L. (1998). *Assessing the quality of mass-reared codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) by using field release-recapture tests*. Journal of Economic Entomology. 91: 1122-1130.
- Bloem, S. y Carpenter, J.E. (2001). *Evaluation of population suppression by irradiated Lepidoptera and their progeny*. Florida Entomologist. 84:165-170.
- Bloem, S., Carpenter, J.E., Bloem, K. A., Tomlin, L., y Taggart, S. (2004). *Effect of rearing strategy and gamma radiation on field competitiveness of mass-reared codling moths (Lepidoptera: Tortricidae)*. Journal of Economic Entomology. 97(6): 1891-1898.
- Bloem, S., Carpenter, J.E. y Hofmeyr, J.H. (2003). *Radiation biology and inherited Sterility in false codling moth (Lepidoptera: Tortricidae)*. Journal of Economic Entomology. 96:1724-1731.

- Blomefield, T.L., Bloem, S. y Carpenter, J.E. (2010). *Effect of radiation on fecundity and fertility of codling moth Cydia pomonella (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) from South Africa*. Journal of Applied Entomology. 134: 216-220.
- Borrero-Echeverry, F., Barreto-Triana, N., Aragon, S., Rivera, H., Oehlschlager, C. y Cotes, A. (2018). *Pheromones in insect control*. In book: *Control Biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros*. Agentes de control biológico. Publisher: Agrosavia. 1: 453.
- Botto, E. N. (2011). *Reviewer's comments on New Pest Response Guidelines: Tuta absoluta* from Dr. Eduardo Botto to Dr. Esther Spaltenstein on January, 3: 2011p.
- Bouzo, C.A., Favaro, J.C., Pilatti, R.A. y Scaglia, E.M. (2005). *Cinturón hortícola de Santa Fe: descripción de la zona y situación actual*. Revista Fave– Ciencias Agrarias. 4: 1-2.
- Brower J.H. (1979) *Substerilising irradiation of Plodia interpunctella males: Effects on three filial generations*. Annals of the Entomological Society of America. 72: 716-720.
- Bushland, R.C. y Hopkins, D.E. (1951). *Experiments with screw-worm flies sterilized by X-rays*. Journal of Economic Entomology. 44(5).
- Cáceres, S. (1992). *La polilla del tomate en Corrientes. Biología y control*. Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista, INTA, 19 p.
- Cagnotti, C.L., Andorno, A.V., Hernández, C.M., Carabajal Paladino, L., Botto, E.N. y López, S.N. (2016). *Inherited sterility in Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae): pest population suppression and potential for combined use with a generalist predator*. Florida Entomologist. 99 (Special Issue 1): 87–94.
- Cagnotti, C.L., Viscarret, M.M., Riquelme, M.B., Botto, E.N., Carabajal, L.Z., Segura, D.F. y López, S.N. (2012). *Effects of X-rays on Tuta absoluta for use in inherited sterility programmes*. Journal of Pest Science. 85: 413-421.
- Calkins, C.O., y Parker, A.G. (2005). *Sterile insect quality*. In *Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management*. Dordrecht: Springer Netherlands. 269-296.
- Campos, R.G. (1976). *Control químico del "minador de hojas y tallos de la papa" (Scrobipalpula absoluta Meyrick) en el valle del Cañete*. Revista Peruana de Entomología. 19:102–106.
- Carabajal Paladino, L.Z., Ferrari, M.E., Lauría J.P., Cagnotti, C.L., Šichová, J. y López, S.N. (2016). *The effect of X-rays on cytological traits of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Florida Entomologist. 99 (Special Issue 1): 43-53.
- Cardozo, M.R., López, M.B., Evert, M.T., Palacio, C., Yasuda, S., Sugiyama, H., Mori, K., Kajita, M. y Sato, T. (1994). *Control integrado de la palomilla del tomate, Scrobipalpula absoluta (Meyrick, 1917)*. Instituto Agronómico Nacional (IAN) CAACUPE, Paraguay.

- Carpenter, J.E., Bloem S. y Bloem, K.A. (2001). *Inherited sterility in Cactoblastis cactorum (Lepidoptera: Pyralidae)*. Florida Entomologist 84:537–542.
- Carpenter, J.E., Bloem, S. y Marec, F. (2005). *Inherited sterility in insects*. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS (eds.). *Sterile insect technique principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer, Netherlands, 2(4):115–146.
- Carpenter, J.E., Blomefield, T. y Hight, S.D. (2013). *Comparison of laboratory and field bioassays of laboratory-reared Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae) quality and field performance*. Journal of Applied Entomology. 137: 631–640.
- Carpenter, J.E., Marti, O.G., Wee, S.L. y Suckling, D.M. (2009). *Cytological attributes of sperm bundles unique to F1 progeny of irradiated male Lepidoptera: relevance to sterile insect technique programs*. Florida Entomologist. 92:80–86.
- Carpenter, J.E., Rayani, H.I.D., Nelly, N. y Mullinix, B.G. (1997). *Effect of substerilizing doses of radiation on sperm precedence in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae)*. Journal of Economic Entomology. 90: 444–448.
- Carpenter, J.E., Young, J.R., Cromroy, H.L. y Sparks, A.N. (1987). *Corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae): comparison of field survival of larvae from normal and irradiated parents*. Journal of economic entomology. 80 (4): 883-886.
- Ceñis, J.L.; Pérez, P. y Fereres, A. (1993). *Identification of various aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR)*. Annals of the Entomological Society of America. 86(5):545-550.
- Chambers, D.L. (1977). *Quality control in mass rearing*. Annual Review of Entomology. 22(1): 289–308.
- Chang, H.T. (1946). *Studies on the use of fluorescent dyes for marking Anopheles quadrimaculatus Say*. Mosquito News. 6: 122-125.
- Coelho, M.C.F. y França, F.H. (1987). *Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 22(2): 129-135.
- Cook, P. A. y Wedell, N. (1996). *Ejaculate dynamics in butterflies: a strategy formaximizing fertilization success?* Proceedings of the Royal Society of London. Series B. 263: 1047- 1051.
- Cuthbertson, A.S., Mathers, J.J., Blackburn, L.F., Korycinska, A., Luo, W., Jacobson, R.J. y Northing, P. (2013). *Population Development of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under Simulated UK Glasshouse Conditions*. Insects. 4: 185-197.

- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K.A.G., Burgio, G., Arpaia, S., Narvaez-Vasquez, C.A., Gonzalez-Cabrera, J., Catalan Ruescas, 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*. Journal of Pest Science. 83:197–215.
- Desneux, N., Luna, M.G., Guillemaud, T., y Urbaneja, A. (2011). *The invasive South American tomato pinworm, Tuta absoluta, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production*. Journal of pest science. 84, 403-408.
- Dice, L.R. (1945). *Measures of the amount of ecologic association between species*. Ecology, 26 (3): 297-302.
- Dikomey, J., Dahm-Daphi, I., Brammer, R., Martensen, B. y Kaina, E. (1998). *Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines*. International journal of radiation biology. 73(3): 269-278.
- Dohino, T., y Tanabe, K. (1994). *Effects of electron beam irradiation on cut flowers and mites*. Shokuhin Shosha, 29(1-2): 21-27.
- Dongre, T.K., Harwalkar, M.R., Nene, S.P. y Padwal-Desai, S.R. (1997). *Radio-Sensitivity of different developmental stages of pulsebeetle (Callosobruchus maculatus)*. Journal of Food Science y Technology 34:413–415.
- Dyck, V. A. (2010). *Rearing codling moth for the sterile insect technique*. FAO plant production and protection paper, 199: 195p.
- El Sheikha, A.F. (2019). *Tracing insect pests: is there new potential in molecular techniques?* Insect Molecular Biology 28(6): 759-772.
- EPPO. (2008). *First record of Tuta absoluta in Morocco*. EPPO reporting service 174:19p.
- EPPO. (2009). *EPPO Reporting service—Pest and Diseases*. Paris, 8:19p.
- Espinosa Cuascota, J. Y. (2023). *Obtención de un concentrado de licopeno del tomate riñón (Solanum Lycopersicum) en estado de descarte del cantón Pimampiro* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte]. <https://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/14002>
- Estay, P. (2000). *Polilla del tomate Tuta absoluta (Meyrick)*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Ministerio de Agricultura Santiago Chile. Accessed January 11, 2010. <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR25648.pdf>
- Estay, P. (2001). *Primer curso "Manejo integrado de plagas y enfermedades en tomate"*. Santiago, INIA La Platina (Serie actas N° 12). 122 p.

- Faiman, R.; A. Dao; A.S. Yaro; M. Diallo; S. Djibril; Z.L. Sanogo; Y. Ousmane; M. Sullivan; L. Veru; B.J. Krajacich; A. Krishna; J. Matthews; C.A.M. France; Hamer, G.; Hobson, K.A. y Lehmann, T. (2019). Marking mosquitoes in their natural larval sites using 2H-enriched water: a promising approach for tracking over extended temporal and spatial scales. *Methods in Ecology and Evolution* 10(8): 1274-1285.
- Federley, H. (1943). *Zytologischetersuchungen un Mischlingen der Gattung Dicranura B. (Lepidoptera)*. *Hereditas* XXIX: 205-254.
- Ferguson, G. y Shipp, L., (1994). *La mineuse de la tomate – cycle évolutif et stratégies de protection des tomates de serre*. ISSN: 1-6.
- Fernández Lozano, J. (2006). *Boletín electrónico de Tomate*, Boletín N°1. Mercado Central de Buenos Aires.
- Fernández, S. y Montagne, A. (1990). *Biología del minador del tomate, Scrobipalpula absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. *Boletín de Entomología Venezolano*. N.S. 5(12):89-99.
- Ferrara, F.A.A., Vilela, E.F., Jham, G.N., Eiras, A.E., Picanco, M.C., Attygale, A.B. y Meinwald, J. (2001). *Evaluation of the synthetic major component of the sex pheromone of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. *Journal of Chemical Ecology*. 27(5): 907-917.
- Fletcher, T.B. (1936). *Marked migrant butterflies*. *Entomologist's Record*. 48: 105-106.
- Friedländer, M. (1983). *Phylogenetic branching of Trichoptera and Lepidoptera: an ultrastructural analysis on comparative spermatology*. *Journal of Molecular and Ultrastructure Research* 83: 141–147.
- Friedländer, M. (1997). *Control of the eupyrene - apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera*. *Journal of Insect Physiology*. 43: 1085–1092.
- Gállego Berenguer, J. (2006). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Ediciones Universitat de Barcelona. Barcelona.
- García, M.F. y Espul, J.C. (1982). *Bioecología de la polilla del tomate (Scrobipalpula absoluta) en Mendoza, República Argentina*. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 17(2):135-146.
- Germain, J.F., Lacordaire, A.I., Cocquempot, C., Ramel, J.M. y Oudard, E. (2009). *Un nouveau ravageur de la tomate en France: Tuta absoluta*. *Phm-Revue Horticole*, 512, 37-41.
- Giebultowicz, J.M. y Zdarek, J. (1996). *The rhythms of sperm release from testis and mating flight are not correlated in Lymantria moths*. *Journal of Insect Physiology* 42: 167–170.

- Gomide, E., Vilela, E.F. y Picanço, M. (2001). *Comparação de procedimentos de amostragem de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro Estaqueado*. Neotropical Entomology, 30(4): 697–705.
- 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. En línea: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/gonzalezr03/
- Grosso A.G. (1996). *Efeitos da Radiação Gama nas Diferentes Fases do Ciclo Evolutivo da Traça do Tomateiro Tuta absoluta Meyrick, 1917 (Lep. Gelechiidae)* Tese Doutorado, Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP). 69 p.
- Guenoui, Y. y Ghelamallah, A. (2008). *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), nouveau ravageur de la tomate en Algérie : premières données sur sa biologie en fonction de la température. In : AFPP - 8ème Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture, Montpellier SupAgro, France. 645-651.
- Guirao, P., Beitia, F. y Cenis, J.L. (1994). *Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la taxonomía de moscas blancas (Homoptera, Aleyrodidae)*. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 20: 757-764.
- Hagler, J.R.; Cohen, A.C.; Bradley-Dunlop, D. y Enriquez, F.J. (1992). *New approach to mark insects for feeding and dispersal studies*. Environmental Entomology. 21(1): 20-25.
- Hagler, J.R. y Jackson, C.G. (2001). *Methods for marking insects: current techniques and future prospects*. Annual Review of Entomology. 46(1): 511-543.
- Haji, F.N., Oliveira, C.A.V., Amorim, M.S. y Batista, J.G.S. (1988). *Flutuação populacional da traça do tomateiro, no submédio sao Francisco*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 23: 7-14.
- Hall, E.J. y Giaccia, A.J. (2012). *Radiobiology for the Radiologist* Edition 7. Publisher, Lippincott Williams y Wilkins, 576 p.
- Hasan, S.H. (2006). *Survey of Bemisia tabaci (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) biotypes in Jordan using RAPD markers*. Journal of Entomology. 3:290-297.
- Hayakawa, Y. (2007). *Parasperm: morphological and functional studies on non fertile sperm*. Ichthyological Research. 54: 111–130.
- Haymer, D.S., He, M. y McInnis, D.O. (1997). *Genetic marker analysis of spatial and temporal relationships among existing populations and new infestations of the Mediterranean fruit fly (Ceratitis capitata)*. Heredity. 79:302-309.

- Hendrichs, J., Robinson, A.S., Cayol J.P. y Enkerlin, W. (2002). *Medfly area wide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies*. Florida Entomologist. 85: 1-13.
- Henneberry T.J. y Clayton T.E. (1988). *Effects of gamma radiation on pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) pupae: adult emergence, reproduction, mating, and longevity of emerged adult sand their F1 progeny*. Journal of Economic Entomology. 81:322–326.
- Hight, S.D., Carpenter, J.E., Bloem, S. y Bloem, K. A. (2005). *Developing a sterile insect release program for Cactoblastis cactorum (Berg) (Lepidoptera: Pyralidae): effective overflooding ratios and release- recapture field studies*. Environmental Entomology. 34(4): 850-856.
- Hill, M.A. (2004). *The variation in biological effectiveness of X-rays and gamma rays with energy*. Radiat Prot Dosimetry **Radiation Protection Dosimetry**.112(4):471-481.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2001). *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature; 411: 366-374.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2009). *DNA damage, aging, and cancer*. New England Journal of Medicine, 361(15): 1475-1485.
- Hofmeyr, J.H., Hofmeyr, M., Carpenter, J.E., Bloem, S. y Slabbert, J.P. (2016). *Sterile insect releases for control of Thaumatotibia leucotreta (Lepidoptera: Tortricidae): an assessment on semi-commercial scale*. African Entomology 24:80–89.
- Hu, M., Weng, M., Deng, Y. y Fu, H. (2012). *Inherited sterility (IS) stability of Litchi stem-end borer (Conopomorpha sinensis Bradley) and field cage trials to evaluate moth quality*. Third Research Co-ordination Meeting within the FAO/IAEA Coordinated Research Programme held in Phoenix, USA from 12 to 16 September 2012. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/crp/2nd-rcm-efficiency-lepidoptera-2010.pdf>
- Instituto Agronómico Nacional (IAN) y Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). (1994). *Control integrado de la palomilla del tomate Scrobipalpula absoluta (Meyrick, 1917)*. Caacupé, Paraguay, JICA.173p.
- Jamieson, B.G.M. (1987a). *The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge. 320 p.
- Jamieson, B.G.M. (1987b). *A biological classification of sperm types, with special reference to annelids and mollusks, and an example of spermiocladistics*. New horizons in sperm cell research. 311-332.

- Jang, E.B., McInnis, D.O., Kurashima, R., Woods, B., y Suckling, D.M. (2012). *Irradiation of Adult Epiphyas postvittana (Lepidoptera: Tortricidae): Egg Sterility in Parental and F1 Generations*. Journal of Economic Entomology. 105(1):54-61.
- Kambhampati, S., Black, W.C. y Rai, K.S. (1992). *Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications*. Journal of Medical Entomology. 29(6): 939-945.
- Kean, J.M., y Suckling, D.M. (2005). *Estimating the probability of eradication of painted apple moth from Auckland*. New Zealand Plant Protection, 58, 7-11.
- Kittayapong, P., Kaeothaisong, N.O., Ninphanomchai, S. y Limohpasmanee, W. (2018). *Combined sterile insect technique and incompatible insect technique: Sex separation and quality of sterile Aedes aegypti male mosquitoes released in a pilot population suppression trial in Thailand*. Parasites Vectors; 11:73–83.
- Klages-Mundt, N. L., y Li, L. (2017). *Formation and repair of DNA-protein crosslink damage*. Science China Life Sciences, 60: 1065-1076.
- Klassen, W., Curtis, C. F., Hendrichs, J. (2021). History of the Sterile Insect Technique Dyck, V.A., Hendrichs, J., & Robinson, A.S. (Eds.). Sterile Insect Technique Principles And Practice In Area-Wide Integrated Pest Management 2nd ed., 1– 44.
- Knipling, E.F. (1970). *Suppression of pest Lepidoptera by releasing partially sterile males: a theoretical appraisal*. Bioscience 20:465–470.
- Knipling, E.F. (1979). The basic principles of insect population suppression and management (No. 512). US Department of Agriculture.
- Koudelova, J. y Cook, P.A. (2001). *Effect of gamma radiation and sex-linked recessive lethal mutations on sperm transfer in Ephestia kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae)*. Florida Entomological Society. 84: 2,172-182.
- Koval, T.M. (1983). *Intrinsic resistance to the lethal effects of x-irradiation in insect and arachnid cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 80(15):4752-4755.
- Koval, T. M. (1996). *Moths: myths and mysteries of stress resistance*. BioEssays, 18(2): 149-156.
- Krechmer, F. y Foerster, L.A. (2015). *Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae): Thermal requirements and effect of temperatura on development, survival, reproduction and longevity*. European Journal of Entomology. 112 (4): 658-663.

- Kumano, N., Kohama, T. y Ohno, S. (2007). *Effect of irradiation on dispersal ability of male sweet potato weevils (Coleoptera: Brentidae) in the field*. Journal of Economic Entomology 100: 730–736.
- LaChance, L. E. (1967). *The induction of dominant lethal mutations in insects by ionizing radiation and chemicals-as related to the sterile male technique of insect control*. Genetics of insect vectors of disease, 21: 617-650.
- LaChance, L.E. (1985). *Genetic methods for the control of the Lepidoptera species: status and potential*. U. S. Department of Agriculture, Washington, DC.ARS-28:27-35
- LaChance, L.E. y Graham, C.K. (1984). *Insect radiosensitivity: dose curves and dose fractionation studies of dominant lethal mutations in the mature sperm of 4 insect species*. Mutation Research, 127: 49-59.
- Landgren, O., Kyle, R.A., Hoppin, J.A., Beane Freeman, L.E., Cerhan, J.R., Katzmann, J.A., Rajkumar, S.V. y Alavanja, M.C. (2009). *Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study*. Blood, 113: 6386–6391.
- Lebdi Grissa, K., Skander, M., Mhafdh, M. y Belhadj, R. (2010). *Lutte intégrée contre la mineuse de la tomate, Tuta absoluta Meyrick (Lepidoptera:Gelechiidae) en Tunisie*. Entomologie faunistique. 63(3): 125-132.
- Lee, M.S., Albajes, R. y Eizaguirre, M. (2014). *Mating behaviour of female Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae): polyandry increases reproductive output*. Journal of Pest Science. 87: 429- 439.
- Liedo, P., Enkerlin, W. y Hendrichs, J. (2010). *Fundamentos de la técnica del Insecto estéril*. Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo. 225p.
- Lietti, M. (2002). *“Evaluación de la resistencia a insecticidas en poblaciones argentinas de la polilla del tomate Tuta absoluta (Meyrick)”*, UN de General San Martín y Centro de Investigaciones de Plagas e insecticidas, CIPEIN-CITEFA/CONICET. Resistencia a insecticidas en *Tuta absoluta*. Tesis de Maestría.
- Lietti, M.M.M., Botto, E. y Alzogaray, R.A. (2005). *Insecticide resistance in Argentine populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Neotropical Entomology 34: 113-119.
- Little, J.B. (2000). *Radiation carcinogenesis*. Carcinogenesis 21: 397-404.
- Logan, D.M. y Proverbs, M.D. (1975). *A device for marking adult codling moths (Lepidoptera: Olethreutidae) with fluorescent powders*. Canadian Entomologist. 107: 879– 881.

- López, P. (2003). *Manejo integrado de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) asociado al cultivo de tomate en Chile*, Seminario, Ing. Ejec. Agrícola, Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile. 77p.
- López Piñero, J. M. y López Terrada, M. L. (1997). *La influencia española en la introducción en Europa de las plantas americanas (1493-1623)* Cuadernos Valencianos de Historia de la Medicina y de la Ciencia LIII Serie A (Monografías) Instituto de Estudios Documentales e Históricos Sobre la Ciencia Universitat de València - C. S. I. C. Valencia. 153 p.
- Mac Cord, J.R.; Jurberg, P. y Lima, M.M. (1983). *Marcação individual de triatomíneos para estudos comportamentais e ecológicos*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 78: 473-476.
- Makee, H. y Saour, G. (2003). *Non inherited sterility in irradiated Pthorimaea operculella females*. Journal of Applied Entomology. 127:489-493.
- Mallea, A.R., Macola, G.S., Garcia, S.J.G., Bahamondes, L.A. y Suarez, J.H. (1972). *Nicotiana tabacum var. virginica, a new host of Scrobipalpula absoluta*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo (in Spanish).18: 13-15.
- Marec, F.; Bloem, S. y Carpenter, J.E. (2021). *Inherited Sterility in Insects*. In Sterile Insect, 2nded.; Marec F., Bloem S., Carpenter J.E., Eds.; CRC Press; 163-200.
- Marec, F., Kollarova, I. y Pavelka, J. (1999). *Radiation- induced inherited sterility combined with a genetic sexing system in Ephestia kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae)*. Annals of the Entomological Society of America 92:250-259.
- Marec, F. y Vreysen, M.J.B. (2019). *Advances and Challenges of Using the Sterile Insect Technique for the Management of Pest Lepidoptera*. Insects. 10(371): 26 p.
- Martin, C. y Enkerlin, W. (2020). *Uso de la Técnica del Insecto Estéril (TIE) para el Control Integrado de Mosca del Mediterráneo: Caso Ecuador*. Ecuador es Calidad. 7(2).
- Matthews, R.W. y Matthews, J.R. (1978). *Insect behavior*. John Wiley and Sons, New York, NY, USA.
- Meats, A. (1996). *Demographic analysis of sterile insect trials with the Queensland fruit fly, Bactrocera tryoni (Froggatt) (Diptera: Tephritidae)*. General and Applied Entomology: The Journal of the Entomological Society of New South Wales. 27: 2-12.
- Mehta, K. (2009). *Radiation sources supporting the use of natural enemies for biological control of agricultural pests*. Biocontrol Science and Technology. 19 (S1): 335-362.

- Meves, F. (1903). *Über oligopyrene und apyrene Spermien und über ihre Entstehung nach Beobachtungen an Paludina und Pygaera*. Archive für Mikroskopische Anatomie. 61: 1–84.
- Meyrick, E. (1917). *Descriptions of South American Micro-Lepidoptera*. Transactions of the Entomological Society of London. 1917:1-52.
- MPAAF. (2009). *Rinvenimento in Italia dell 'Organismo Nocivo Tuta absoluta*. Documento Tecnico per la Conoscenza e il Contenimento del Fitofago. 16. Available at: [ssabasilicata.it].
- Mola, L.M., Rebagliati P.J., Rodríguez, Gil S.G. y Adilardi, R.S. (2011). *Variaciones meióticas y evolución cromosómica en insectos y arácnidos con cromosomas holocinéticos*. BAG, Journal of Basic and Applied Genetics. 22 (1).
- Muller, H.J. (1928). *The problem of genetic modification*. Verhandl. Der V. Kong. F. Vererb., 1927 (Proc. 5 th Int. Congr. Genet., Berlin, 1927); Ztschr. F. Induktive Abstam. U. Vererbungslehre., Sup. Bd. I, 234-260.
- Muszinski, T., Lavendowski, I. M. y Maschio, L.M.A. (1982). *Constatacao de Scrobipalpula absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelichiidae) como Praga do tomateiro (Lycopersicum esculentum Mill.), no litoral do Paraná*. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 11: 291-292.
- NAPPO. (2009). Organización Norteamericana de Protección a las Plantas, *Tuta absoluta* Meyrick, Actualización sobre la dispersión de *Tuta absoluta* en Europa, Sistema de alerta fitosanitaria. (<http://www.pestalert.org/espanol/viewNewsAlert.cfm?naid=78>)
- Nei, M y Li, W.H. (1979). *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76: 5269-5273.
- Nguyen, T.Q.H. y Nguyen, T.T.T. (2001). *Radiation-induced F1 sterility in Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae): potential for population suppression in the field*. Florida Entomologist. 84:199–208.
- Njambere, E.N., Attanayake, R.N., y Chen, W. (2010). *Applications of molecular markers and DNA sequences in identifying fungal pathogens of cool season grain legumes*. Molecular identification of fungi, 79-91.
- North, D.T. y Holt, G.G. (1969). *Population suppression by transmission of inherited sterility to progeny of irradiated cabbage loopers, Trichoplusia ni*. Canadian Entomologist. 101:513–520.
- North, D.T. y Holt, G.G. (1971). *Radiation studies of sperm transfer in relation to competitiveness and oviposition in the cabbage cooper and corn worm*. In: Proceedings of the symposium application of induced sterility for control of lepidoptera populations. FAO/IAEA, Viena, 1970.99–111

- North, D.T. (1975). *Inherited sterility in Lepidoptera*. Annual Review of Entomology 20:167–182.
- Oliveira, A.M. de, Lima, A.F. de, Goncalves, C.R., Menezes E.B., Esteves, M.C.F., Ribeiro, M.I.S.D., Band, G. y Miranda, R.B. (1983). *Ocorrência da broca da ponteira Scrobipalpula sp. (Lep.: Gelechiidae) em tomateiro no estado do Rio de Janeiro, Empresa de Pesquisa Agropecuária*. Pesquisa em Andamento 17: 2p.
- Osouli, S., Ahmadi, M. y Kalantarian, N. (2021). *Radiation biology and inherited sterility in Helicoverpa armigera Hübner (Lepidoptera: Nuctuidae)*. International Journal of Tropical Insect Science. 41(4): 2421-2429.
- Osouli, S., Atapour, M. y Ahmadi, M. (2020). *Effect of gamma radiation on the biology and inherited sterility in European corn borer Ostrinia nubilalis Hubner (Lep: Crambidae)*. Applied Radiation and Isotopes. 160: 109096.
- Pereira, D.L., Silva, P.A.F., Langa, T.P., de Oliveira, M., Ribeiro, L.M.S. y Siqueira, H.A.A. (2023). *Recent assessment and characterization of Tuta absoluta resistance to cartap hydrochloride*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 193:105420.
- Pereyra, P.C. y Sanchez, N.E. (2006). *Effect of two solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Neotropical Entomology. 35:671–676.
- Pfeiffer, W.; Goedecke, W. y Obe, G. (2000). *Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations*. Mutagenesis. 15: 289-302.
- Pollycove, M., y Feinendegen, L.E. (2003). *Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage*. Human y experimental toxicology. 22(6): 290-306.
- Portakaldali, M., Öztemiz, S. y Kutuk, H. (2013). *A New Host Plant for Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Turkey*. Journal of the Entomological Research Society 15(3): 21-24.
- Pransopon, P., Sutantawong, M., Hormchan, P. y Wongpiyasatid, A. (2000). *Effects of Gamma Radiation on Mature Pupae of the Cotton Bollworm, Helicoverpa armigera (Hübner) and Their F1 Progeny*. Kasetsart Journal (Natural Science). 34: 401-407.
- Proverbs, M.D. (1962). *Progress on the use of induced sexual sterility for the control of the codling moth Carpocapsa pomonella (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae)*. Proceedings of the Entomological Society of Ontario. 92:5–11.

- Proverbs, M.D. (1982). *Sterile insect technique in codling moth control*. In Sterile insect technique and radiation in insect control. IAEA-SM-25518. International Atomic Energy Agency, Vienna. 85-99.
- Proverbs, M.D., Newton, J.R. y Logan, D.M. (1978). *Suppression of codling moth, Laspeyresia pomonella (Lepidoptera: Olethreutidae), by release of sterile and partially sterile moths*. Canadian Entomologist. 110: 1095–1102
- Querci, O. (1936). Aestivation of Lepidoptera. Entomologist's Record. 48: 122.
- Qureshi, Z.A., Ahmed, N., y Hussain, T. (1991). *Rearing and gamma radiation effects on mature pupae of pink bollworm and their F1 progeny*. In Proc. Radiation Induced F1 Sterility in Lepidoptera for Area – Wide Control, Phoenix, Arizona. 57–71.
- Qureshi, Z. A., Ahmed, N., y Hussain, T. (1993). *Rearing and gamma radiation effects on mature pupae of pink bollworm and their F 1 progeny*. In Radiation induced F1 sterility in Lepidoptera for area-wide control.
- Ramel, J. M., y Oudard, E. (2008). *Tuta absoluta (Meyrick, 1917) Éléments de reconnaissance*. Fiche technique, LNPV et SRPV, Avignon, 2p.
- Riemann, J.G., y Flint, H.M. (1967). *Irradiation effects on midguts and testes of the adult boll weevil, Anthonomus grandis, determined by histological and shielding studies*. Annals of the entomological society of America. 60(2): 298-308.
- Rizk, S.A. y Mikhael, A.A. (2008). *Inherited sterility of F1 male Sitotroga cerealella (Olivier) and changes in the DNA as a result of using gamma irradiation*. Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications. 42(3): 125-134.
- Ruíz Galván, I. (2022). *Identificación y biología de lepidópteros en frutillas*. Tesis Doctoral.
- Rull Gabayet, A.J. (1997). *Integración de la TIE con otros métodos de Control. Curso Regional sobre Moscas de la fruta y su Control en áreas grandes, con énfasis en la Técnica del Insecto Estéril*. IAEA, México. 451- 455.
- Runner, G.A. (1916). "Effect of Röntgen Rays on the Tobacco or Cigarette Beetle and the Results of Experiments with a New Form of Röntgen Tube." Journal of Agricultural Research. 6(11): 383-388.
- Sakai, H., Oshima, H., Yuri, K., Gotoh, H., Daimon, T., Yaginuma, T. y Niimi, T. (2019). *Dimorphic sperm formation by Sex-lethal*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 116(21): 10412-10417.
- Sanford, J.W. (1976). *Inherited sterility in progeny of irradiated male sugar cane borers*. Journal of Economic Entomology. 69: 456-458.

- Sanford, J.W. (1977). *Sugarcane borers: Effects of substerilising doses of gamma irradiation on males irradiated as pupae or adults*. Journal of Economic Entomology. 70: 104-106.
- Sannino, L. y Espinosa, B. (2010). *Tuta absoluta: Biology Guide and Integrated Control Approaches*. L' Informatore Agrario, 46/2010, Supplement 1, 84 p.
- Saour, G. (2004). *Parasitization of potato tuber moth eggs (Lep. Gelechiidae) from irradiated adults by Trichogramma (Hym., Trichogrammatidae) and control of moth population with combined releases of sterile insect and egg parasitoid*. Journal of Applied Entomology. 128: 681-686.
- Saour, G. y Martin, O. (2014). *Sterile insect technique and F1 sterility in the European grapevine moth, Lobesia botrana*. Journal of Insect Science 14(1).
- Scardini, D.M.B. Ferreira, L. R. y Galveas P.A. (1982). *Controle da traca do tomateiro, no estado do Espirito Santo*. Cariacica, Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuaria. Comunicado Tecnico Nro. 7: 2p.
- Schellhorn, N.A., Siekmann, G., Paull, C., Furness, G. y Baker, G. (2004). *The use of dyes to mark populations of beneficial insects in the field*. International Journal of Pest Management. 50: 153-159.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía (2023). *La Producción de tomate en Argentina*. Evolución del cultivo hasta la temporada 2021/22. 21p.
- Seth, R.K. y Sharma, V.P. (2001). *Inherited sterility by substerilizing radiation in Spodoptera litura (Lepidoptera: Noctuidae): Bioefficacy and potential for pest suppression*. Florida Entomologist. 84: 183-193.
- Seth, R.K., Khan, Z., Rao, D.K. y Zarin, M. (2016). *Flight activity and mating behavior of irradiated Spodoptera litura (Lepidoptera: Noctuidae) males and their F1 progeny for use of inherited sterility in pest management approaches*. Florida Entomologist. 99(1):119-130.
- Suman, S., Khan, Z., Zarin, M., Chandna, S. y Seth, R.K. (2015). *Radioresistant Sf9 insect cells display efficient antioxidant defence against high dose γ -radiation*. International journal of radiation biology. 91:1-40.
- Simmons, G. S., Bloem, K.A., Bloem, S., Carpenter, J.E., Suckling, D.M., Dyck, A.V., y Robinson, A.S. (2021). *Impact of moth suppression/eradication programmes using the sterile insect technique or inherited sterility*. Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management; Dyck, VA, Hendrichs, J., Robinson, AS, Eds. 1007-1054.

- Simmons, G., Carpenter, J.E., Suckling, D.M., Addison, M., Dyck, V.A. y Vreysen, M.J.B. (2010). *Improved quality management to enhance the efficacy of the sterile insect technique* for Singh P, Ashby MD, 1985. Insect rearing management. In: Handbook of insect rearing, Vol. I. Ed. by Singh P, Moore RF, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 185–215.
- Sivinski, J. (1984). Sperm in competition, In R. L. Smith (ed.), *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press, N.Y. 86-115.
- Smith, P.H., Konovalov, C.A., Foster, G.G. y Kerr, R.W. (1981). *Assessment of the quality of mass reared Lucilia cuprina (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) males treated with dieldrin as larvae in a female-killing procedure*. Bulletin of Entomological Research. 71: 1–10.
- Sorensen, J.G., Addison, M.F. y Terblanche, J.S. (2012). *Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology*. Crop Protection. 38: 87–94.
- Souza, J.C. y Reis, P.R. (1986). *Controle da traça-do-tomateiro em Minas Gerais*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 21: 343-354.
- Souza, J.C., Reis, P.R., Pádua Nacif, A. de, Gomes, J.M. y Salgado, L.O. (1983). *Controle da traça-do-tomateiro. Histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle*. Belo Horizonte, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. 15p.
- Statgraphics Centurión XVIII Version 18.1.12. Stat Point Technologies, Inc. 1982 – 2011.
- Stat Soft, I. N. C. Statistica for Windows version 7.1. *Computer program manual*, 2005.
- Suomalainen, E. (1969). *Chromosome evolution in the Lepidoptera*. Chromosomes Today. 2: 132–138.
- Sutrisno, S.; Hoedaya, M.S.; Sutardji, D. y Rahayn, A. (1991). *The sterile insect technique and transmission of inherited sterility to control the diamondback moth, Plutella xylostella L and the cabbage webworm, Crocidolomia binotalis*. Zell. Proc. Intl. Symp., 19-23 Oct., 1992, Vienna, Austria, IAEA, Sep. 1993, 469: 363-370.
- Swallow, J.G. y Wilkinson, G.S. (2002). *The long and short of sperm polymorphisms in insects*. Biological Reviews Cambridge Philosophical Society. 77: 153–182.
- Torres, J.B., Faria, C.A., Evangelista, Jr. W.S. y Pratisoli, D. (2001). *Within-plant distribution of the leaf miner Tuta absoluta (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology*. International Journal of Pest Management. 47: 173–178.

- Tothová, A. y Marec, F. (2001). *Chromosomal principle of radiation induced F1 sterility in Ephestia kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae)*. Genome. 44:172–184.
- Traut, W. (1977). *A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complexes in female and male meiosis of Ephestia kuehniella (Lepidoptera)*. Genetica. 47:135–142.
- Traut W. y Marec F. (1997). *Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta)*. Chromosome Research. 5:283–291.
- Tropea Garzia, G., Siscaro, G., Biondi, A. y Zappala, L. (2012). *Tuta absoluta, an exotic invasive pest from South America now in the EPPO region: biology, distribution and damage*. EPPO Bulletin. 42:205–210.
- Uchoa-Fernandes, M., Della, L. y Vilela, E. (1995). *Mating, oviposition and pupation of Scrobipalpuloides absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Anais da Soceda de Entomologica do Brasil. 24(1): 159-164.
- Vargas, H. (1970). *Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, Gnorimoschema absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Idesia. 1: 75-110.
- Vreysen, M.J.B. (2001). *Principles of area-wide integrated tsetse fly control using the Sterile insect Technique*. MédecineTropicale. 61: 397-411.
- Vreysen, M.J.B. (2005). *Monitoring sterile and wild insects in area-wide integrated pest management programmes*, In Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS [eds.], Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht, the Netherlands. 325–361.
- Vreysen, M.J.B. (2006). *Prospects for area-wide integrated control of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) and trypanosomosis in sub-Saharan Africa*. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. 65 (1-2): 1-21.
- Vreysen, M.J., Barclay, H.J., y Hendrichs, J. (2006). *Modeling of preferential mating in area wide control programs that integrate the release of strains of sterile males only or both sexes*. Annals of the Entomological Society of America. 99(3): 607-616.
- Vreysen, M.J.B., Carpenter, J.E. y Marec, F. (2010). *Improvement of the sterile insect technique for codling moth Cydia pomonella (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) to facilitate expansion of field application*. Journal of Applied Entomology. 134: 165–181.
- Vreysen, M.J.B., Klassen, W. y Carpenter, J.E. (2016). *Overview of technological advances toward greater efficiency and efficacy in sterile insect-inherited sterility programs against moth pests*. Florida Entomologist. 99 (1): 1–12.

- Walton, A.J. y Conlong, D.E. (2016). *General biology of Eldana saccharina (Lepidoptera: Pyralidae): A target for the sterile insect technique*. Florida Entomologist. 99 (1): 30-35.
- Walton, A.J., Conlong, D.E. y Addison, M.F. (2011). *Parental and F1 Sterility of Eldana saccharina Walker (Lepidoptera: Pyralidae)*. Proceedings South African Sugar Technologists' Association. 84: 281 – 286.
- Ward, J.F. (1995). *Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible*. Radiation Research. Jun; 142 (3):362-368.
- World Health Organization. (2016). International code of conduct on pesticide management: guidelines on highly hazardous pesticides.
- Williams, R.E. (1962). *Effect of coloring oviposition media with regard to the mosquito Aedes triseriatus (Say)*. The Journal of Parasitology. 48: 919–925.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V . (1990). *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as Genetic markers*. Nucleic Acids Research. 18:6531–6535.
- Yusef, M.V. (2014). *“Desarrollo de la Técnica del Insecto Estéril para el control de la polilla del tomate Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) mediante la utilización de radiación gamma”*. Tesis de Maestría UNSAM.
- Zaghloul, Y. S. (2004). *Sterility and associated physiological and molecular characteristics in cowpea weevil, Callosobruchus maculatus*. Ph.D Thesis, Faculty of Science - Ain Shams Univresity, Egypt.
- Zhou, G., Flowers, M., Friedrich, K., Horton, J., Pennington, J. y Wells, M. A. (2004). *Metabolic fate of [14C]- labeled meal protein amino acids in Aedes aegypti mosquitoes*. Journal of Insect Physiology. 50(4): 337-349.
- Zhou, S., Li, X., Zhang, J., Liu, C., Huang, J., Zhang, Z., Liu, C., Huang, J., Zhang, Z., Ren, X., Chen, L., Hafeez, M., Han P., Wang, B., y Lu, Y. (2023). *Screening the optimal dose of gamma radiation for Tuta absoluta sterility: paving the way for sterile insect technique programs*. Entomologia Generalis. 8p.