



Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata

Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales

Distribución geográfica y variación interpoblacional
del endoparasitoide larval *Pseudapanteles dignus*
(Hymenoptera: Braconidae), agente de control
biológico de la “polilla del tomate” *Tuta absoluta*
(Lepidoptera: Gelechiidae) en la Argentina

Lic. Consuelo Vallina

Directoras

Dra. María Gabriela Luna y Dra. Norma E. Sánchez

2019



A mis padres

Agradecimientos

- A mis directoras Norma y Gaby, y a Nancy, por darme un lugarcito en su grupo de trabajo, por la confianza y el apoyo brindado durante todos estos años, y seguir confiando en mí para seguir trabajando con ellas. Y sobre todo por los conocimientos que me han brindado, la buena predisposición, consejos y cariño.
- A los jurados, por la evaluación de la tesis.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por el financiamiento otorgado para la realización de esta Tesis, en conjunto con el Proyecto de Investigación Plurianual (PIP-0112) de CONICET, los Proyectos de Investigación Aplicada (PICT-1624 y PICT-1427) de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (MINCyT), los Proyectos N° 706 (2013-2016) y N° 829 (2017-2020), correspondientes al Programa de Incentivos a Docentes-Investigadores del Ministerio de Cultura y Educación de La Nación, y el Subsidio Jóvenes Investigadores 2018.
- A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (FCNyM-UNLP) por la formación académica recibida.
- Al Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE. CONICET-UNLP) por brindarme el lugar de trabajo para la realización de esta tesis doctoral. A sus directoras, Alda González y Graciela Navone, y a todo el personal del instituto, investigadores, becarios, pasantes, técnicos y personal de apoyo.
- Al Ministerio de Ambiente y Producción Sustentable de Salta y a SENASA (Ing. Agr. Esteban Rial), por concederme los permisos de muestreo y traslado del material.
- Al Grupo de Ecología de Plagas y Control Biológico por permitirme realizar la tesis en un ambiente de unión, amistad, alegría y sobre todo muchas risas.
- Al personal de INTA EEA Yuto (Lilia Puch, Ceferino Flores), INTA EEA Alto Valle (Silvina Garrido, Mario López, Liliana Cichón), INTA AER Valle Medio (Eliceo Alfaro), INTA AER Cipolletti (Liliana Aliaga), INTA AER

Centenario (Pablo Nuñez), IPAF-INTA Patagonia (M. Fernanda López Armengol) y Nicolás Noale de La Campagnola por contactarme con los productores, acompañarme en el trabajo de campo, y brindarme su tiempo, paciencia y colaboración.

- A Silvia Lanzavecchia y Claudia Conte, del Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Agronómica. IGEEAF - CNIA-INTA Castelar, por los análisis bacteriológicos.
- A Graciela Minardi por su apoyo con los análisis estadísticos.
- A Laura Morote por todas las figuras y dibujos realizados.
- A Paloma por el tiempo y esfuerzos invertidos en la realización de la carátula.
- A los productores Marcelo Maita, Susana Parrillo, Norma, los chicos de “Colectivo Orgánico”, la familia Krayeski, Nicolás Ditada, la familia López, personal INTA Gorina y todos aquellos que me dieron acceso en a sus campos en Salta, Río Negro y Neuquén.
- A María Laura, Carlos, Santiago y Martina, por darme un lugarcito en su laboratorio para poder realizar parte de los ensayos.
- Al Dani, por su infinita paciencia, enseñanzas, retos y afecto.
- A Eliana, por sus valiosos aportes, y ayuda en el desarrollo de la tesis.
- A la Negrita, Fran y Ro por acompañarme en el camino de la *Tuta*, yendo al campo, haciendo colonias, revisando ensayos, contando larvas, armando floreros.
- A Vivi por el apoyo de siempre.
- A Augus, Beto, Sofi, Brunito, Eli, Estefi, Eli, Fran, Marianita, Maru, Mati, Na, Ro, Cande, Flor, Mati y Naty por tantos almuerzos, mates, salidas y charlas compartidas.
- A mis compañeros de Zoo por el cariño, y las charlas y los mates que siempre nos sacan una sonrisa.
- Al Tío Jor, por incentivar me desde muy temprano con el mundo de la investigación y ayudarme con los análisis.
- A Clau Cédola por cuidarme y quererme como una madre.
- A mis compañeros fieles de campaña, Seryi y Migue.
- A Papá y Mamá por haberme dado la posibilidad de estudiar, motivado

para llegar hasta acá, su cariño infinito y ayudarme a ser mejor persona cada día.

- A Migue por acompañarme, apoyarme, ayudarme y darme fuerzas cada día de este último tramo.
- A mis amigas de la vida.
- A Julio, Bruno, Rouge, Oster y Juanita por su amor y compañía durante todo este trayecto.

Índice

Resumen	I
Abstract	V
Capítulo 1 - Introducción general	1
1.1 ¿A qué llamamos plaga agrícola? Nivel de daño económico, umbral de daño económico y Manejo Integrado de Plagas (MIP)	3
1.2 El control biológico como técnica para el manejo de plagas en un contexto agroecológico	5
1.2.1 Los parasitoides en el control biológico	10
1.2.2 Variación geográfica de las poblaciones y su efecto sobre el desempeño de los parasitoides como agentes de control biológico ...	11
1.3 Planteamiento del problema	15
1.4 Hipótesis y predicciones	17
1.5 Objetivo general	18
1.6 Objetivos específicos	18
Capítulo 2 – Sistema de estudio	19
2.1 El cultivo de tomate	20
2.1.1 Generalidades	20
2.1.2 Situación del cultivo en el mercado mundial y nacional.....	23
2.1.3 Principales zonas productoras de tomate en la Argentina	24
2.2 La plaga: <i>Tuta absoluta</i>	26
2.2.1 Ubicación taxonómica	26
2.2.2 Origen y distribución geográfica	27
2.2.3 Principales características biológicas y ecológicas	28

2.2.4 Daños a la planta	30
2.2.5 Métodos de control	31
2.2.6 Enemigos naturales de <i>T. absoluta</i>	32
2.3 El parasitoide: <i>Pseudapanteles dignus</i>	33
2.3.1 Ubicación taxonómica	33
2.3.2 Origen y distribución geográfica	33
2.3.3 Biología y ecología	34
2.3.4 Potencialidad como agente de control biológico	39
2.4 Regiones hortícolas consideradas en este estudio	39
2.4.1 Noroeste argentino (Región Neotropical según Morrone 2016)	40
2.4.2 Región Pampeana (Región Neotropical según Morrone 2016)	41
2.4.3 Región Patagónica (Región Andina según Morrone 2016)	43
Capítulo 3 – Identificación de poblaciones locales de <i>Pseudapanteles dignus</i> y tasas de parasitismo a campo	46
3.1 Introducción	47
3.2 Materiales y métodos	51
3.2.1 Relevamiento de poblaciones locales de <i>P. dignus</i> y parasitismo a campo por región.....	51
3.2.2 Estudios morfométricos	61
3.3 Resultados	66
3.3.1 Poblaciones locales de <i>P. dignus</i> y parasitismo a campo	66
3.3.2 Estudios morfométricos	69
3.4 Discusión	74

Capítulo 4 – Compatibilidad reproductiva de poblaciones locales de <i>Pseudapanteles dignus</i>	78
4.1 Introducción	79
4.2 Materiales y métodos	82
4.2.1 Identificación de <i>Wolbachia</i> en poblaciones locales de <i>Pseudapanteles dignus</i>	82
4.2.2 Cría de insectos para ensayos de compatibilidad reproductiva de <i>P. dignus</i>	83
4.2.3 Ensayos de intercrusa	85
4.3 Resultados	88
4.3.1 Identificación de <i>Wolbachia</i> en poblaciones locales de <i>Pseudapanteles dignus</i>	88
4.3.2 Ensayos de intercrusa	91
4.4 Discusión	95
Capítulo 5 - Atributos bioecológicos de poblaciones locales de <i>Pseudapanteles dignus</i>	98
5.1 Introducción	99
5.2 Materiales y métodos	105
5.2.1 Colonias de insectos y diseño de ensayos	105
5.2.2 Determinación de atributos bioecológicos	106
Respuesta funcional y tasa de ataque	106
Tiempo de desarrollo pre-imaginal y proporción de sexos	107
5.3 Resultados	109
5.3.1 Respuesta funcional y tasa de ataque	109
5.3.2 Tiempo de desarrollo pre-imaginal	112

5.3.3 Proporción de sexos	115
5.4 Discusión	117
Consideraciones finales	121
Referencias bibliográficas	124

Índice de figuras

- Figura 1.1. Nivel de daño económico y umbral económico4
- Figura 1.2. Enemigos naturales8
- Figura 1.3. Diagrama conceptual que ilustra la variabilidad intraespecífica de un fenotipo de algún atributo considerado positivo para una especie candidata como agente de CB13
- Figura 2.1. Cultivo de tomate, *Solanum lycopersicum*, a cielo abierto (provincias de Salta y Río Negro)21
- Figura 2.2. Cultivo de tomate, *Solanum lycopersicum*, bajo cubierta (provincias de Salta y Río Negro) 21
- Figura 2.3. Morfología de la planta de tomate22
- Figura 2.4. Mapa de la República Argentina, indicando regiones productoras de tomate26
- Figura 2.5. Distribución geográfica de *Tuta absoluta*28
- Figura 2.6. Estados de desarrollo de la polilla del tomate *Tuta absoluta*30
- Figura 2.7. Daños en folíolos de planta de tomate producidos por larvas de *Tuta absoluta*31
- Figura 2.8. Distribución geográfica de *Pseudapanteles dignus*34
- Figura 2.9. Hembra de *Pseudapanteles dignus* parasitoidizando larva de *Tuta absoluta*35
- Figura 2.10. Estados de desarrollo del parasitoide *Pseudapanteles dignus* sobre *Tuta absoluta*37
- Figura 2.11. Departamento de Orán, provincia de Salta41
- Figura 2.12. Partido de La Plata, provincia de Buenos Aires43
- Figura 2.13. Departamento de Avellaneda, provincia de Río Negro45

- Figura 3.1. Mapa de la República Argentina indicando las principales regiones de producción de tomate52
- Figura 3.2. Muestreos en el noroeste argentino57
- Figura 3.3. Muestreos en región patagónica57
- Figura 3.4. Acondicionamiento de hojas de tomate con indicios de daño de *Tuta absoluta* para su traslado al laboratorio del CEPAVE58
- Figura 3.5. Acondicionamiento del material traído de campo en bandejas plásticas con suministro de alimento fresco59
- Figura 3.6. Acondicionamiento de cocones60
- Figura 3.7. Toma de las medidas morfométricas del ala anterior62
- Figura 3.8. Fotografía del ala anterior de *P. dignus*63
- Figura 3.9 Puntos de referencia establecidos sobre el ala anterior de *P. dignus* utilizados para mediciones morfométricas63
- Figura 3.10. Fotografías de pata posterior; ovipositor y cabeza en vista frontal de *Pseudapanteles dignus*65
- Figura 3.11. Medidas utilizadas en estudios morfométricos de *P. dignus* en pata posterior; ovipositor y cabeza65
- Figura 3.12. Boxplots mostrando la distribución de los datos de las proporciones morfológicas medidas en el ala anterior (a-d), metatibia (e), ovipositor (e) y cabeza (f) de avispas hembras de *P. dignus*, que resultaron significativamente diferentes entre tres poblaciones geográficas argentinas estudiadas (BA, Buenos Aires; RN, Río Negro y SA, Salta provincias)72
- Figura 3.13. Biplots de análisis PCA de las proporciones morfométricas de las poblaciones locales de *P. dignus*, mostrando la carga de cada variables y las elipses de confianza conteniendo el 95% de los datos.73

- Figura 4.1. Cría de *Tuta absoluta* en bioterio experimental bajo condiciones controladas: jaula de oviposición84
- Figura 4.2. Vistas externa e interna de la unidad de cría de *P. dignus*, conteniendo un “florero” con folíolos de tomate infestados por larvas de *T. absoluta*85
- Figura 4.3. Amplificación de fragmentos 16S rRNA en poblaciones de BA y SA89
- Figura 4.4. Amplificación de fragmentos wsp en población de BA89
- Figura 4.5. Amplificación de fragmentos wsp en población de SA89
- Figura 4.6. Amplificación de fragmentos 16S rRNA en poblaciones de RN y BA90
- Figura 4.7. Amplificación de fragmentos 16S rRNA F/R en poblaciones de RN y BA90
- Figura 4.8. Amplificación de fragmentos 16S rRNA F/R en poblaciones de RN, BA y SA90
- Figura 4.9. Proporción de sexos de cruces intra e interpoblacionales entre tres poblaciones de *P. dignus*: Salta (SA), Buenos Aires y Río Negro (RN). Barras rayadas indican proporción de machos y barras punteadas proporción de hembras92
- Figura 5.1. Respuesta funcional tipo I según Holling 1959 (adaptado de Juliano 2001)100
- Figura 5.2. Respuesta funcional tipo I según Holling 1959 (adaptado de Juliano 2001)101
- Figura 5.3. Respuesta funcional tipo I según Holling 1959 (adaptado de Juliano 2001)102

- Figura 5.4. Número de larvas de *T. absoluta* parasitadas (N_p) por avispas de *P. dignus* provenientes de tres poblaciones locales de Argentina (Salta SA, Buenos Aires BA y Río Negro RN) a distintas densidades del hospedador (N_0) en un ensayo de 24 h y a distintas temperaturas (25°, 28° y 30°C)110
- Figura 5.5. Proporción de larvas de *T. absoluta* parasitadas (N_p / N_0) por avispas de *P. dignus* provenientes de tres poblaciones locales de Argentina (Salta SA, Buenos Aires BA y Río Negro RN) a distintas densidades del hospedador (N_0) en un ensayo de 24 h y a distintas temperaturas (25°, 28° y 30°C)111
- Figura 5.6. Tiempos de desarrollo pre-imaginal, discriminados por sexo, de tres poblaciones locales de *P. dignus*. Las barras rayadas corresponden a los machos y las barras punteadas a las hembras114

Índice de tablas

- Tabla 2.1. Principales características climáticas de las regiones seleccionadas para este estudio40
- Tabla 3.1. Número de campos muestreados por región y año, con presencia de *T. absoluta* y *P. dignus*67
- Tabla 3.2. Número de larvas de *T. absoluta* promedio por hoja (\pm E.E.) y porcentaje de parasitismo promedio de *P. dignus* por campo y año de muestreo, y por región y año de muestreo68
- Tabla 3.3. Media (\pm D.E.) de cada medición lineal estimada en μm en el ala anterior, , la metatibia, el ovipositor y la cabeza de *P. dignus* de tres poblaciones locales69
- Tabla 3.4. Media (\pm D.E.) de cada proporción establecida para el ala anterior, , la metatibia, el ovipositor y la cabeza de *P. dignus* de tres poblaciones locales.....70
- Tabla 3.5. Parámetros estadísticos resultantes de las pruebas ANOVA y Kruskal-Wallis para comparar medias de las relaciones morfométricas tomadas en las tres poblaciones locales de *P. dignus*71
- Tabla 3.6. Resultados de los tests *post hoc* Tukey (T) y Conover-Iman (CI), para comparar medias de las relaciones morfométricas estimadas para las poblaciones locales de *P. dignus*71
- Tabla 4.1. Proporciones de sexo promedio (MSR), proporciones de parejas que dejaron descendencia femenina (PF) y porcentajes de compatibilidad relativa (RC) para ensayos de cruzamiento entre tres poblaciones geográficas de *P. dignus* de Argentina.....91
- Tabla 4.2. Comparaciones de a pares entre proporciones de sexo obtenidas de

cruces inter e intrapoblacionales	93
- Tabla 4.3. Estimaciones de los coeficientes de aislamiento sexual (I_{PSI}) \pm D.E. e índice de asimetría (IA_{PSI}) \pm D.E. para tres poblaciones geográficas de <i>P. dignus</i> de Argentina	94
- Tabla 4.4. Estimador de productos cruzados (W) para cada sexo en cruces interpoblacionales entre poblaciones geográficas de <i>P. dignus</i>	94
- Tabla 5.1. Condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo para la cría de <i>P. dignus</i> y realización de ensayos	105
- Tabla 5.2. Resultado de los análisis de regresión logística de la proporción de larvas de <i>T. absoluta</i> parasitadas por <i>P. dignus</i> (P_1) en relación al número inicial de hospedadores ofrecidos (P_0)	109
- Tabla 5.3. Tasa de ataque diaria (a') y parámetros de la regresión lineal de distintas poblaciones locales de <i>P. dignus</i> , en ensayos a distintas temperaturas	112
- Tabla 5.4. Tiempo de desarrollo pre-imaginal de <i>P. dignus</i> \pm E.E. (días) por provincia, temperatura y sexo	113
- Tabla 5.5. Proporción de hembras (\pm E.E.) por temperatura y provincia de poblaciones locales de <i>P. dignus</i>	115
- Tabla 5.6. Odds ratio (OR), intervalos de confianza (95%) y análisis chi-cuadrado de la proporción de hembras en la descendencia de <i>P. dignus</i> entre regiones.....	116

Resumen

La producción de hortalizas en la Argentina se realiza en casi todo su territorio gracias a la extensión en latitud, y a la diversidad de climas y ambientes que posee, lo que permite establecer una zonificación de la producción en relación con la temperatura media de cada lugar y cultivar una amplia diversidad de especies. El tomate, *Solanum lycopersicum* L. (Solanales: Solanaceae), es uno de los principales productos hortícolas producidos en nuestro país, y en todas las regiones donde se lo produce su principal plaga es la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Ésta, es un microlepidóptero de origen Neotropical, que se ha convertido en una amenaza a nivel mundial desde su introducción y posterior dispersión en países de la cuenca mediterránea, África y Asia. El daño es ocasionado por la larva, de hábito minador, que se alimenta principalmente de hojas, y secundariamente ataca tallos y frutos, restándole valor comercial al producto. El manejo sanitario de esta plaga es principalmente mediante el uso de agroquímicos, ya que en el marco de la agricultura moderna constituye una de las principales estrategias para aumentar la producción agrícola. No obstante, además de que ha sido reportada la baja eficacia de este método de control, el modelo actual y hegemónico de agricultura enfrenta importantes problemáticas ecológico-ambientales y socio-culturales. Es por ello que surge un nuevo paradigma en favor de la sustentabilidad, la Agroecología, que propone, entre otras estrategias, incrementar la biodiversidad dentro de los agroecosistemas, optimizando los procesos naturales y eliminando el uso de insumos como los agrotóxicos. En este contexto, el control biológico de plagas mediante enemigos naturales es una técnica alternativa al manejo de plagas en los cultivos, que ayuda a restaurar la biodiversidad funcional en los ecosistemas agrícolas. Por definición, el **control biológico** (CB) consiste en la utilización de una o varias especies de enemigos naturales (EN) para reducir la densidad poblacional de otro organismo considerado plaga, mediante la introducción, aumento en número, o conservación de los mismos en el agroecosistema.

Los insectos parasitoides constituyen un tipo particular de enemigos naturales. Son insectos endopterigotas, cuyo estado larval vive a expensas como parásito de un individuo huésped -usualmente otro insecto- el cual muere en

dicha interacción. Son considerados importantes agentes de control biológico por su ubicuidad, eficiencia de búsqueda y ataque del hospedador, y por su especialización en unas pocas especies hospedadoras. La producción de EN de alta calidad y la determinación del grado de control de la plaga logrado por el agente en el campo, son pasos esenciales para el éxito de los programas de control. Por ello, resulta fundamental identificar cuáles son los factores que limitan las poblaciones de enemigos naturales o que influyen de una manera negativa sobre su capacidad de control. Un ejemplo de esto es la variabilidad intraespecífica que puede existir entre poblaciones ampliamente distribuidas de una especie, sujetas a distintas condiciones bióticas y abióticas, que eventualmente puede conducir al aislamiento reproductivo.

El endoparásitoide larval *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck), de origen Neotropical, ha sido reportado como uno de los principales EN de *T. absoluta*, por lo cual desde hace varios años se vienen desarrollando investigaciones tendientes al control biológico de esta plaga mediante el uso de este parasitoide. Las mismas indican, *a priori*, que el mismo posee características positivas para ser considerado un buen agente de control mediante liberaciones aumentativas estacionales. De todas maneras, aún no ha sido reportado en todas las regiones argentinas productoras de tomate en las cuales *T. absoluta* está presente. Además, todos los estudios realizados respecto a sus atributos bioecológicos han sido realizados con individuos provenientes de la provincia de Buenos Aires.

El objetivo general de este trabajo de Tesis es el control biológico de la “polilla del tomate” en la Argentina, mediante el uso de uno de sus EN nativos, el endoparásitoide larval *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae). Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1) determinar el rango de distribución geográfica de *P. dignus* en cultivos de tomate de la Argentina y estimar el parasitismo a campo (como una medida de la abundancia) en diferentes regiones; 2) confirmar la identidad de los ejemplares en estudio hallados en cada región mediante el análisis de caracteres morfológicos, y comparación de los mismos entre las poblaciones seleccionadas; 3) determinar la existencia de aislamiento reproductivo entre las diferentes poblaciones locales de *P. dignus* y la población de referencia establecida (población de la provincia de Buenos Aires); y 4) estimar y comparar, en el laboratorio, atributos bioecológicos (respuesta funcional y tasa de ataque, tiempo

de desarrollo pre-imaginal, proporción de sexos) de individuos de *P. dignus* provenientes de poblaciones de distintas regiones de la Argentina.

Para los estudios de este trabajo de Tesis se seleccionaron cuatro provincias correspondientes a tres importantes regiones productoras de tomate afectadas por *T. absoluta*: 1) Buenos Aires (BA) (Pampeana); 2) Salta (SA) (Noroeste Argentino); y 3) Río Negro (RN) y Neuquén (NQ) (Patagonia). En cada una de ellas se realizaron muestreos en cultivos de tomate a campo y bajo invernáculo (con o sin uso de agroquímicos). En cada muestreo se recolectaron hojas de tomate con indicios de ataque de *T. absoluta*, que fueron trasladadas al laboratorio de Ecología de Plagas y Control Biológico del CEPAVE (CCT CONICET- UNLP), en la ciudad de La Plata. Allí, se acondicionaron y mantuvieron en un bioterio ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 5\% \text{RH}$, 14:10 L: O) hasta la formación de las pupas del parasitoide o de la polilla. Con éstas, se dio origen a una colonia por región. Los cocones del parasitoide fueron individualizados y mantenidos en el bioterio hasta la emergencia de los adultos, con los cuales se dio inicio a las colonias correspondientes según la región, para la realización de los ensayos, y llevar a cabo estudios morfométricos. A su vez, con los datos registrados se calculó el porcentaje de parasitismo (por campo y año, y por región y año), el cual (excepto en un campo de Río Negro) fue bastante bajo tanto para el NOA como para la Patagonia, siendo una posible explicación podría ser la intensa aplicación de agroquímicos de la zona.

Para los análisis morfométricos de cada región, se tomaron medidas de las alas, cabeza, metatibia y ovipositor de individuos hembra de *P. dignus*. Con esas medidas se establecieron proporciones, las cuales luego fueron comparadas estadísticamente intra- e interpoblacionalmente. Los resultados obtenidos indicaron que los individuos de las tres poblaciones seleccionadas presentan una ligera variabilidad intraespecífica, siendo la población de la región Patagónica la que se diferencia más del resto, y los individuos de BA los que presentan mayor tamaño. Sin embargo, dicha variabilidad no llega a ser suficiente como para considerarse especies distintas.

Para determinar la existencia de aislamiento reproductivo se realizaron experimentos de cruzamiento entre las poblaciones BA y SA, y entre las de BA y RN. Las poblaciones de SA y RN no se pudieron cruzar debido a que las muestras se tomaron en distintos años y las colonias no se pudieron mantener

simultáneamente. Luego se calculó la proporción de hembras de la progenie, dato que se utilizó para estimar la compatibilidad reproductiva (un valor relativo promedio), y a su vez se estimaron el índice de aislamiento sexual por pareja, el índice de asimetría y el estimador de productos cruzados. Los resultados obtenidos indicaron que las poblaciones locales RN y BA fueron altamente compatibles. Por el contrario, existió una menor compatibilidad reproductiva entre SA y BA.

Por último, se estimaron en el laboratorio atributos biológicos (respuesta funcional y tasa de ataque, tiempo de desarrollo pre-imaginal, proporción de sexos) de las distintas poblaciones locales, bajo distintas condiciones de temperatura. La respuesta funcional de individuos de *P. dignus* de las distintas poblaciones y bajo distintas condiciones de temperatura fue independiente del incremento de la densidad de larvas de *T. absoluta* ofrecidas. El tiempo de desarrollo pre-imaginal difirió entre las tres poblaciones y la población BA fue la que mostró los tiempos más largos. La proporción de sexos en cambio, fue similar en las tres poblaciones a las temperaturas testeadas, sin desviarse de la relación 1:1 (excepto para Salta a 30°C).

En resumen, se observó variación intraespecífica entre las tres poblaciones estudiadas en relación a su morfometría y algunos de los parámetros bioecológicos analizados. Asimismo, las poblaciones de RN y SA mostraron ser reproductivamente compatibles con la de BA, mostrando mayor compatibilidad la población de RN con la de BA.

Los resultados obtenidos aportan bases para el desarrollo de programas de control biológico aumentativo para la polilla del tomate. Los mismos sugieren que la cría masiva de *P. dignus* para su liberación en diferentes regiones hortícolas de la Argentina podría realizarse con individuos provenientes de cualquiera de las tres poblaciones locales estudiadas en este trabajo de Tesis.

Abstract

Vegetable production in Argentina is carried out in almost all its territory thanks to its extension in latitude and the diversity of climates and environments, allowing establish a zoning of production in relation to the average temperature of each region and cultivate a wide diversity of species. The tomato, *Solanum lycopersicum* L. (Solanales: Solanaceae), is one of the main horticultural crops produced in this country, and in all regions where it is produced the main pest is the tomato moth, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). This is a microlepidoptera of Neotropical origin, which has become a global threat since its introduction and subsequent dispersion in countries of the Mediterranean basin, Africa and Asia. The damage is caused by the larvae that mine leaflets, apical buds, stems, flowers, and fruits, subtracting commercial value to the product. The dominant sanitary management of this pest is based on the use of agrochemicals, in spite of the failure of this model to produce positive ecological-environmental and socio-cultural results. That is why Agroecology arises as a new paradigm in favor of sustainability, which proposes to increase biodiversity within agroecosystems, optimizing natural processes, among other strategies, eliminating the use of inputs such as agrottoxics, and promoting social inclusion. In this context, **biological control** (BC) of pests is an alternative technique to the employment of chemical insecticides and it is considered a reliable strategy to restore functional diversity in agricultural ecosystems. By definition, BC consists in the use of one or several species of natural enemies (NE) to reduce the population density of another organism considered as a pest, by means of introducing, increasing or conserving their populations in the agroecosystem.

Insect parasitoids are a special group of natural enemies. They are endopterygota insects, whose larval state lives as a parasite at the expense of one individual host -usually another insect- that dies as a product of such interaction. They are valued as important biological control agents for their ubiquity, searching efficiency and host attack, and for their specialization in a few host species. The production of natural enemies of high quality and determining the degree of pest control achieved by the agent in the field, are essential steps for the success of control programs. Therefore, it is essential to identify the factors that limit populations of natural enemies or that have a negative influence on their

ability to control a pest. For example, the intraspecific variation that may exist between widely distributed populations of a species subject to different biotic and abiotic conditions may eventually lead to reproductive isolation. The larval endoparasitoid *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck), of Neotropical origin, has been reported as one of the main natural enemies of *T. absoluta*; that is why for several years research for biological control of this pest has been carried out using this parasitoid. These studies indicate, *a priori*, that it has positive traits to be considered a good control agent through seasonal augmentative releases. However, it has not yet been reported in all tomato producing regions of Argentina in which *T. absoluta* is present. Additionally, all studies regarding their bioecological attributes were carried out using individuals from Buenos Aires province.

The general objective of this Thesis is the control of the "tomato moth" *Tuta absoluta* in Argentina by implementing biological control through the use of one of its native natural enemies, the larval endoparasitoid *Pseudapanteles dignus*. For this purpose the following specific objectives were set: 1) determine the range of geographic distribution of *P. dignus* in tomato crops of Argentina and estimate field parasitism in different regions; 2) confirm the identity of the specimens under study found in each region by analyzing morphological characters, and comparing them between the selected populations; 3) determine the existence of reproductive isolation between the different local populations of *P. dignus* and the population established as reference (population of Buenos Aires province); and 4) estimate and compare, in the laboratory, bioecological attributes (functional response and attack rate, pre-imaginal development time, sex ratio) of individuals of *P. dignus* of populations from different regions of Argentina.

Four provinces corresponding to three main tomato producing regions affected by *T. absoluta* were selected: 1) Buenos Aires (BA) (Pampeana); 2) Salta (SA) (Argentine Northwest); and 3) Río Negro (RN) and Neuquén (NQ) (Patagonia). In each of them, samplings were carried out in tomato greenhouses or open-field tomato crops (with or without use of agrochemicals). In each sampling, tomato leaves with signs of damage caused by *T. absoluta* were collected, and transferred to the Pest Ecology and Biological Control laboratory of CEPAVE (CCT CONICET-UNLP) in the city of La Plata. There, they were

conditioned and kept in a bioterium (25 ± 2 ° C, $70 \pm 5\%$ RH, 14:10 L: O) until the formation of the parasitoid or moth pupae. With the last ones, a colony by region was set up. Parasitoid cocoons were individualized and maintained in the bioterium until the emergence of adults, some of which were used to initiate the colonies by region to perform the assays and the rest were used in morphometric studies. Also, the percentage of parasitism (by field and year, and by region and year) was calculated with the recorded data, which (except in a Río Negro field) was quite low for both NOA and Patagonia regions, being a possible explanation the intense application of agrochemicals in the areas.

For morphometric analyzes of each region, measurements were taken of the wings, head, metatibia and ovipositor of females. With these measures, proportions were established, which were then statistically compared within and among populations. Results indicated that the individuals of the three selected populations have a slight intraspecific variability, being the population of the Patagonia region the one that differs the more from the rest, and the individuals of BA those who have the largest size. However, such variability does not become sufficient to be considered different species.

To determine the existence of reproductive isolation, cross-over experiments were performed between BA and SA populations, and between BA and RN populations. The populations of SA and RN could not be crossed because the samples were taken in different years and the colonies could not be maintained simultaneously. Female proportion of the offspring was estimated and used to calculate reproductive compatibility (an average relative value). As well the sexual isolation index, the asymmetry index and the cross-product estimator were calculated. The results obtained indicated that the local populations RN and BA were highly compatible. On the contrary, there was a lower reproductive compatibility between SA and BA.

Finally, biological attributes (functional response and attack rate, pre-imaginal development time, and sex ratio) of different local populations were estimated in the laboratory, under different temperature conditions. The functional response of individuals of *P. dignus* from different populations and under different temperature was independent of the density of *T. absoluta* larvae offered. The pre-imaginal development time differed between the three populations and the BA population showed longest times. Sex ratio was similar

in the three populations at the temperatures tested, without deviating from the 1:1 ratio (except for SA at 30° C).

In order to summarize, intraspecific variation was observed among the three populations studied, in relation to their morphometry and to some of the bioecological traits studied. Likewise, the populations of RN and SA showed to be reproductively compatible with BA, showing greater compatibility the population of RN with the population of BA.

The results obtained provide a basis for the development of augmentative biological control programs for the tomato moth. They suggest that the massive breeding of *P. dignus* for release in different horticultural regions of Argentina could be carried out with individuals from any of the three local populations studied in this Thesis work.

Capítulo 1

Introducción general

En el marco de la agricultura moderna el control de plagas agrícolas basado en el uso casi exclusivo de agroquímicos constituye una de las principales estrategias para aumentar la producción (Colmenárez et al. 2016). Este modelo agrícola hegemónico enfrenta, sin embargo, una importante crisis causada por los problemas ambientales, socio-culturales, económicos y el riesgo a la salud humana que ocasiona (Sánchez 2012; Sarandón et al. 2014).

En cuanto a los problemas ambientales, debido a la creciente dependencia a los agroquímicos, se encuentran la aparición de nuevas plagas y de plagas secundarias, el desarrollo de resistencia a los plaguicidas de ciertas plagas y patógenos, y la contaminación de alimentos, suelos, aire, cuencas y cuerpos de agua subterráneas y superficiales (Vera et al. 2010; De Gerónimo et al. 2014; Sarandón y Flores 2014). Esto, a su vez, tiene como consecuencia la pérdida de biodiversidad, ya que conlleva un gran riesgo para la fauna que habita estos ambientes, tanto invertebrados (Schneider et al. 2009; Santadino et al. 2014; Benamú et al. 2010), como varios grupos de vertebrados, entre ellos, peces (Menéndez-Helman et al. 2015; Brodeur et al. 2017), anfibios (Relyea 2005; Paganelli et al. 2010), aves (Bernardos y Zaccagnini 2011), y mamíferos (Galloway y Handy 2003).

No menos importante son los efectos extremadamente perjudiciales que genera para la salud de los trabajadores rurales y los consumidores. Numerosos trabajos científicos reportan la asociación entre el uso de distintos agrotóxicos empleados en la agricultura con la ocurrencia de cáncer (Mac Lennan et al. 2002; De Roos et al. 2005; Bassil et al. 2007) y malformaciones congénitas (Benítez-Leite et al. 2009), entre otros.

Este modelo de agricultura industrial incrementa la producción de monocultivos exportables, y subvalora y margina a las comunidades rurales de campesinos y agricultores. Esto se traduce en la pérdida de cultivos ancestrales y de germoplasmas nativos adaptados a la zona, lo cual empobrece a los pequeños productores y produce beneficios económicos para unos pocos sectores. Ejemplo de ello son los grandes productores o empresas multinacionales proveedoras de semillas y los insumos del paquete tecnológico del monocultivo (Sánchez 2012; Carballo González 2018).

Las múltiples externalidades mencionadas han dado lugar al interés por la búsqueda de modelos agrícolas alternativos. En lo que respecta al control

de plagas, se intenta promover procesos ecológicos que permitan disminuir insumos contaminantes a fin de lograr una producción agrícola con el mínimo impacto ambiental posible (Altieri 2009).

1.1 ¿A qué llamamos plaga agrícola? Nivel de daño económico, umbral de daño económico y Manejo Integrado de Plagas (MIP)

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization - FAO) una plaga es cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales. Desde un punto de vista ecológico, una especie animal, planta o microorganismo es considerada plaga cuando su densidad poblacional tiene un efecto negativo sobre la producción agrícola, causando una reducción del rendimiento de un cultivo y/o calidad del producto cosechado, en una cantidad tal que es económicamente no rentable o perjudicial para el productor (Dent 1993).

Las principales hipótesis ecológicas que explican las razones por las cuales una o más especie de insectos fitófagos pueden convertirse en plaga agrícola fueron planteadas por Root (1973), quien formuló que (1) el aumento de la población del insecto fitófago puede verse estimulada por la concentración espacial del alimento, abundante y permanente, que representa un monocultivo, conocida como la hipótesis de la concentración del recurso; y (2) la aparición de las plagas se atribuye a la disminución y/o desaparición de enemigos naturales que se produce en un monocultivo, ya sea por falta de presas y hospedadores alternativos, la disponibilidad y distribución espacial de fuentes de polen y néctar, falta de sitios de refugio, etc., denominada como la hipótesis de los enemigos naturales (Pérez Consuegra 2004).

Otra causa importante de la aparición de plagas es por introducción o invasión de una especie fitófaga en una nueva región, lo cual lleva a su establecimiento, aumento poblacional y dispersión geográfica, al encontrarse liberada de factores que la regulaban y controlaban en su región de origen (como por ejemplo, ausencia de enemigos naturales, entre otros). Se trata de plagas invasoras, que por lo general tienen estatus de cuarentenarias (Jacas y Urbaneja 2008; Desneux et al. 2011).

A pesar de la definición de plaga agrícola anteriormente formulada, en la práctica, la categoría de plaga se aplica a cualquier organismo que en un momento dado provoque un daño, independientemente de la magnitud de éste, sin reparar en que algunas especies consideradas plagas pueden actuar como tal en una circunstancia dada, y en otras como organismos no perjudiciales. Teniendo esto en cuenta, Stern et al. (1959) definieron dos parámetros fundamentales a tener en cuenta al momento de tomar decisiones económicas con respecto al manejo de una plaga agrícola: el nivel de daño económico (NDE) y el umbral de daño económico o umbral de acción (UE).

El NDE corresponde a la densidad poblacional de la plaga por encima de la cual se produce una pérdida económica. Según Stern et al. (1959) es “el menor nivel de densidad poblacional de una plaga que causará daño económico, o la cantidad de daño que justifica el costo de control”.

El UE es la densidad poblacional de la plaga a la cual deben aplicarse medidas de control para evitar que la población sobrepase el NDE.



Figura 1.1 Nivel de daño económico y umbral económico (adaptado de Radcliff et al. 2009)

Estos parámetros se emplean en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Kogan 1998; Kogan y Bajwa 1999; Radcliff et al. 2009), un concepto que surgió para limitar el uso de plaguicidas y favorecer el control biológico, entre otras técnicas de control. Ambos parámetros se estiman considerando los costos que

son balanceados con los beneficios económicos de la producción de un cultivo cuando se toma alguna medida de control (Radcliff et al. 2009).

Pedigo et al. (1986) introdujeron la fórmula para calcular el NDE:

$$NDE = \frac{C}{VDK'}$$

donde C es el costo de manejo por unidad de producción (\$/ha, por ej.); V el valor en el mercado del producto (\$/kg); D es la función de daño, que representa la pérdida de rendimiento por individuo de la plaga (por ej., la reducción en 1 kg de producción/ha/unidad de daño por individuo de la plaga); y K es la reducción proporcional del daño debido al manejo (es decir, la eficiencia del control).

El UE se define en términos de la densidad de plaga a la cual debería tomarse la decisión de controlarla, antes de alcanzar el NDE. Por ejemplo, si el NDE de una plaga es de 10 larvas/planta, el UE podría ser 8 larvas/planta. Así, el UE provee una “ventana temporal” antes de que la plaga produzca un pérdida económica.

A pesar de la aceptación casi universal de estos conceptos, su aplicación práctica aún es bastante restringida debido a múltiples causas, como por ejemplo la naturaleza de la plaga, el cultivo, la influencia de la industria de los agroquímicos, y la confiabilidad en el control químico por parte de los productores, entre otras.

1.2 El control biológico como técnica para el manejo de plagas en un contexto agroecológico

La Agroecología surge como alternativa al control de plagas basado en el alto consumo de agroquímicos. Este nuevo paradigma aplica principios y conceptos ecológicos con un enfoque holístico, que considera a las plagas como un componente más del agroecosistema que interactúan y se relacionan con otros organismos del entorno, representando así un importante avance en la transición hacia una agricultura sustentable (Gliessman 1997). En este contexto, el control biológico mediante enemigos naturales constituye un servicio ecosistémico que puede ser usado por el hombre para el manejo de plagas en los cultivos (Costanza et al. 1997).

Las poblaciones de casi todos los organismos vivos están sometidas a una mortalidad natural por factores climáticos y enemigos naturales, tales como depredadores, parásitos, y enfermedades. Este proceso se conoce como **control natural**. En casos en los que este control no es suficiente, la liberación o promoción de poblaciones de estos enemigos naturales en el sistema agrícola puede reducir o reemplazar el uso de plaguicidas sintéticos. Esta técnica se denomina **control biológico** o biocontrol y ha sido definida de varias maneras, aunque la mayoría coinciden en poner énfasis a la posibilidad de la manipulación de enemigos naturales por parte del hombre.

El término fue definido por primera vez por Harry S. Smith en 1919 como “el uso de los enemigos naturales, ya sea introducidos a una zona nueva o manipulados con el objetivo de controlar las plagas” (Huffaker 1971). Según DeBach (1964), el control biológico es la acción de parasitoides, depredadores o patógenos para mantener la densidad de la población de un organismo plaga a un promedio menor del que ocurriría en su ausencia. Van den Bosch et al. (1982) definieron al control biológico como la manipulación de los enemigos naturales por parte del hombre con el fin de controlar a las plagas agrícolas (oponiéndolo al control natural, que ocurre espontáneamente en la naturaleza sin la intervención humana). Según la Organización Internacional para el Control Biológico (International Organization for Biological Control, IOBC <https://www.iobc-global.org>), institución que promueve métodos ambientalmente seguros para el control de plagas y enfermedades, el control biológico se define como la utilización de organismos vivos o sus productos para prevenir o reducir las pérdidas o daños causados por organismos plaga.

En resumen, el control biológico es un método basado en el uso de poblaciones de enemigos naturales para reducir la densidad de poblaciones de insectos plaga a valores menores al nivel de daño económico, ya sea temporal o permanentemente. Es importante aclarar que los métodos que aplican toxinas u otros derivados de organismos vivos no son considerados como control biológico (van Driesche et al. 2007).

Los organismos utilizados como agentes de control biológico se denominan **enemigos naturales**, organismos benéficos o biocontroladores. Éstos pertenecen a muchos grupos taxonómicos y difieren ampliamente en su biología y ecología. Según su modo de acción pueden clasificarse como entomófagos (depredadores y

parasitoides) o entomopatógenos (virus, bacterias, hongos y nematodos) (Hajek 2004; van Driesche et al. 2007; Jacas y Urbaneja 2008).

Los entomófagos son aquellos que se alimentan del insecto plaga. Los depredadores, especies comúnmente generalistas, atacan, matan y consumen más de un individuo presa a lo largo de su vida, y tanto los estados inmaduros como los adultos, y de ambos sexos, predan su alimento. Para plagas agrícolas, los depredadores principalmente son artrópodos, que pertenecen a los órdenes Coleoptera, Heteroptera, Diptera, Hymenoptera, Neuroptera, Araneae y Acari. Por otra parte, los parasitoides son organismos más especializados por la especie que usan como recurso alimenticio, y tienen como particularidad que el estado larval vive a expensas de su hospedador, el cual finalmente muere a causa de la interacción. Los parasitoides muestran especificidad por el estado del hospedador atacado, y en menor medida por el grupo taxonómico que parasitan. Son en su mayoría insectos endopterigotas, cuya hembra deposita sus huevos cerca, sobre (ectoparasitoide) o dentro (endoparasitoide) de otro artrópodo (generalmente un insecto). Los adultos, son todos de vida libre. Los órdenes de insectos donde comúnmente se encuentran especies con este hábito de vida son Hymenoptera y Diptera.

Los entomopatógenos, en cambio, son microorganismos que poseen una alta especificidad por el insecto hospedador, al cual enferman conduciéndolo a su muerte. Se cuentan especies entomopatógenicas en varios grupos de microorganismos, como por ejemplo, Baculoviridae (virus), *Bacillus thuringiensis* (bacteria), *Beauveria* sp., *Entomophaga* sp., *Metarhizium* sp. (hongos) y nematodos de las familias Heterorhabditidae, Phaenopsitylenchidae y Steinernematidae. Estos agentes se aplican como “bioplaguicidas”, a través de la formulación y asperjado (López Lastra y Lecuona 2019).

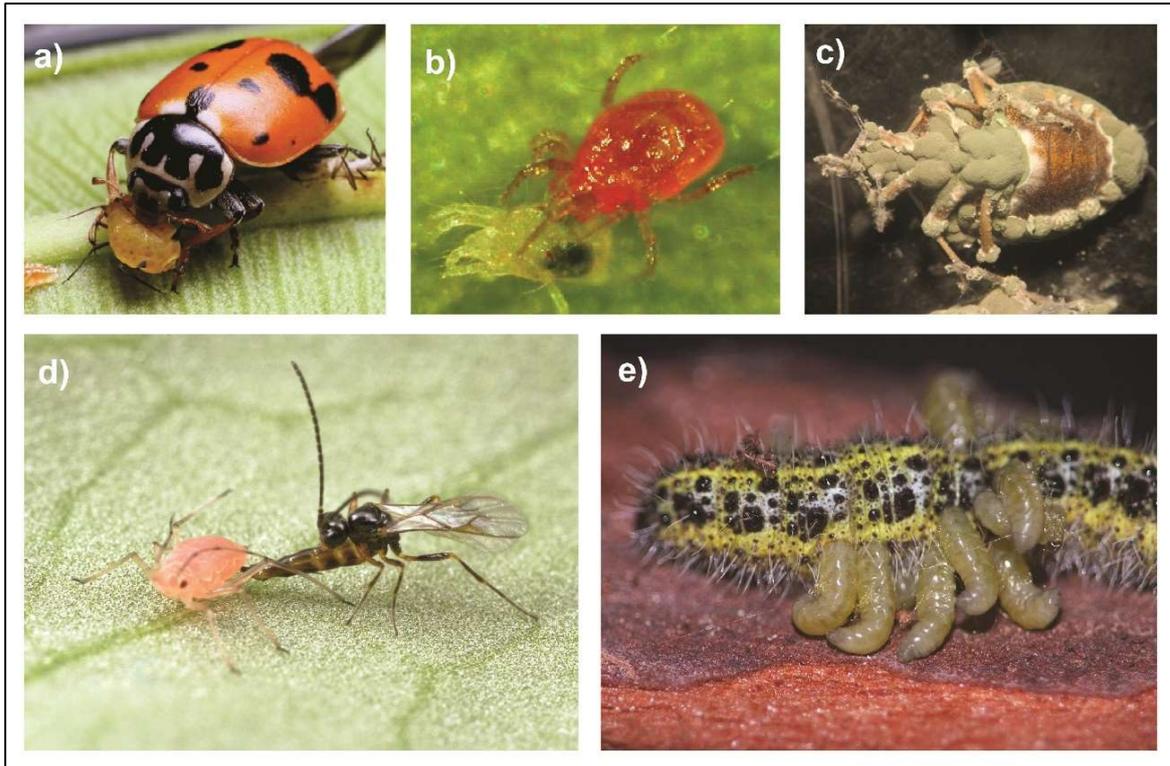


Figura 1.2 Enemigos naturales: **a)** Coleóptero depredador (Fotografía: <https://arrobasdennaranjas.com/>); **b)** Ácaro depredador (Fotografía: Dra. Claudia Cédola); **c)** hongo entomopatogeno (Fotografía: <http://sistemaagricola.com.mx/>); **d)** avispa adulta de un parasitoide atacando a un hospedador (áfido) (Fotografía: Alex Wild <https://phys.org>); y **e)** larvas de un parasitoide emergiendo del hospedador (Fotografía: <https://scribol.com>)

El control biológico (CB) puede ser aplicado siguiendo tres tipos de estrategias de acuerdo a la forma en que se manipulan los enemigos naturales dentro del agroecosistema: CB clásico, cuando se desea controlar una plaga exótica, invasora, mediante la importación de uno o varios enemigos naturales nativos del lugar de origen de la plaga; CB aumentativo, basado en el incremento de la densidad poblacional de uno o varios enemigos naturales criados en biofábricas mediante liberaciones de los mismos en el agroecosistema; y CB por conservación, que consiste en la manipulación o modificación del ambiente para mejorar la eficacia de los EN ya establecidos, mediante el uso de técnicas que favorezcan el aumento de hospedadores o presas alternativas, otorguen refugio, y aumenten la supervivencia y reproducción de los enemigos naturales en el agroecosistema (Bellows y Fisher 1999; Eilenberg 2006; van Driesche et al. 2007; Jacas y Urbaneja 2008).

Este trabajo de Tesis se centrará en la técnica del CB aumentativo. Éste suele aplicarse por ejemplo cuando los enemigos naturales están ausentes o son escasos, o cuando el tipo de cultivo y su manejo producen la asincronía de sus poblaciones con la de la plaga. Las liberaciones de agentes de control pueden ser inoculativas o inundativas; en el primer caso se introducen pequeños números de un enemigo natural (entre 1000-10.000 individuos) en distintos momentos del ciclo del cultivo, con el objetivo de que se reproduzcan y su descendencia ejerza el control de la plaga por un período extenso de tiempo, mientras que las liberaciones en masa (o inundativas) consisten en la liberación de un gran número de individuos (> 100.000) para ejercer un control casi inmediato sobre la plaga, con un mecanismo de acción similar al de un insecticida. Ambos tipos de liberaciones son ampliamente utilizadas en cultivos hortícolas, especialmente en aquellos bajo cubierta (van Driesche et al. 2007; Jacas y Urbaneja 2008).

Más de 440 especies de agentes (patógenos, depredadores y parasitoides) son comercializados mundialmente para controlar plagas, enfermedades y malezas (van Lenteren et al. 2018), y se estima que unas 31 millones de hectáreas se encuentran en la actualidad bajo CB aumentativo en Latinoamérica (van Lenteren et al. 2019). De todas maneras, cabe mencionar, que el control biológico aumentativo presenta limitaciones referidas principalmente al costo, la disponibilidad y calidad del agente de control producido masivamente, y a la efectividad en el campo de las técnicas de liberación y de la acción de los organismos criados.

En la Argentina, históricamente, la técnica más utilizada ha sido el CB clásico, con registros de introducciones de enemigos naturales que datan desde principios del siglo XX, principalmente entre 1900 y 1940. En total, se introdujeron ocho especies de depredadores, 70 de parasitoides y siete de patógenos para el control de artrópodos, además de ocho especies de agentes de control biológico de malezas. La Argentina también ha proporcionado especies de enemigos naturales a África, Australia, Canadá y los Estados Unidos de América para el control de artrópodos plagas y malezas. Los principales programas de CB clásico se han orientado hacia la producción frutícola y forestal. En cuanto a las iniciativas privadas, una pequeña fracción de los cultivos de tomate y pimiento de invernadero están bajo CB aumentativo. A pesar del interés creciente por parte del sector agrícola y de algunas políticas llevadas a cabo por el Estado, el control biológico

aplicado en todas sus formas aún no se ha desarrollado suficientemente en la Argentina (Greco et al. 2019). El desarrollo de esta tecnología redundaría además en el mejoramiento de la calidad ambiental por reducción del uso de plaguicidas.

1.2.1 Los parasitoides en el control biológico

La biología de estos insectos endopterigotas presenta numerosas variantes. En un único individuo hospedador pueden desarrollarse uno o más parasitoides. El estado adulto es de vida libre, y se alimenta de productos vegetales como néctar o polen. Incluso, hay especies que al momento de la oviposición la hembra se alimenta de fluidos del hospedador (hemolinfa y/o tejidos corporales), por un mecanismo conocido como *host-feeding* o picaduras alimenticias (Hawkins 1994; Quicke 1997; Jacas y Urbaneja 2008).

Existen diversas maneras de clasificar a los parasitoides de acuerdo a distintas características de su biología. Según el estado del hospedador al momento de ser atacado, pueden clasificarse como parasitoides de huevos u oófagos, parasitoides de larvas, parasitoides de pupas y parasitoides de adultos. Si se alimentan y desarrollan interna o externamente al hospedador se los denomina endoparasitoides o ectoparasitoides, respectivamente. Por otro lado, también se los puede clasificar teniendo en cuenta si el parasitoide permite o no continuar con el desarrollo del hospedador después de haber sido parasitado, como koinobionte, si permite el desarrollo del huésped posteriormente a la oviposición, e idiobionte, si no lo permite y detienen su crecimiento al momento de la oviposición. En este último caso, paraliza (pero no mata) permanentemente al hospedador por medio de la inyección de veneno con ayuda del ovipositor, facilitando el parasitismo (van Driesche et al. 2007).

Los parasitoides son importantes agentes de control biológico por su ubicuidad, eficiencia de búsqueda y ataque del hospedador, y por su especialización en unas pocas especies hospedadoras, entre otras características positivas. Es por esto que son los enemigos naturales más comúnmente utilizados para el manejo de insectos plagas, sobre todo porque representan un menor riesgo para las especies no blanco. Es así que los parasitoides registran tasas de establecimiento y éxito de control

comparativamente más altas en los programas de control biológico con respecto a otros agentes de control (Bellows y van Driesche 1999; van Lenteren 2012a).

La producción de enemigos naturales de alta calidad es esencial, así como también los estudios para determinar las mejores estrategias de liberación y predecir el grado de control de la plaga logrado por el agente en el campo (Quicke 1997; van Driesche et al. 2007). Por ello, para tener éxito en los programas de CB aumentativo, resulta fundamental identificar cuáles son los factores que limitan las poblaciones de enemigos naturales o que influyen de una manera negativa sobre su capacidad de control.

Según van Lenteren (2003) la selección de candidatos adecuados como agentes de biocontrol debe inicialmente comenzar con la recopilación de información, y si no existe, estudiar los atributos de la historia de vida de especies de enemigos naturales comunes para la plaga, para elegir aquella que muestre mejores características como controlador. La producción en masa y la validación del control efectivo en el campo permitirán conocer si resulta finalmente un candidato adecuado o si se debe seguir evaluando la potencialidad de nuevas especies. Así, este autor propone para insectos parasitoides los siguientes criterios de selección para evaluar las potenciales especies: 1) sincronización estacional con su hospedador (i.e. la plaga), 2) compatibilidad fisiológica con el hospedador, 3) adaptabilidad climática, 4) capacidad de ser criado en masa con relativa facilidad, 5) especificidad con su hospedador, 6) potencial reproductivo, con una tasa intrínseca de incremento (r) mayor a la del hospedador, 7) buena respuesta a la densidad del hospedador, y 8) no tener efectos adversos (por ejemplo, parasitoides secundarios o hiperparasitoides).

1.2.2 Variación geográfica de las poblaciones y su efecto sobre el desempeño de los parasitoides como agentes de control biológico

Cuando una especie ocupa una gran extensión geográfica, debido a la heterogeneidad de los entornos naturales, sus diferentes poblaciones estarán sujetas a distintas presiones de selección, ejercidas por distintas condiciones bióticas y abióticas. Esto eventualmente puede conducir a que individuos de poblaciones locales muestren diferencias o variaciones genotípicas y fenotípicas (variación intraespecífica o interpoblacional). A su vez, la divergencia de las

poblaciones de una especie ampliamente distribuida puede conducir al aislamiento reproductivo (Hartl y Clark 2007). Esa variación intraespecífica (morfológica, fisiológica o de comportamiento) puede obedecer a dos factores: la adaptación local, que se da cuando ocurre la diferenciación genética entre poblaciones como consecuencia del aislamiento geográfico y los organismos se desarrollan bajo diferentes presiones de selección; o la plasticidad fenotípica, que hace referencia a la capacidad intrínseca que poseen los individuos al poder expresar diferentes fenotipos a partir de un mismo genotipo en respuesta a la heterogeneidad ambiental (la norma de reacción). A su vez, la variación intraespecífica puede ser observada entre poblaciones (nivel interpoblacional), entre individuos (nivel intrapoblacional) o en el individuo (Salgado y Paz 2015; Lommen et al. 2017).

Existen registros de fallas o baja eficacia de programas de control biológico cuando se han utilizado individuos provenientes de poblaciones locales de especies que se encuentran ampliamente distribuidas. Entre otras causas, se mencionan razones genéticas, producto de la selección artificial, cría y manipulación de las poblaciones de los enemigos naturales, o a que los individuos liberados no se adaptan a las condiciones de la nueva región (Whitten y Hoy 1999; van Lenteren 2003; Luna et al. 2004; Phillips et al. 2008).

Lommen et al. (2017) (Fig. 1.3) señalaron las ventajas de seleccionar genotipos con valores de atributos biológicos óptimos como una herramienta para desarrollar agentes de biocontrol aumentativo más efectivos. Para ello, sugieren explotar la variación intraespecífica natural de la especie de enemigo, seleccionando individuos de poblaciones con propiedades cercanas a las deseadas para el agente de control biológico (alta fecundidad y proporción de sexos de la descendencia igualitaria o sesgada hacia las hembras, en el caso de parasitoides), y que a la hora de ser confrontados con condiciones ambientales diversas se desempeñen adecuadamente como agentes de control. Esto se denomina “selección de biotipos”. Si bien este enfoque ha sido ampliamente utilizado para la selección de variedades de plantas más resistentes, sabrosas, etc., en la producción agropecuaria, y en el desarrollo de bioplaguicidas, su aplicación en la cría masiva de artrópodos como agentes de control biológico es escasa.

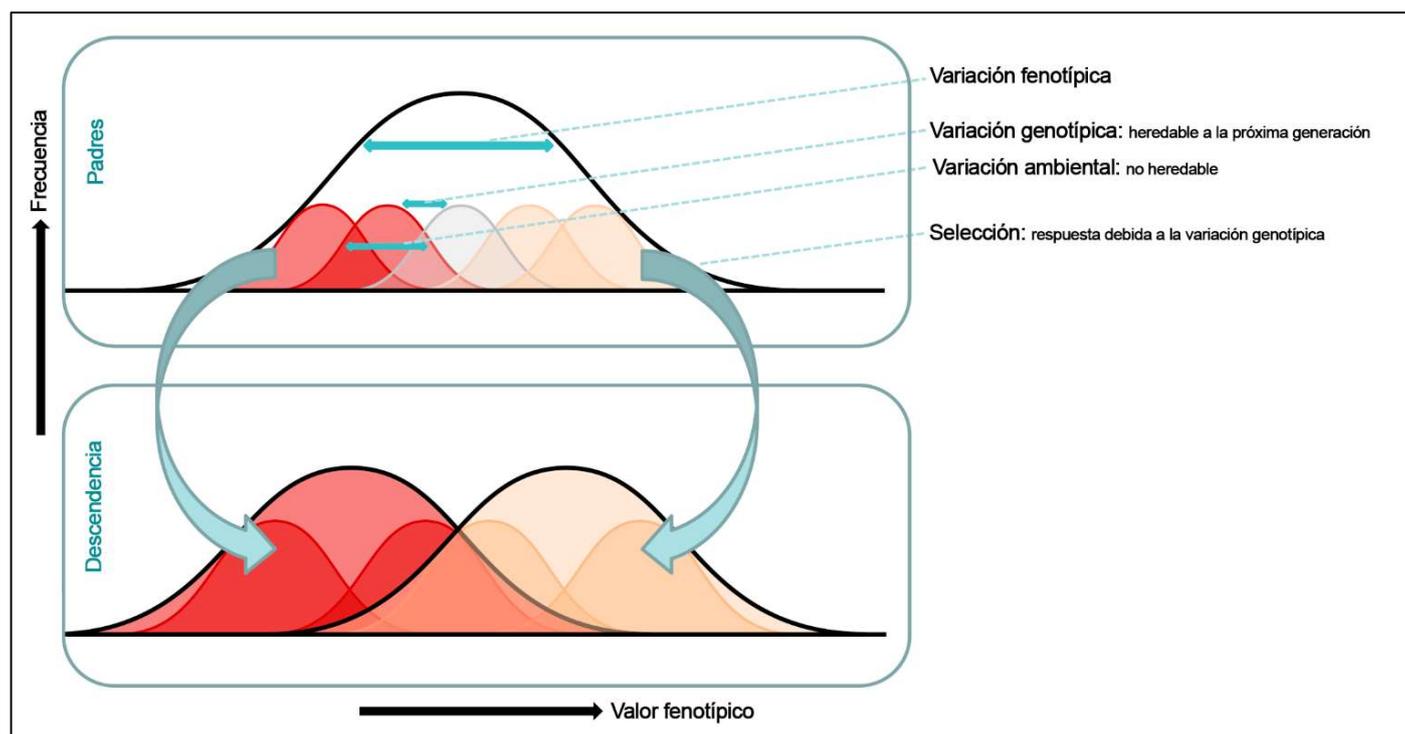


Figura 1.3. “Selección de biotipos”: diagrama conceptual que ilustra la variabilidad intraespecífica del fenotipo de algún atributo considerado positivo para una especie candidata como agente de CB; y la selección de individuos con propiedades cercanas a las deseadas para ese agente de biocontrol para su cría y liberación, que permitirá que se desempeñen adecuadamente en condiciones ambientales particulares (tomado de Lommen et al. 2017)

Por su parte, Hopper (1993) plantea que existen varios rasgos que pueden afectar el establecimiento o control por parte de los agentes de biocontrol, como por ejemplo la adaptación climática, la tasa de búsqueda de huéspedes/presas, la fecundidad, la aceptación del huésped/presa, la sincronía con el huésped, la preferencia de hábitat, la resistencia a los insecticidas, la proporción de sexos, entre otros. Y a su vez, menciona cinco tipos de evidencias disponibles con respecto a la variación intraespecífica en estos rasgos: 1) variación entre *strains* (o biotipos): diferencias entre poblaciones de diferentes regiones geográficas; 2) diferencias ambientales entre poblaciones, que persisten cuando se crían en las mismas condiciones (por ejemplo en el laboratorio); 3) diferencias entre poblaciones seleccionadas artificialmente o entre poblaciones seleccionadas y el control; 4) diferencias en la variación de rasgos cuantitativos, dentro vs. entre grupos de individuos emparentados; y 5) diferencias entre la progenie de cruces entre individuos emparentados o poblaciones. Entonces, al realizar la comparación entre y dentro de poblaciones locales, y la comparación del rendimiento de la población

en un entorno común se pueden observar variaciones en los agentes de control biológico en los rasgos mencionados.

En cuanto a las especies de himenópteros parasitoides, ha sido documentada una considerable variación interpoblacional. Se han observado, por ejemplo, variaciones en el éxito reproductivo y el tiempo de desarrollo, así como en la relación entre el tamaño, la longevidad y fecundidad de parasitoides de la misma especie en distintas regiones (Kraaijeveld y van der Wel 1994; Hufbauer y Roderick 2005; Carneiro et al. 2019).

Por otro lado, en el caso particular de los insectos parasitoides usados para el control biológico, es importante discernir si es posible mantener crías viables basadas en colonias fundadas con individuos provenientes de poblaciones locales de distintas regiones, sobre todo si se trata de poblaciones alopátricas, ya que pueden presentar cierto grado de aislamiento reproductivo que perjudique la cría del agente o conduzca a fallos en los programas de CB aumentativo cuando los organismos son liberados (Rincón et al. 2006). En la bibliografía se han documentado suficientes evidencias de este fenómeno. A modo de ejemplo se pueden mencionar para himenópteros braconídeos el aislamiento reproductivo completo o parcial entre biotipos (*strains*) de *Aphidius ervi* Haliday, parasitoide de áfidos (Takada y Tada 2000); del complejo *Cotesia flavipes* Cameron, parasitoide de larvas de noctuidos y crámbidos (Joyce et al. 2010); de *Bracon hebetor* Say, parasitoide de *Heliothis* sp. (Heimpel et al. 1997); y de *Cotesia plutellae* (Kurdjumov), parasitoide de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae).

De acuerdo a la vasta bibliografía, los cruces recíprocos son un método confiable para determinar la contribución genética a la variación fenotípica y pueden mostrar si las cepas están aisladas reproductivamente o son compatibles (Pinto et al. 1991; Heimpel et al. 1997; Quicke 1997; Takada y Tada 2000; Liu et al. 2002; Bertin et al. 2018). La determinación del aislamiento puede investigarse también usando métodos morfológicos, ecológicos, comportamentales y moleculares; todos ellos brindan información complementaria para conocer la variabilidad intraespecífica y la viabilidad de las cruces (Pérez Figueroa et al. 2008).

Por todo lo expuesto, se hace necesario desarrollar estudios que permitan caracterizar adecuadamente los atributos biológicos y ecológicos de las distintas poblaciones locales de una especie de enemigo natural. Esto contribuirá a diseñar

y establecer crías masivas de calidad, que resulten en el control exitoso de una plaga en aquellas áreas o regiones donde mejor se desempeñen.

1.3 Planteamiento del problema

La producción de hortalizas en la Argentina se realiza en casi todo su territorio debido a la extensión en latitud y a la diversidad de climas y ambientes que posee (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación <https://www.agroindustria.gov.ar>). Gracias a esto, se puede establecer una zonificación de la producción en relación con la temperatura media de cada lugar y cultivar una amplia diversidad de especies, entre las que se encuentra el tomate, uno de los principales cultivos hortícolas producidos en nuestro país y que viene experimentando un incremento de producción y rendimiento sostenido (infoagro.com).

En las principales regiones de producción de tomate de la Argentina, el cultivo es atacado por una amplia variedad de especies plagas. Entre ellas, una de las más importantes en cuanto a las pérdidas económicas que produce es la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Pereyra y Sánchez 2006; Argerich 2011; Luna et al. 2015; Silva et al. 2015), especie de microlepidóptero originario de América del Sur (Pereyra y Sánchez 2006; Luna et al. 2012). Esta plaga es controlada principalmente mediante el uso de una amplia variedad de plaguicidas de síntesis, neurotóxicos y reguladores del crecimiento (Cáceres 2000; Lietti et al. 2005; Strassera 2009; Luna et al. 2012). Sin embargo, se ha reportado baja eficacia del control químico, debido al hábito minador de *T. absoluta* y al rápido desarrollo de poblaciones resistentes (Siqueira et al. 2000; Lietti et al. 2005).

Desde hace varios años se vienen desarrollando investigaciones tendientes al control biológico de esta plaga en el país por medio del uso de un endoparásitoide larval, nativo, *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Colomo et al. 2002; Luna et al. 2007; Sánchez et al. 2009; Vallina et al. 2012; Nieves et al. 2015; Salas Gervasio et al. 2019a). Estas investigaciones indican, *a priori*, que el mismo posee características positivas para ser considerado un buen agente de control mediante liberaciones aumentativas estacionales. Entre estas características se pueden mencionar: su presencia espontánea en cultivos de tomate y berenjena tanto a cielo

abierto como protegido, con distinto manejo sanitario, y también en varias solanáceas no cultivadas; un rango de hospedadores restringido prácticamente a *T. absoluta* y otros pocos geléquidos; una buena sincronización estacional con la plaga; una respuesta de agregación en los manchones de mayor densidad de la plaga; una tasa de ataque mayor a la tasa de incremento (r) de la plaga; y su facilidad para la cría artificial, pudiendo las pupas ser almacenadas a 10° C hasta cuatro semanas.

Con respecto a la distribución geográfica de *P. dignus*, se sabe que está presente en el continente americano (Cardona y Oatman 1971; Oatman y Platner 1989; Bennett 1995; Fernández-Triana et al. 2014). En la Argentina ha sido reportado para algunas provincias productoras de tomate, a saber: Buenos Aires, Tucumán y Jujuy (Colomo et al. 2002; Sánchez et al. 2009; Puch 2011). Sin embargo, la información sobre su distribución geográfica es aún incompleta para otras zonas del noroeste argentino y las regiones cuyana y patagónica, donde las condiciones climáticas son diferentes, y a su vez bastante apropiadas para el desarrollo de *T. absoluta* (Tonnang et al. 2015). Por otra parte, los estudios sobre atributos biológicos y ecológicos de *P. dignus* se han realizado solamente con colonias obtenidas a partir de individuos provenientes de la provincia de Buenos Aires (Luna et al. 2007; Vallina et al. 2012; Nieves et al. 2015).

La identificación y optimización de agentes de control biológico eficientes, requiere comprender la variación natural de la especie en sus atributos, sobre todo de aquellos que son importantes para el control biológico, así como de los factores que determinan esta variación. En el caso de un programa de control biológico aumentativo, para que sea exitoso, los agentes de biocontrol requieren de una cría en masa eficiente antes de la liberación y deben ser efectivos para controlar la plaga después de la liberación. Por lo tanto, se requieren estudios centrados en los rasgos o atributos relacionados con su calidad durante la producción y con su eficacia de control de plagas (capacidad de reducir la densidad poblacional de la plaga).

Es por esto que surgen los siguientes interrogantes:

- ¿Sería factible utilizar este enemigo natural para el control biológico de *T. absoluta* en regiones con características climáticas y agronómicas diferentes?
- ¿Cuál es el rango de distribución geográfica y el parasitismo causado por *P. dignus* en la Argentina?

- ¿Son las poblaciones locales interfértiles o han alcanzado algún grado de aislamiento reproductivo según la región donde se desarrollan?
- ¿Existe variación en los valores de los atributos biológicos y ecológicos de distintas poblaciones locales del parasitoide de las principales zonas productoras de tomate?

1.4 Hipótesis y predicciones

Hipótesis 1: *Pseudapanteles dignus* tiene una distribución geográfica mayor en el cultivo de tomate a la conocida actualmente para la Argentina, y la abundancia de sus poblaciones naturales difiere entre regiones. **Predicción:** *Pseudapanteles dignus* se encontrará parasitando larvas de *T. absoluta* en las principales regiones productoras de tomate de la Argentina, y su abundancia variará en cada una de ellas.

Hipótesis 2: las poblaciones locales de *P. dignus* han alcanzado cierto grado de diferenciación morfológica, producto del aislamiento geográfico. **Predicción:** individuos de diferentes poblaciones locales presentarán variaciones morfológicas.

Hipótesis 3: las poblaciones de *P. dignus* de las distintas regiones presentarán cierto grado de incompatibilidad reproductiva, producto del aislamiento geográfico. **Predicción:** las distintas poblaciones locales no serán totalmente interfértiles.

Hipótesis 4: características biológicas y ecológicas de *P. dignus* difieren entre poblaciones de distintas regiones. **Predicción:** existen poblaciones locales de *P. dignus* con características de su historia de vida que las hacen potencialmente más eficientes en el parasitismo de *T. absoluta* en tomate.

1.5 Objetivo general

El objetivo general es el control biológico de la “polilla del tomate” *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) en la Argentina, mediante el uso de uno de sus enemigos naturales nativos, el endoparásitoide larval *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae).

1.6 Objetivos específicos

- 1) Determinar el rango de distribución geográfica de *P. dignus* en cultivos de tomate de la Argentina y estimar el parasitismo a campo (como una medida de la abundancia) en diferentes regiones
- 2) Confirmar la identidad de los ejemplares en estudio hallados en cada región mediante el análisis de caracteres morfológicos, y comparación de los mismos entre las poblaciones seleccionadas
- 3) Determinar la existencia de aislamiento reproductivo entre las diferentes poblaciones locales de *P. dignus* y la población de referencia establecida (población de la provincia de Buenos Aires)
- 4) Estimar y comparar, en el laboratorio, atributos bioecológicos (respuesta funcional y tasa de ataque, tiempo de desarrollo pre-imaginal, proporción de sexos) de individuos de *P. dignus* provenientes de poblaciones de distintas regiones de la Argentina

Capítulo 2

Sistema de estudio

2.1 El cultivo de tomate

2.1.1 Generalidades

La especie *Solanum lycopersicum* L., conocida comúnmente como tomate, tomatara o jitomate, es una planta herbácea de la familia Solanaceae. Es de origen americana, probablemente de la región andina Perú-Ecuador, desde donde fue llevada a Centroamérica y México. En ese entonces se domesticó y convirtió en parte básica de la dieta humana. Luego, se cree que en el siglo XVI fue introducida en Europa, donde españoles y portugueses la difundieron a Oriente Medio y África, de allí a otros países asiáticos, y desde Europa también a Estados Unidos de América y Canadá (Escalona et al. 2009; Argerich y Troilo 2010).

Este cultivo ha ganado gran importancia en la alimentación mundial actual, ya sea a través de su consumo fresco como industrializado en salsas, jugos, etc., debido a su alto contenido en vitaminas (sobre todo A y C), a la escasa cantidad de calorías y por su alto contenido en agua. Además, contiene potasio, ácido fólico, azúcares simples y licopeno (importante antioxidante). Después de la papa (*Solanum tuberosum* L.), el tomate es la hortaliza de la familia de las Solanáceas más cultivada en el mundo. Es posible cultivarla en una amplia variedad de climas, tanto a campo como bajo cubierta (Figs. 2.1 y 2.2), pero es muy sensible a las heladas, lo que determina su ciclo anual. Sin embargo, si las condiciones climáticas son favorables, su crecimiento puede prolongarse varios años. Las temperaturas óptimas para su desarrollo según el ciclo de vida son: T° nocturna: 15-18 °C; T° diurna: 24-25°C; T° de floración: 21°C; y T° para desarrollo vegetativo: 22-23 °C (Rodríguez et al. 1989; Argerich y Troilo 2010; Argerich 2011; Argerich y Gaviola 2011).



Figura 2.1. Cultivo de tomate, *Solanum lycopersicum*, a cielo abierto (provincias de Salta y Río Negro)



Figura 2.2. Cultivo de tomate, *Solanum lycopersicum*, bajo cubierta (provincias de Salta y Río Negro)

La planta de tomate (Fig. 2.3) es de tipo herbácea, muy ramificada y pubescente (Parodi 1964). Su sistema radicular está constituido por una raíz principal, pivotante, que puede alcanzar 1 o 1,5 metros de profundidad, raíces secundarias y adventicias (Rodríguez 1989; Pérez et al. 2002; Argerich y Troilo 2010). El tallo puede medir hasta 2,5 metros de longitud y está recubierto por

pelos o tricomas, entre ellos glandulares, a los que se les atribuyen funciones de defensas físicas y químicas (secreción de terpenoides y compuestos fenólicos) contra la herbivoría, y le confieren a la planta además su olor característico (Schillmiller et al. 2010). Las hojas se disponen sobre los tallos en forma alterna; son compuestas e imparipinnadas, con generalmente 7-9 folíolos peciolados, lobulados o dentados, y al igual que el tallo, están recubiertas por pelos glandulares. Las flores forman inflorescencias, que pueden tener forma de racimos simples o ramificados, normalmente conteniendo entre 3 y 10 flores. El fruto suele ser de color rojo o amarillo, con forma redondeada, achatada o alargado, de tamaño muy variable según el cultivar, y su superficie es lisa o surcada (Rodríguez 1989; Argerich y Troilo 2010).

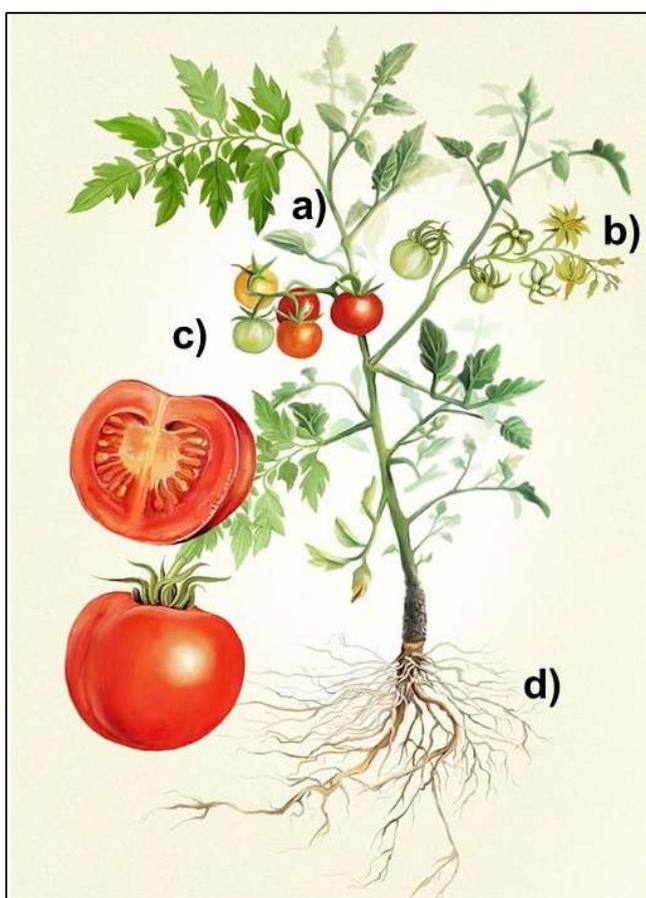


Figura 2.3. Morfología de la planta de tomate: a) tallo con flores y frutos; b) flor; c) fruto; d) raíces (tomado de <https://www.britishmetalsigns.co.uk/>)

Por su hábito de crecimiento, las variedades de tomate pueden ser de crecimiento determinado o indeterminado de acuerdo a si el tallo detiene su crecimiento a causa de la formación de una inflorescencia terminal, o presenta

un crecimiento continuo (Pérez et al. 2002; Argerich y Troilo 2010; López Marín 2017).

Por último, en cuanto a la fenología de la planta de tomate, se reconocen las tres etapas (Pérez et al. 2002): *Inicial* (plántula); *vegetativa* (desarrollo vegetativo y floración); y *reproductiva* (fructificación).

2.1.2 Situación del cultivo en el mercado mundial y nacional

Según registros de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) en el año 2017 el área total de tomate cosechada para consumo fresco a nivel mundial alcanzó un valor de 4.848.384 hectáreas, con una producción de 182.301.395 toneladas. En orden de importancia, los diez productores principales responsables del 75,16% fueron China, India, Turquía, Estados Unidos, Egipto, Irán, Italia, España, México y Brasil, siendo Méjico el principal exportador mundial de tomate fresco con un volumen promedio de 7,5 millones de toneladas por año. En la Argentina, los datos registrados para ese mismo año informan que hubo un área cosechada igual a 16.915 hectáreas, con una producción de 660.753 toneladas. Nuestro país se encuentra en el puesto número 25 como productor mundial de esta hortaliza, pero tiene poca importancia como país exportador de tomate fresco (<1 % de su producción, destinada a Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) (Subsecretaría de Mercados Agropecuarios, Ministerio de Agroindustria 2017).

En cuanto al tomate para industria, los principales productores mundiales son Estados Unidos de América (California), Europa y Asia. La Argentina se encuentra en el puesto número 12, con una producción que en la temporada 2016-2017 alcanzó a 488.000 toneladas en 16.195 hectáreas. El tomate ocupa el 6º puesto en el rubro de hortalizas procesadas. Los tomates en conserva (en trozos o enteros) representan el principal producto de exportación dentro de la cadena de conservas vegetales. También se exportan puré de tomate y salsas, principalmente a Paraguay y Uruguay, y tomates pelados a Brasil para la industria hotelera (Subsecretaría de Mercados Agropecuarios, Ministerio de Agroindustria 2017). El consumo interno de tomate para industria se calcula en 16 kg/hab/año, lo que equivale a unas 700.000 toneladas anuales (Argerich 2017).

En la Argentina, el tomate ocupa una gran superficie bajo cubierta y su producción es continua a lo largo de todo el año, debido a la extensión en latitud y a la diversidad de ambientes. De esta manera se produce una zonificación de la producción que permite la llegada del producto al mercado a lo largo de todo el año, adecuándose la oferta a la estacionalidad de la demanda (Corvo Dolcet 2005; Argerich 2017; Subsecretaría de Mercados Agropecuarios, Ministerio de Agroindustria 2017).

Actualmente en el mercado se comercializan tres tipos de tomate (Argerich y Troilo 2010):

- Redondo (principalmente para consumo en fresco)
- Perita (para industria o consumo en fresco)
- Cherry (para consumo en fresco)

2.1.3 Principales zonas productoras de tomate en la Argentina

La producción de tomate comercial se encuentra distribuida a lo largo de todo el país (excepto en el sur de la Patagonia), ya que, como se mencionó anteriormente, es posible cultivarlo en una amplia variedad de climas, tanto a campo como bajo cubierta. Las provincias de Mendoza, Río Negro, Santiago del Estero, San Juan y Catamarca se dedican principalmente a la producción de tomate para uso industrial (tomate perita) y el tomate redondo para consumo fresco se produce en Buenos Aires, Salta, Jujuy, Tucumán, Corrientes, Santa Fe y otras provincias.

En general, en Argentina se suelen reconocer cinco regiones productivas bien diferenciadas respecto a su clima, suelo y geografía (Fig. 2.4): 1) Región Noroeste; 2) Región Noreste; 3) Región de Cuyo; 4) Región Pampeana; y 5) Región Patagónica (Corvo Dolcet 2005; Ferraris 2015).

1) La **Región Noroeste** (NOA) comprende las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y La Rioja. Esta región representa la zona de “primicia” por excelencia, ya que se producen hortalizas sensibles al frío durante pleno invierno para abastecer a todo el país. El cultivo de tomate para consumo fresco es el más importante de la región, y se realiza principalmente en las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán.

2) La **Región Noreste** (NEA) comprende las provincias de Chaco, Corrientes, Formosa y Misiones. El cultivo de tomate se realiza particularmente en Corrientes, provincia que presenta la mayor concentración de invernaderos destinados a este cultivo.

3) La **Región de Cuyo** comprende las provincias de Mendoza, San Juan y San Luis. La producción de tomate se practica principalmente a campo en San Juan y Mendoza, y su destino es el industrial (para mercado interno o exportación).

4) La **Región Pampeana** comprende las provincias de Buenos Aires y parte de La Pampa, Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba. La agricultura es una de las actividades económicas más importantes del área pampeana. En esta región encontramos varias subregiones y cinturones hortícolas, sobre todo en Buenos Aires, principal productora de hortalizas del país, donde el tomate representa la hortaliza cultivada más importante. Esta provincia tiene dos grandes zonas productivas, una en el cinturón verde que rodea a la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de La Plata, donde se destacan los municipios de La Plata y Florencio Varela, y la otra en el cinturón verde de Mar del Plata que se encuentra en el municipio de General Pueyrredón.

5) La **Región Patagónica** comprende las provincias de Río Negro, Neuquén, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego. En el norte de esta región (provincias de Río Negro y Neuquén), es donde se concentra la mayor actividad frutihortícola. El cultivo de tomate destinado a industria es una actividad de gran importancia económica en esta región.

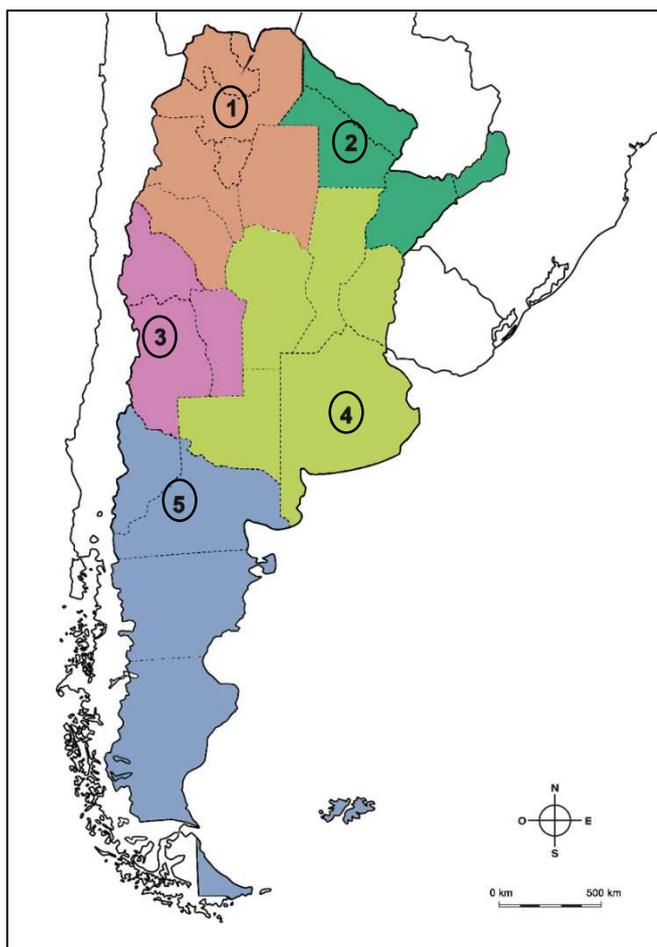


Figura 2.4. Mapa de la República Argentina, indicando regiones productoras de tomate: 1) NOA; 2) NEA; 3) Cuyo; 4) Pampeana; 5) Patagónica (construido en base a: Ferraris 2015)

2.2 La plaga: *Tuta absoluta*

2.2.1 Ubicación taxonómica

Tuta absoluta es un microlepidóptero, perteneciente a la familia Gelechiidae, la cual incluye varias especies plaga de solanáceas neotropicales (Biondi et al. 2018). Fue descrita originalmente por Meyrick en 1917 bajo el nombre de *Phthorimaea absoluta* a partir de muestras recolectadas en Huancayo (Perú). Posteriormente, su posición sistemática fue revisada, y se la designó bajo diferentes nombres genéricos, a saber, *Gnorimoschema absoluta* (1962), *Scrobipalpula absoluta* (1964), y *Scrobipalpuloides absoluta* (1987). Finalmente, en el año 1994 Povolny la redescubrió bajo el nombre de *Tuta absoluta* (Povolny 1994; Barrientos et al. 1998).

Comúnmente se la conoce como la polilla del tomate, polilla perforadora, cogollero del tomate, gusano minador del tomate, minador de hojas o tallos de la papa en español, o como tomato leafminer, South American tomato pinworm, tomato borer o South American tomato moth en inglés y traça-do-tomateiro en portugués (Ficha Técnica No. 28 Palomilla del tomate SENASICA).

2.2.2 Origen y distribución geográfica

Es una especie nativa de Sudamérica, neotropical, que ha sido registrada en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (Colomo et al. 2002; Tonnang et al. 2015). Se encuentra predominantemente en áreas por debajo de los 1.000 m sobre el nivel del mar, infestando principalmente cultivos de tomate. En la Argentina se la registró por primera vez en 1964, ingresando desde Chile a Mendoza a través de una partida de tomates (Bahamondes y Mallea 1969; Colomo et al. 2002).

Actualmente, representa una amenaza a nivel mundial para el cultivo de tomate. Fuera de su área nativa se la registró por primera vez en España en el año 2006, desde donde se cree que se dispersó a otros países de Europa, Asia y África, como Italia, Francia (2008), Albania (2009), Bulgaria (2009), Portugal (2009), Países Bajos (2009), Reino Unido (2009), Egipto (2009), Libia (2009), Israel (2010), Irán (2010), Turquía (2010), Islas Canarias (2012), Etiopía, Nigeria, Senegal, Sudán, entre otros (Desneux et al. 2010, 2011; Tonnang et al. 2015; Bondi et al. 2018), y en Norteamérica se la considera como plaga cuarentenaria (USDA 2011) (Fig. 2.5).

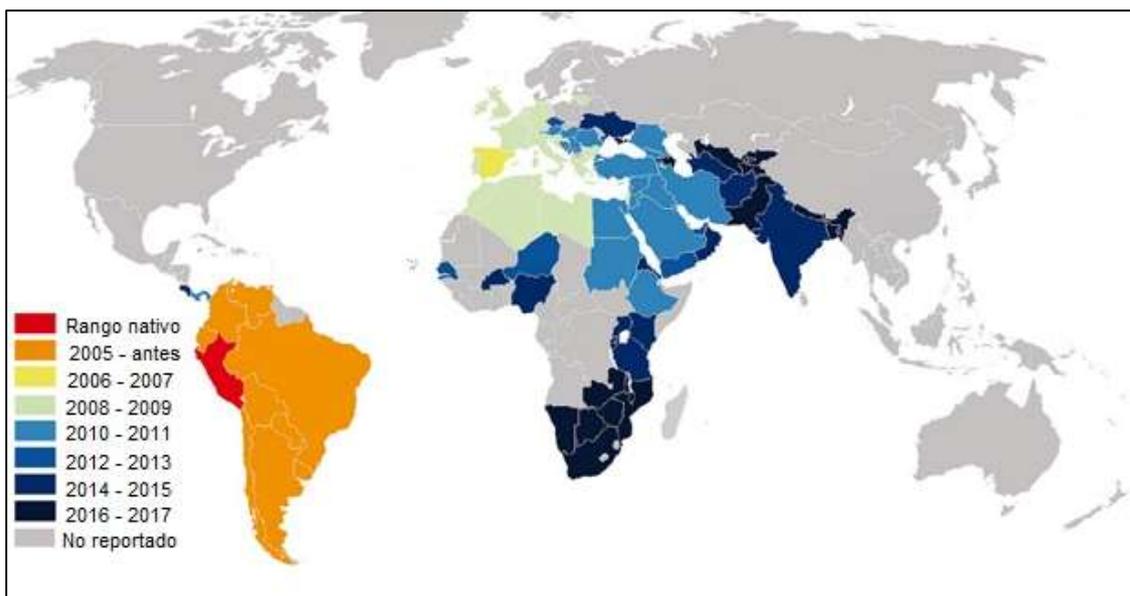


Figura 2.5. Distribución geográfica de *Tuta absoluta* (Biondi et al. 2018)

2.2.3 Principales características biológicas y ecológicas

Tuta absoluta es una especie oligófaga; se alimenta y desarrolla mayormente de solanáceas. Su planta hospedera principal es el tomate, *Solanum lycopersicum* L., pero ataca otras solanáceas cultivadas o silvestres, tales como *Solanum tuberosum* L. (papa), *S. melongena* L. (berenjena), *Nicotiana tabacum* L. (tabaco), *Capsicum annuum* L. (pimiento), *Datura ferox* L. (chamico), *Salpichroa organifolia* (Lam.) Baill. (huevo de gallo), *S. sisymbriifolium* Lam. (tutiá), *S. nigrum* L. (tomatillo), *N. glauca* L. (palán-palán), y *N. longiflora* Cav. (flor del sapo o tabaquillo), así como también plantas cultivadas o silvestres de otras familias: Fabaceae, como *Phaseolus vulgaris* L. (poroto), Amaranthaceae, Convolvulaceae, Fabaceae, y Malvaceae (Ruisánchez Ortega 2013; Salas Gervasio et al. 2016; Bawin et al. 2015; Tonnang et al. 2015).

Es una especie multivoltina, con generaciones continuas durante todo el año, pudiendo llegar a 9-10 generaciones anuales en cultivos al aire libre y a 12 bajo invernadero. Su ciclo de vida dura entre 23 y 40 días, dependiendo de las condiciones ambientales. Las hembras depositan los huevos de forma dispersa en las plantas, independientemente del estado de desarrollo de la misma. Preferentemente lo hacen sobre el haz de las hojas (73 %), y en menor grado sobre tallos nuevos (21 %) y brácteas de los frutos (6 %). Una hembra adulta

puede llegar a depositar 250 huevos a lo largo de toda su vida (Vargas 1970; Pereyra 2002; Ruisánchez Ortega 2013).

Los **huevos** (Fig. 2.6-b) son de forma ligeramente oval o elíptica, miden en promedio 0,38 mm de largo y 0,21 mm de diámetro; inicialmente son de color blanco-cremoso y en el transcurso de su desarrollo se van tornando amarillo pálido.

Luego de 4 a 7 días de la puesta (dependiendo de la temperatura ambiente) el huevo eclosiona, dando lugar al **estado larval** (Fig. 2.6-c), que dura entre 10 a 15 días. La larva es de tipo eruciforme y oligópoda, y posee cuatro estadios larvales (L1 a L4). La L1, de aproximadamente 1,6 mm y color blanco con cabeza de color oscuro, busca un punto de entrada a las hojas y penetra activamente en las mismas entre las dos epidermis. Al completarse el desarrollo larval, el último estadio (L4), que puede alcanzar una longitud de 7,7 mm, emerge de la mina y pasa por una fase de prepupa, en la cual no se alimenta, y generalmente se deja caer al suelo por medio de un hilo de seda para iniciar el proceso de pupación.

La **pupa** (Fig. 2.6-d) es obtecta, mide en promedio 4,3 mm de largo y 1,1 mm de diámetro, y presenta dimorfismo sexual basado en la ubicación de los poros genitales. La duración de este estado varía entre 8 y 10 días.

Los **adultos** (Fig. 2.6-a) miden 6-7 mm de longitud y 10-11 mm de envergadura, siendo las hembras levemente más grandes. Tienen un aspecto general de color gris-oscuro. La vida media es de 10 a 15 días en las hembras y de 6 a 7 días en los machos. Los adultos suelen permanecer escondidos entre las hojas durante el día, siendo de hábitos nocturnos. La cópula se inicia inmediatamente al inicio de la vida adulta, y a los tres días la hembra comienza a poner los huevos (Vargas 1970; Rojas 1981; Pereyra 2002; Urbaneja et al. 2007; Ruisánchez Ortega 2013).



Figura 2.6. Estados de desarrollo de la polilla del tomate *Tuta absoluta*: a) adulto; b) huevos; c) larva (L3); d) pupa

2.2.4 Daños a la planta

El daño es generado por la larva de hábito minador, que se alimenta principalmente del mesófilo de las hojas, formando pequeñas galerías, que se hacen cada vez más grandes, y adquieren forma de laguna (Fig. 2.7). Las larvas no permanecen siempre en la misma galería, repetidamente salen de ellas y penetran en otro punto del folíolo o caminan hacia otro para continuar alimentándose. Como consecuencia, la planta altera su desarrollo y sufre un envejecimiento prematuro, y se vuelve más propensa al ataque de agentes patógenos (hongos y bacterias) por la presencia de las galerías. También, pueden ocasionar daños a frutos, resultando en pérdidas significativas de rendimiento y daños cosméticos que restan valor comercial al producto. Así, este microlepidóptero puede provocar pérdidas de hasta un 90% en el cultivo si no se adoptan medidas de control (Pereyra 2002; Desneux et al. 2011).

El umbral de daño económico (UE) reportado para *T. absoluta* en cultivos de tomate varía ampliamente según distintos autores. Polack (2011), en

Argentina, mediante la aplicación de un modelo fenológico, lo considera equivalente a 2 folíolos con daño fresco por planta del cultivo. En cultivos de tomate de Colombia, Cely et al. (2010) y Wanumen Riaño (2012) lo consideran de 26 y 7 larvas de la polilla por planta de tomate, respectivamente. En Etiopía Shiberu y Getu (2018a) informaron que el UE de *T. absoluta* es de 3,82 larvas / planta durante las estaciones secas, y 3 larvas / planta en condiciones de invernadero (Shiberu y Getu 2018b). En Irán, Ghaderi et al. (2019) reportaron valores de UE que variaron entre 4,15 y 5,44 larvas por planta en diferentes cultivares de tomate.



Figura 2.7. Daños en folíolos de planta de tomate producidos por larvas de *Tuta absoluta*

2.2.5 Métodos de control

El control de *T. absoluta* en la mayoría de los países afectados depende casi exclusivamente del uso de agroquímicos, los cuales además de los diversos efectos adversos que generan, como bioacumulación a través de las cadenas alimentarias, contaminación ambiental, pérdida de biodiversidad y riesgos para la salud humana, presentan baja eficiencia de control de esta plaga debido a la rápida generación de poblaciones resistentes (Siqueira et al. 2000; Lietti et al. 2005). Esto ha motivado la investigación sobre medidas de control alternativas como el control biológico (Consoli et al. 1998; Botto et al. 2000; Bale et al. 2008; Desneux et al. 2011; Luna et al. 2015). En algunos países de América del Sur y Europa se han desarrollado programas de control biológico contra *T. absoluta*

que combinan el uso de agentes de biocontrol como parasitoides, microbianos (por ejemplo, Bt), y/o míridos depredadores, que están disponibles comercialmente (Cagnotti et al. 2016a, b; Biondi et al. 2018; Salas Gervassio et al. 2019b).

Simultáneamente, en la Argentina y Brasil se está avanzando en otros métodos de control, tales como técnicas de confusión sexual, particularmente las trampas de feromonas y la técnica del macho estéril, uso de genotipos de tomate resistentes a plagas, utilización de trampas de luz, y control biológico mediante especies patógenas y entomófagas (Consoli et al. 1998; Broglia 2011; Lobos 2011; Cagnotti et al. 2012; Bueno et al. 2013; Luna et al. 2015; Silva et al. 2016; van Lenteren et al. 2016; Castresana y Puhl 2017; Soares et al. 2019).

2.2.6 Enemigos naturales de *T. absoluta*

La literatura señala una gran diversidad de insectos entomófagos que atacan a la polilla del tomate en la Argentina (Desneux et al. 2010; Luna et al. 2015; Salas et al. 2019b). Por un lado, se reportaron dos especies depredadoras, la chinche *Tupiocoris cucurbitaceus* (Spinola) (Hemiptera: Miridae), que ataca principalmente huevos y larvas pequeñas, y *Zelus obscuridorsis* (Stal) (Hemiptera: Reduviidae), que depreda larvas y adultos de la polilla (López et al. 2011, 2012; Speranza et al. 2014). Por otro lado, se conoce un gran número de parasitoides (Colomo et al. 2002; Berta y Pérez 2011; Cáceres 2011; Luft et al. 2015; Salas Gervassio et al. 2019b), los cuales se pueden agrupar en los siguientes gremios: **1) endoparásitoide de huevos:** *Encarsia porteri* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae), seis especies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), y *Trichogrammatoidea bactrae* Nagaraja (Hymenoptera: Trichogrammatidae); **2) endoparásitoide de huevo-prepupa:** *Copidosoma koehleri* Blanchard (Hymenoptera: Encyrtidae); **3) endoparásitoide de larvas tempranas:** tres especies de *Bracon* (Hymenoptera: Braconidae); **4) ectoparásitoide larval:** *Dineulophus phthorimaeae* De Santis (Hymenoptera: Eulophidae) y *Goniozus nigrifemur* Ashmead (Hymenoptera: Bethyilidae); **5) endoparásitoide de larva-prepupa:** *Neochrysocharis formosus* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae) y *Pseudapanteles* (= *Apanteles*) *dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae); **6) endoparásitoide larva-pupa:**

Campoplex haywardi Blanchard (Hymenoptera: Ichneumonidae); y **7) endoparasitoide de pupas: *Conura bruchi*** (Blanchard) (Hymenoptera: Chalcididae).

2.3 El parasitoide: *Pseudapanteles dignus*

2.3.1 Ubicación taxonómica

Pseudapanteles dignus es un microhimenóptero perteneciente a la familia Braconidae, subfamilia Microgastrinae. Fue descrito originalmente por Muesebeck en el año 1938 como *Apanteles dignus*, en base a unos pocos ejemplares hembra colectados en California, Estados Unidos de América. Posteriormente, en el año 1981 Mason lo transfirió al género *Pseudapanteles*.

2.3.2 Origen y distribución geográfica

Pseudapanteles dignus es una especie de origen americano y distribución Neártica- Neotropical. Actualmente se sabe que está presente en la Argentina, Bermuda, Cuba, México, Puerto Rico, Estados Unidos de América, Islas Vírgenes, y ha sido introducido en Hawái (Fig. 2.8) (Fernández-Triana et al. 2014).

En la Argentina, *P. dignus* ha sido citado para las provincias de Tucumán (Colomo et al. 2002; Savino, 2014), Jujuy (Puch 2011) y Buenos Aires (Botto et al. 1999; Sánchez et al. 2009; Nieves 2013), y se tienen registros de que se ha liberado en la provincia de Corrientes (Cáceres 2011).



Figura 2.8. Distribución geográfica de *Pseudapanteles dignus* (Fuente: Fernández Triana et al. 2014)

2.3.3 Biología y Ecología

Pseudapanteles dignus ha sido incorporada por su morfología al grupo de especies llamado *annulicornis* (que comprende la mayoría de las especies de *Pseudapanteles* conocidas, con propódeo liso y carena mediana muy marcada), y se separa de otras especies en base a: a) la combinación de colores del mesosoma y la coxa, b) el primer tergito que es completamente negruzco, c) las 0,6 partes anteriores del mediotergito 1 y la mayoría de los laterotergitos que son de color naranja-amarillo, d) al pterostigma, que es transparente con márgenes delgados de color marrón, y e) a la forma del mediotergito 1 (Fernández-Triana et al. 2014).

La hembra adulta mide aproximadamente unos 2,5 mm desde el extremo de la cabeza hasta el extremo del gáster. Caracterizándola brevemente, la

cabeza es delgada en sentido anteroposterior y las antenas al menos tan largas como el cuerpo, y todos los segmentos flagelares alargados. El tórax es ligeramente más ancho que alto, y el gáster es tan largo como el tórax. La coloración es negra, con zonas de coloración amarillo pálido o rojizo, como el área de la boca, clípeo y antena; la tégula, 0,6 partes anteriores del mediotergito 1 y la mayoría de los laterotergitos presentan una coloración naranja-amarillo; y las patas, incluidas todas las coxas, son de color amarillo miel (Fig. 2.9) (Muesebeck 1938; Fernández-Triana et al. 2014).

El macho se diferencia de la hembra por presentar menor tamaño, tener las coxas posteriores negras, y el gáster más oscuro, siendo el primer tergito completamente negruzco (Cardona y Oatman 1971; Fernández-Triana et al. 2014).

Pseudapanteles dignus es un endoparasitoide larval, de acuerdo a la clasificación de gremios de Mills (1994). A su vez, es un parasitoide koinobionte, solitario y con un estrecho rango de hospedadores. Según la literatura, si bien está reportado como el principal enemigo natural de *T. absoluta*, parasita al menos a otras cuatro especies de geléquidos: la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller), el minador gigante del tomate o gusano alfiler *Keiferia lycopersicella* (Walsingham), la polilla de la semilla del pimiento *Symmetrischema capsicum* (Povolny) y *Tildenia gudmannella* (Povolny) (Cardona y Oatman 1971; Oatman y Platner 1989; Bennett 1995; Fernández-Triana et al. 2014).



Figura 2.9. Hembra de *Pseudapanteles dignus* parasitoidizando larva de *Tuta absoluta* (Fotografía: Lic. Franco D'Auro y Sr. Jorge Bernache)

Se trata de una especie solitaria, aunque cuando ovipone, la hembra deposita entre uno a varios huevos en el hemocele de la larva hospedera (Luna et al. 2016; D'Auro et al. 2018). Inmediatamente después de la oviposición, el **huevo** (Fig. 2.10-a) tiene aspecto elongado, traslúcido, y en promedio mide 0,350 mm de largo por 0,063 mm de ancho. *Pseudapanteles dignus* presenta tres **estadios larvales** (Fig. 2.10-b, c y d). Al primero se lo llama “larva mandibulada”, y al segundo y tercero “larva himenopteriforme” I y II, respectivamente. Es en el estadio de larva mandibulada, cuando las posturas numerosas son encapsuladas por el hospedador, y sólo una de ellas logra sobrevivir a este mecanismo inmunológico de defensa (Luna et al. 2016). Luego de unos 13-14 días, la larva del parasitoide alcanza la madurez y abandona al hospedador utilizando sus mandíbulas para abrirse camino a lo largo de la línea lateral del huésped. Luego de la emergencia, forma un **cocón** o **capullo** cilíndrico y redondeado en ambos extremos (Fig. 2.10-e), de color blanco-plateado, densamente tejido, que en promedio puede llegar a medir 3,47 mm de largo por 1,2 de ancho. En su interior ocurre el breve estado de prepupa y el estado de pupa, la cual es de tipo exarada o libre (Cardona y Oatman 1971; Nieves et al. 2015).

Según Cardona y Oatman (1971) el ciclo de vida del parasitoide desde huevo a la emergencia del adulto, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y $50 \pm 2\%$ de humedad relativa, dura un promedio de 18 días cuando parasita a *K. lycopersicella*; aproximadamente 1 día el desarrollo del huevo; entre 6-7 el estado de larva; 1 día la prepupa, y entre 8-10 días la pupa. Nieves et al. (2015) determinaron, utilizando como hospedero a larvas de *T. absoluta*, que el periodo de huevo a la emergencia del adulto (a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y $65 \pm 5\%$) varía en función del estadio larval del hospedador que *P. dignus* parasite. Si parasita al hospedador en estadios más jóvenes (L1-L2) la duración es de aproximadamente 22,47 días (1 día como huevo, 12,61 días como larva y 9,14 días como pupa). En cambio, si parasita larvas de *T. absoluta* de estadios L3-L4 la duración del periodo se acorta unos 2,5 días, alcanzando el estado de adulto a los 19,08 días (1,03 días como huevo; 9,49 días como larva y 8,55 días como pupa). La longevidad del **adulto** (Fig. 2.10-f) es de $26,33 \pm 1,47$ días para las hembras y de $23,65 \pm 1,52$ días para los machos (Nieves et al. 2015).

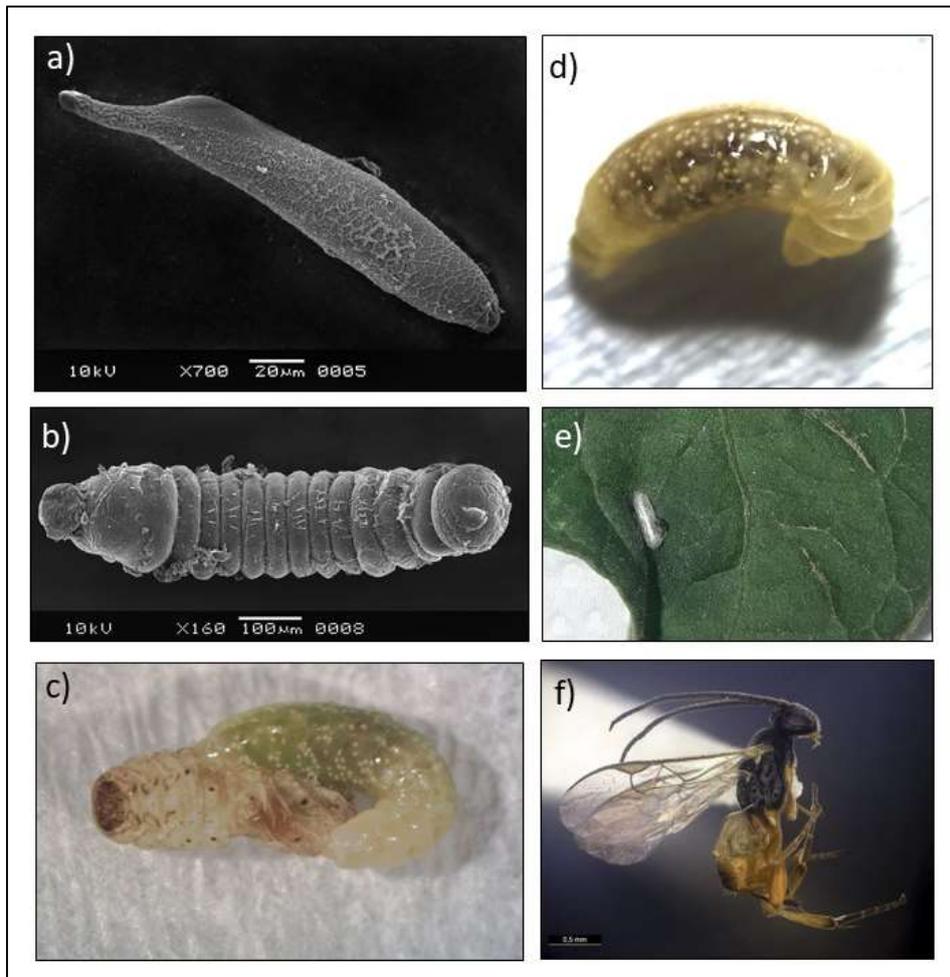


Figura 2.10. Estados de desarrollo del parasitoide *Pseudapanteles dignus* sobre *Tuta absoluta*: a) huevo; b) larva mandibulada; c) larva himenopteriforme II de *P. dignus* saliendo de la larva de *T. absoluta*; d) larva/prepupa de *P. dignus*; e) cocón del parasitoide; f) hembra adulta (a y b tomadas de Luna et al. 2016)

La hembra no posee período de preoviposición, y es capaz de comenzar a oviponer desde el primer día de emergencia, y sigue madurando huevos durante 20 días. Este comportamiento se denomina pro-ovigenia moderada, y es considerado un buen atributo para un agente de biocontrol (Jervis et al. 2008). *P. dignus* tiene la capacidad de parasitar todos los estadios larvales del hospedador (si bien prefiere los estadios L2 y L3) y de ajustar su tiempo de desarrollo al del huésped. Generalmente, la hembra ovipone el 50% de sus huevos antes de completar la primera semana de vida como adulto (Nieves et al. 2015). La fecundidad promedio es de 192 huevos/hembra, siendo el número de huevos puestos/♀/día igual a 13, de los cuales, unos 8,49 darán descendencia femenina, otro rasgo importante como agente de control biológico.

Bajo condiciones óptimas de laboratorio, se ha observado que su población puede crecer a una tasa de 0,14 por día (r : tasa intrínseca de incremento natural) y cada hembra se multiplica por 51 hembras (R_0 : tasa de reemplazo) en 29 días (T : tiempo generacional) (Nieves et al. 2015).

Pseudapanteles dignus es una especie arrenotoca, ya que las hembras producen hijos machos partenogenéticamente e hijas hembras por reproducción sexual. Se ha observado que la proporción de sexos de las hembras copuladas tienen un sesgo hacia las hembras cuando el desarrollo ocurre en hospedadores L1-L2; cuando se trata de hospedadores L3-L4 el sesgo es hacia los machos (Luna et al. 2007; Nieves 2013; Nieves et al. 2015).

Según Luna et al. (2007), la respuesta funcional de *P. dignus* dentro del rango de 3, 5, 7, 10, 15, 20, y 30 larvas ofrecidas, es de tipo I, con una mortalidad per cápita de hospedadores independiente de la densidad y una tasa instantánea de ataque (a') de $0,22 \pm 0,03$, y el número máximo de larvas de *T. absoluta* que pudo parasitar en un período de 24 h fue 14, con una densidad de 20 larvas de la plaga. Sánchez et al. (2009) reportaron una mortalidad denso-independiente en condiciones de campo, coincidente con una respuesta funcional de tipo I, y Salas Gervassio et al. (2018) lo hicieron para berenjena, en condiciones de laboratorio, obteniendo una tasa de ataque de 0,24.

Por otra parte, Sánchez et al. (2009) y Nieves et al. (2015) analizaron en predios de tomate del Cinturón Hortícola Platense (Buenos Aires, Argentina) el patrón de parasitismo a distintas escalas espaciales (planta, hoja y folíolo) dentro del cultivo, y la magnitud del parasitismo a campo (porcentaje de parasitismo), respectivamente. El parasitoide exhibió una respuesta de agregación en los manchones con mayor densidad de su hospedador a escala foliar y foliolar. Esta es una característica que varios autores consideran positiva, ya que contribuye a la estabilidad y persistencia de la interacción con el hospedador (Hassell 1982; Chesson y Murdoch 1986; Walde y Murdoch 1988; Hassell 2000). En cuanto a los porcentajes de parasitismo evaluados en cultivo bajo invernadero, estos variaron entre 26 y 64% en campos con manejo mediante control cultural y biológico, y entre 17 y 27% en campos con manejo sanitario convencional (con uso de plaguicidas de síntesis).

2.3.4 Potencialidad como agente de control biológico

Varios de los atributos biológicos y ecológicos de *P. dignus* anteriormente mencionados, son considerados características positivas para el uso de un organismo como agente de control biológico (van Lenteren 2012). Entre ellas podemos mencionar:

- su presencia espontánea en cultivos de tomate con y sin uso de agroquímicos, bajo invernáculo y a cielo abierto;
- un estrecho rango de hospedadores;
- coincidencia espacio-temporal con *T. absoluta*;
- sincronización del tiempo de desarrollo de su larva con la de su hospedador;
- una mayor tasa de ataque (a') que la tasa intrínseca de crecimiento (r) de *T. absoluta*;
- ausencia de un período de pre-oviposición de la hembra;
- elevados valores de parasitismo a campo.

Además, es una especie relativamente fácil de criar bajo condiciones controladas de laboratorio.

2.4 Regiones hortícolas consideradas en este estudio

De las principales regiones productoras de hortalizas mencionadas anteriormente, se seleccionaron para este estudio tres de ellas en base a los antecedentes y reportes de la presencia de *T. absoluta*, y por la disponibilidad de infraestructura y recursos humanos que colaboraron en la investigación. A continuación, se describen las principales características biogeográficas, climáticas (tabla 2.1), de relieve, etc. de cada zona de la región elegida, y se señala la importancia de la producción de tomate en el contexto del mercado de agroalimentos.

Tabla 2.1. Principales características climáticas de las regiones seleccionadas para este estudio

Región	Temperatura media anual máxima (°C)	Temperatura media anual (°C)	Precipitación media anual (mm)	HR anual (%)
NOA (Salta)	28,4	22,3	945	78
Pampeana (Buenos Aires)	21,7	16,8	1040	77
Patagonia (Río Negro)	22,04	14	184	55

Fuente: Climate-Data.org: Datos climáticos mundiales (<https://es.climate-data.org/>)

2.4.1 Noroeste argentino (Región Neotropical según Morrone 2016)

Esta región comprende a las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y La Rioja (Fig. 2.1).

El clima es subtropical con estación seca, presentando variaciones en sus distintas regiones, como consecuencia de su relieve variado. La temperatura media anual es de 22,3°C, con veranos calurosos y húmedos, cuyas temperaturas pueden llegar a los 45°C y la humedad relativa (HR) a 78%. Los inviernos son templados (8,3 a 24°C) con una frecuencia de heladas muy bajas y de corta duración, y temperaturas que no llegan a bajar de los -3°C. Las precipitaciones se concentran en verano durante los meses de noviembre a mayo, y oscilan entre 800 a 1.300 mm anuales. Los suelos son de aptitud agrícola de secano y presentan buen contenido de materia orgánica y están sujetos a una fuerte erosión hídrica a causa de las elevadas pendientes y fuertes precipitaciones. Son suelos fértiles, que varían de franco limosos a franco arcillosos y de pH entre 6.5 a 8.

La producción de hortalizas es la tercera actividad agrícola en importancia económica de la región, con producciones en los departamentos de Orán y San Martín. Se destacan las producciones intensivas bajo invernaderos. El cultivo de tomate es el de mayor importancia económica dentro de las hortalizas, representando el principal cultivo en volumen de producción y superficie

sembrada en Orán (45% de la superficie sembrada). El destino de la producción es mayormente los principales centros urbanos (Capital Federal, Rosario, Córdoba, Mendoza), en particular el Mercado Central de Buenos Aires, y especialmente en invierno, desde mayo a septiembre (Arroyo 2004; Argerich y Troilo 2010). Los trasplantes se realizan entre los meses de mayo y agosto, y la cosecha empieza en octubre/noviembre y puede durar hasta diciembre/enero. La temperatura máxima media anual en esos meses promedia los 30°C (INTA - Plan Tecnológico Regional 2009-2011; Arroyo 2004; WeatherSpark).

En este estudio se seleccionaron cultivos de tomate de la provincia de Salta, que tiene más de 13.000 hectáreas dedicadas a la actividad agrícola. Más de la mitad de esta superficie se localiza en el departamento de Orán (ubicado en el extremo norte de la provincia), y abarca más de 6.000 hectáreas (a campo y bajo cubierta) (Fig. 2.11).

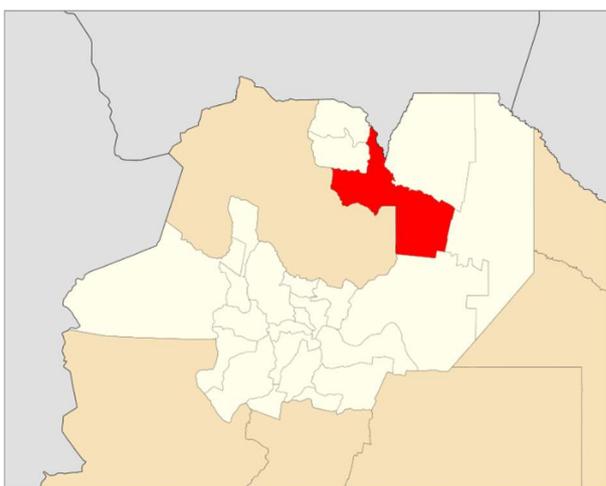


Figura 2.11. Departamento de Orán, provincia de Salta

2.4.2 Región Pampeana (Región Neotropical según Morrone 2016)

Esta región incluye a Buenos Aires y parte de La Pampa, Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba. El clima suele ser templado húmedo, con veranos cálidos e inviernos frescos. La temperatura media anual suele estar por debajo de los 20°C, y las precipitaciones varían entre 800 y 1.000 mm anuales,

concentrándose en la época estival. Los suelos son fértiles, humíferos, de textura franco-arcillosa o franco-limosa.

La provincia de Buenos Aires es un ejemplo del desarrollo de los cinturones verdes alrededor de ciudades densamente pobladas como la ciudad de Buenos Aires, La Plata y Mar del Plata. Eso permitió el incremento en la superficie destinada a la producción de tomate en la provincia.

El Cinturón Hortícola del Gran Buenos Aires presenta una gran importancia económica y social y comprende varios partidos de la provincia de Buenos Aires: Escobar, La Plata, Florencio Varela, Berazategui, Almirante Brown, Esteban Echeverría, La Matanza, Merlo, Cañuelas, General Rodríguez, Luján, Marcos Paz, y Moreno, que abarcan una superficie de 5.510 km². En esa zona la actividad hortícola es de aproximadamente 16.000 hectáreas. Esta gran superficie tiene su epicentro en la zona sur, que comprende los partidos de La Plata (Fig. 2.12), Florencio Varela y Berazategui. En la actualidad se estima una superficie de cultivos bajo cubierta de 1000 ha. La mayor concentración de invernaderos se ubica en el partido de La Plata y alrededores, con un 70 % de la superficie total citada (Lozano 2012).

El Cinturón Hortícola de La Plata concentra la mayor superficie y producción de tomate de esta región. Esto puede estar vinculado a la mayor dedicación de superficie bajo cubierta para tomate en esta ciudad, capital de la provincia de Buenos Aires. Los trasplantes se realizan aproximadamente en el mes de septiembre, y la cosecha se realiza entre diciembre y febrero/marzo, aunque puede extenderse para el tomate tardío. La temperatura máxima media anual en esos meses promedia los 25° C.

El destino de la producción de tomate de esta zona es principalmente para consumo en fresco, ya sea en el mercado central como en puestos propios o en mercados locales, venta en ferias, etc. (Argerich y Troilo 2010; Vitieri et al. 2013).

En este trabajo se seleccionaron campos ubicados en el Cinturón Hortícola Platense.

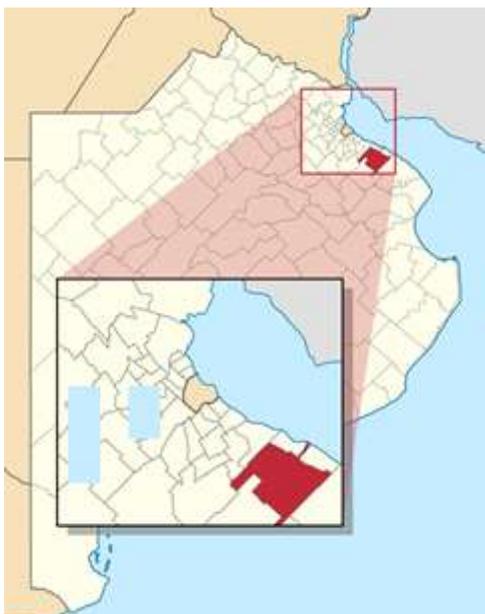


Figura 2.12. Partido de La Plata, provincia de Buenos Aires

2.4.3 Región Patagónica (Región Andina según Morrone 2016)

En esta región la actividad hortícola suele concentrarse en las provincias de Río Negro y Neuquén, en todo el Valle del río Negro, que se extiende desde la confluencia de los ríos Limay, Neuquén y Negro en su nacimiento, y recorre de noroeste a sudeste, hasta su desembocadura al mar, constituyendo un amplio valle transversal, perpendicular a la cordillera. El río Negro atraviesa las mesetas denominadas “bardas”, dando geológicamente un origen fluvial al Valle del río Negro, que de acuerdo a su ubicación se divide en Alto Valle, al norte (a la orilla del río Negro y de los ríos Limay y Neuquén; integrado por localidades del departamento de General Roca como General Roca, Cipolletti, Villa Regina, Allen, entre otras); Valle Medio (se extiende desde la localidad de Chelforó, al oeste, hasta el paraje Fortín Castre, al este); y Valle Inferior, cercano a la desembocadura.

El clima es continental templado y árido, con veranos calurosos e inviernos fríos con heladas. La temperatura media anual es inferior a los 18°C y la precipitación media anual varía entre 200-250 mm, con tendencia a concentrarse en otoño y primavera.

El Valle del río Negro se caracteriza por su agricultura intensiva bajo riego, principalmente de frutales y secundariamente de hortalizas, sobre las distintas

áreas de regadío ubicadas sobre las márgenes de los ríos Limay, Neuquén, Colorado y Negro. Anualmente se cultivan unas 7.700 hectáreas concentradas en los principales valles de la provincia, con una producción que oscila las 190.000 toneladas de hortalizas. El Valle Medio es la principal zona productora de la provincia (48% de la superficie), le sigue el Valle Inferior-General Conesa (38%), y luego la zona de Río Colorado y el Alto Valle.

La región del Valle Medio está integrada por las localidades del departamento de Avellaneda: Chimpay, Coronel Belisle, Darwin, Choele Choel, Luis Beltrán, Lamarque y Pomona (Fig. 2.13). Esta región constituye una unidad de 380.000 hectáreas aproximadamente, en la cual en los últimos años se ha desarrollado una intensa actividad agrícola bajo riego. El trabajo de campo se ha concentrado en las localidades de Choele Choel, Lamarque (conocida como la “Capital Nacional del Tomate”) y Luis Beltrán. El Valle Medio es un área caracterizada por un alto grado de diversificación, cultivándose aproximadamente 6.000 hectáreas de frutales de pepita, 1.000 hectáreas de frutas de carozo, 350 hectáreas de frutos secos, 300 hectáreas de vid, 4.000 hectáreas de hortalizas y 7.000 hectáreas de forrajeras. Hortalizas como apio, zanahoria y cebolla son generalmente para el consumo local, y los cultivos de tomate y pimiento son destinados para industria, representando la actividad hortícola de mayor importancia económica en esta región. El tomate, relacionado con la industria procesadora, es uno de los principales cultivos en cuanto a superficie y volumen de producción. En menor proporción, su producción tanto bajo invernadero como a campo es para consumo fresco, destinada a abastecer la demanda patagónica. Los trasplantes se realizan entre los meses de septiembre y octubre, y la cosecha se realiza entre diciembre y febrero/marzo. La temperatura máxima media anual en esos meses promedia los 28°C (Iglesias 2005; Argerich y Troilo 2010; Trpin et al. 2015; Nievas y de Palacio 2012; WeatherSpark).

En este estudio se seleccionaron campos del Valle Medio y Alto Valle.

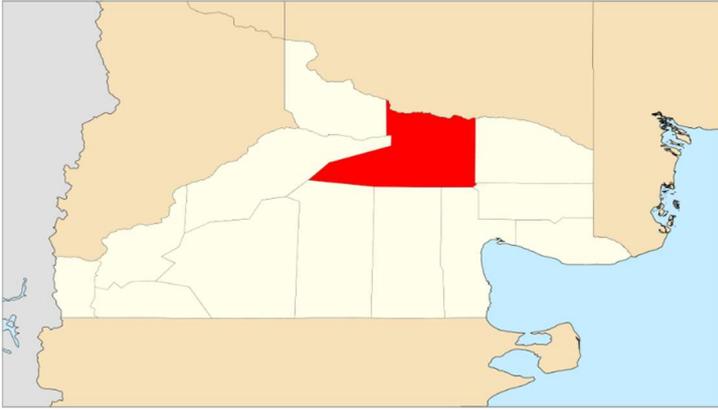


Figura 2.13. Departamento de Avellaneda, provincia de Río Negro

A continuación, se describen las investigaciones realizadas para caracterizar las poblaciones locales de *P. dignus* en las tres regiones seleccionadas, con el fin de identificar la presencia de la especie y estimar sus tasas de parasitismo a campo (Capítulo 3), determinar la compatibilidad reproductiva entre las mismas (Capítulo 4) y evaluar algunos atributos bioecológicos del parasitoide (Capítulo 5). Finalmente, se presentan las Consideraciones Finales del trabajo de Tesis.

Capítulo 3

Identificación de poblaciones locales de *Pseudapanteles dignus* y tasas de parasitismo a campo

3.1 Introducción

Pseudapanteles dignus es una especie americana, al igual que su hospedador *Tuta absoluta*. Como ya se mencionó anteriormente, a nivel mundial ha sido citado para la Argentina, Bermuda, Cuba, México, Puerto Rico, Estados Unidos de América, Islas Vírgenes, y ha sido introducido en Hawái (Fernández-Triana et al. 2014).

Particularmente en la Argentina, uno de sus hospedadores -la plaga *T. absoluta*- está citado en casi todas las regiones en donde se cultiva tomate. En la región de Cuyo, está presente en las provincias de Mendoza, donde se la registró por primera vez, y en San Juan; en el noroeste en las provincias de La Rioja, Jujuy, Salta y Tucumán; y en el noreste del país se encuentra en la provincia de Corrientes. También está presente en la región pampeana, en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe, y su distribución más austral ha sido reportada para la región patagónica en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Bahamondes y Mallea 1969; Cáceres 1992; Colomo y Berta 1995; Giganti et al. 1997; Gilardón et al. 1998; Becerra et al. 1999; Botto et al. 1999; Colomo et al. 2002; Marín et al. 2002; Lietti et al. 2005; Pereyra y Sánchez 2006; Sánchez et al. 2009; Puch 2011; Nieves 2013; Savino 2014).

A pesar de la amplia distribución geográfica reportada para *T. absoluta*, *P. dignus* ha sido registrado solamente para las provincias de Buenos Aires, Tucumán y Jujuy, mientras que se realizaron liberaciones de este parasitoide en cultivos de tomate bajo cubierta en Bella Vista, Corrientes, aunque se desconoce si se estableció (Sara Cáceres, INTA Bella Vista, Corrientes, comunicación personal).

Para implementar estrategias de control biológico por conservación o mediante liberaciones aumentativas, es importante conocer los enemigos naturales nativos del área de origen de la plaga, cerciorarse de su presencia y su relativa alta especificidad o rango de hospedadores estrecho, y la eficiencia de control a campo, es decir, conocer el efecto que tienen estos enemigos sobre la abundancia y la dinámica de la población plaga. Un mejor conocimiento sobre los atributos biológicos del agente de control y la comprensión del efecto del enemigo natural sobre la abundancia y dinámica de la población plaga es un

paso crítico hacia un control eficaz de la misma (Plouvier y Wajnberg 2018).

Hawkins y Cornell (1994) encontraron que la probabilidad de un control exitoso, esto es disminuir las densidades del hospedador por debajo de los niveles de daño económico, aumenta significativamente con la tasa máxima de parasitismo dentro del rango nativo del huésped. Además, plantearon que los parasitoides con tasas máximas de parasitismo menores a 32% no resultan exitosos, sugiriendo que existe un umbral por debajo del cual el parasitismo no resulta efectivo.

El impacto de un parasitoide sobre la población de un lepidóptero plaga puede ser medido de varias maneras. Cuando se trata de parasitoides de larvas, una forma relativamente precisa de medir el parasitismo a campo es mediante muestreos repetidos de larvas hospedadoras a lo largo del ciclo de desarrollo de la interacción parasitoide-hospedador, y la cría y/o posterior disección (en el caso que sean endoparasitoides) para verificar la presencia del parasitoide (Waage y Cherry 1990).

En el caso particular de *P. dignus*, ha sido reportado en cultivos del Cinturón Hortícola de La Plata, bajo cubierta y a cielo abierto como el principal enemigo natural de presencia espontánea de la polilla del tomate (Polack 2008; Sánchez et al. 2009; Luna et al. 2006; Nieves et al. 2015). Sus tasas de parasitismo, tanto en cultivos de manejo sanitario convencional como en cultivos sin aplicación de plaguicidas, variaron entre 17 y 27% (Sánchez et al. 2009), y 26 y 64% (Sánchez et al. 2009; Nieves et al. 2015), respectivamente (tal como se mencionó en el Capítulo 2).

Otro aspecto relevante en la implementación del control biológico cuando se pretende utilizar un enemigo natural con una amplia distribución geográfica es su estudio taxonómico. Las especies estrechamente relacionadas pueden mostrar pequeñas diferencias en sus rasgos morfológicos externos. Si esas diferencias se interpretan como una variación intraespecífica, puede conducir al agrupamiento de dos o más especies bajo una sola entidad taxonómica. La diversidad críptica es común entre los parasitoides himenópteros, por lo cual, la correcta identificación de la especie del enemigo natural es crucial para garantizar el éxito del programa de control y la seguridad ambiental para evitar efectos no deseados y potencialmente nocivos de los parasitoides introducidos en el agroecosistema (Dayrat 2005; Gebiola et al. 2015).

La taxonomía integrativa, introducida formalmente en el año 2005 (Dayrat 2005), es un enfoque integral para delimitar y describir los taxones integrando información de diferentes disciplinas científicas y metodologías (filogeografía, morfología comparativa, genética de poblaciones, ecología, comportamiento, datos moleculares, morfometría, etc.), sin descartar que un solo criterio de delineación pueda indicar correctamente la especie (Dayrat 2005; Schlick-Steiner et al. 2009; Chesters et al. 2012; Pante et al. 2014; Gebiola et al. 2015).

En este sentido, el análisis morfométrico de los organismos, definido como el análisis cuantitativo de la forma y tamaño, permite una identificación taxonómica más precisa, complementando la identificación realizada por los especialistas en base a la diagnosis del parasitoide. Además, aporta información relevante en cuanto a la variación intraespecífica de la especie. Las muestras de organismos pueden representar distintas localidades geográficas, etapas del desarrollo del organismo, efectos ambientales, etc. A menudo, sólo se miden partes (por ejemplo, extremidades) u órganos de un organismo. En el caso de los insectos, gracias a que poseen un exoesqueleto duro de quitina, que mantiene la forma del cuerpo durante la vida adulta y luego de su muerte, son particularmente apropiados para estudios de morfometría. Generalmente, se suelen tomar medidas de la cabeza, alas y patas (Rohlf y Marcus 1993; Ghajarieh et al. 2007).

Dentro de la morfometría se pueden reconocer dos tipos principales: la **morfometría clásica o tradicional**, y la **morfometría geométrica**. La primera implica la medición lineal directa de varios caracteres que luego se analizan utilizando métodos multivariados. Las medidas suelen ser el largo y ancho de algunas estructuras, y distancias entre ciertos puntos de referencia. A veces, se utilizan ángulos y proporciones (Rohlf y Marcus 1993; Mutanen y Pretorius 2007; Schwarzfeld y Sperling 2014). Yu et al. (1992) han demostrado que este método es efectivo como una alternativa al sistema convencional de identificación de las características de las alas para separar especies estrechamente relacionadas de Ichneumonidae en función de la venación general de las alas. La morfometría geométrica, por otra parte, estudia la forma geométrica de la estructura utilizando coordenadas cartesianas (en dos o tres dimensiones) de puntos de referencia que son capaces de capturar variables de forma morfológicamente distintas (Rohlf y Marcus 1993; Adam et al. 1999).

El tamaño de los animales es un atributo que puede llegar a condicionar muchas de sus características y desempeño, y por ello suele ser muy estudiado en ecología y evolución (Blackburn y Gaston 1994; García-Barros 1999). La variación del tamaño corporal de los organismos es compleja y puede afectarse por varios factores como la plasticidad fenotípica, la nutrición y la temperatura (Chown y Gaston 2010), y en el caso de los parasitoides también puede deberse al tamaño de su huésped. Esa variación intraespecífica del tamaño corporal se correlaciona positivamente con varios rasgos de la historia de vida de la especie, al estar relacionado con el estado físico y las tasas fisiológicas de los individuos. Así es que el tamaño de la hembra parasitoide puede estar relacionado con su potencial reproductivo y con la eficacia de búsqueda o tasa de ataque (Ellers et al. 1998, 2003; Lykouressis et al. 2009; Hirst et al. 2014; Horne et al. 2017).

En síntesis, los estudios morfométricos brindan información sólida para la clasificación taxonómica, para separar o delimitar especies por un lado, y también para analizar la variabilidad intraespecífica en especies con amplia distribución y con presencia de numerosos biotipos. Una incorrecta identificación de estas especies puede conducir a fallas en los programas de control biológico (Rohlf y Marcus 1993; Schwarzfeld y Sperling 2014).

Las hipótesis de este capítulo plantean que a) *Pseudapanteles dignus* tiene una distribución geográfica mayor en el cultivo de tomate a la conocida actualmente para la Argentina, por lo cual se lo encontrará parasitando larvas de *T. absoluta* en distintas regiones productoras de tomate del país, y con distintas tasa de parasitismo en cada una de ellas; y b) que los individuos de diferentes poblaciones locales del parasitoide, sujetos a distintas presiones selectivas, presentan cierto grado de variabilidad intraespecífica, lo cual se verificará en las diferencias encontradas en los caracteres morfológicos.

Los objetivos de este capítulo fueron examinar la presencia de *P. dignus* en tres regiones de la Argentina donde se cultiva tomate y ampliar su rango de distribución geográfica, estimar el porcentaje de parasitismo a campo, confirmar la identidad de la especie de los organismos hallados en cada región (Noroeste, Pampeana y Patagonia), y comparar ciertos caracteres morfológicos interpoblacionalmente.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Relevamiento de poblaciones locales de *P. dignus* y parasitismo a campo por región

Zonas y periodicidad de los muestreos

Para llevar a cabo los muestreos de campo se seleccionaron cuatro provincias correspondientes a tres regiones de la Argentina donde la producción de tomate es afectada por *T. absoluta*: 1) Buenos Aires (Pampeana), tomada en esta Tesis como población de referencia, ya que se cuenta con datos sobre la biología del parasitoide estimados con individuos de esta región, aportados por investigadores y becarios del grupo de Ecología de Plagas y Control Biológico del CEPAVE; 2) Salta (Noroeste Argentino); y 3) Río Negro y Neuquén (Patagonia) (Fig.3.1). Las localidades muestreadas que presentaron daño por *T. absoluta*, junto a sus coordenadas geográficas se detallan en las siguientes páginas.

Se realizó un relevamiento anual por región, dos años consecutivos para Salta, tres años consecutivos para Río Negro-Neuquén, y dos años consecutivos para Buenos Aires, respetando en la medida de lo posible que en todos los sitios el cultivo se encontrara en la misma etapa fenológica, cercano a la época de cosecha (fructificación, Capítulo 2), y coincidente con el momento en que profesionales de la zona (Ing. Agr. de distintos INTA del país) informaron que se registraban los picos de *T. absoluta*. En cada relevamiento se recorrieron entre 8 y 10 campos cultivados con tomate, ya sea a cielo abierto o en invernáculos, y bajo dos modalidades de protección vegetal: con uso y sin uso de agroquímicos. En la provincia de Buenos Aires los campos relevados fueron todos campos sin uso de agroquímicos. En todos los campos visitados se trató de recabar información sobre la implantación y manejo de los cultivos (variedad de semilla, tipo y frecuencia de la aplicación de los plaguicidas utilizados), pero no siempre fue posible obtenerla. No todos los años se pudieron muestrear los mismos campos, debido a que, al ser campos privados, el productor cambiaba el esquema productivo, o no se los pudo contactar al momento del muestreo. A

continuación, se describen los trabajos realizados durante los muestreos y las principales características de los cultivos revisados. Para simplificar la lectura, se denominarán las regiones como SA (Salta), BA (Buenos Aires) y RN (Río Negro y Neuquén).

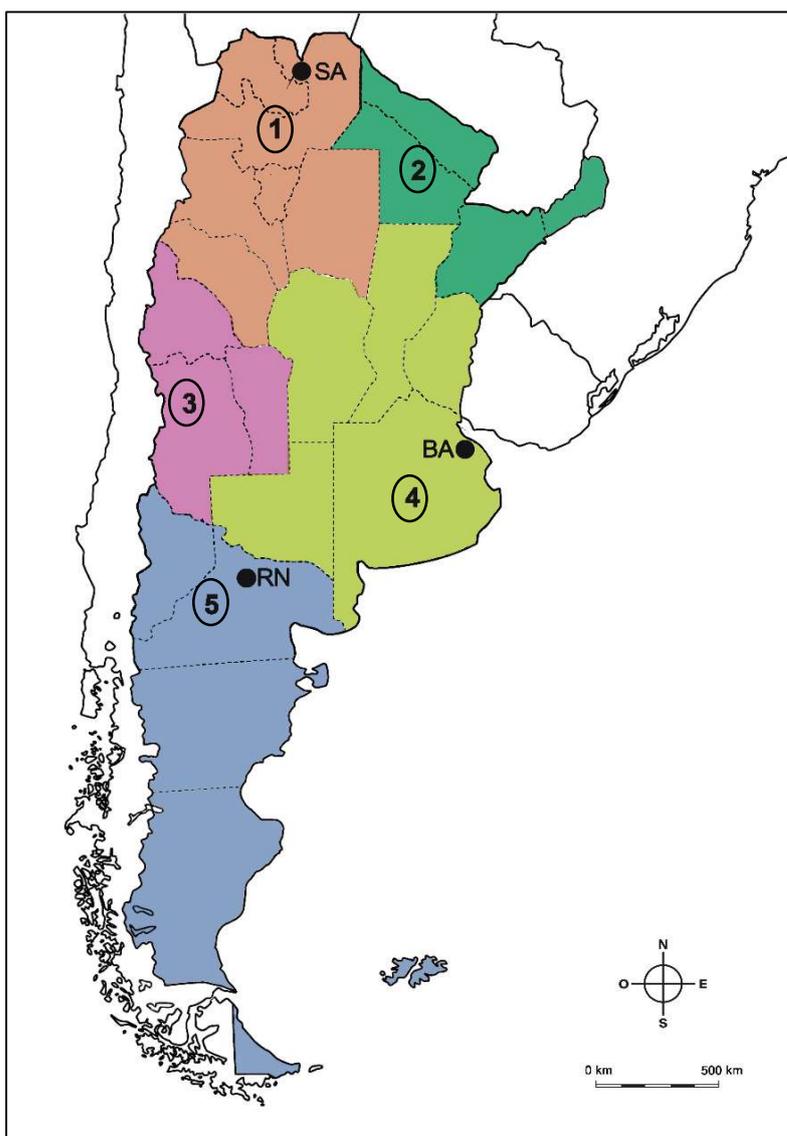


Figura 3.1. Mapa de la República Argentina indicando las principales regiones de producción de tomate (construido en base a: Ferraris 2015): 1) Noroeste; 2) Noreste; 3) Cuyo; 4) Pampeana; 5) Patagonia. La ubicación del área de los muestreos de *T. absoluta* y *P. dignus* realizados en este estudio se marcan como puntos en negrita: SA (Salta), BA (Buenos Aires) y RN (Río Negro y Neuquén)

❖ **SA:** los muestreos se realizaron durante el mes de octubre de los años 2015 y 2016, en predios ubicados en las localidades de Río Blanco, Pichanal, Peña Colorada y Colonia Santa Rosa, del departamento de San Ramón de la Nueva Orán (Fig. 3.2). En cada año se recorrieron entre 8 y 10 campos con cultivos de tomate bajo invernáculo y a cielo abierto, algunos convencionales y otros sin aplicación de agroquímicos. No todos presentaron daño causado por *T. absoluta*, razón por la cual los muestreos se realizaron en un número menor de campos a los efectivamente visitados. Los campos muestreados, es decir, aquellos que presentaron daño por *T. absoluta*, fueron los siguientes:

Año 2015

- **Río Blanco 1** (23°04'13.0"S 64°19'37.0"W; 350 m.s.n.m.): tomate bajo invernáculo; tratamiento con Philtrin (insecticida piretroide contra lepidópteros, hemípteros y otros órdenes de importancia agrícola), Ishipron (insecticida regulador del crecimiento; ataca lepidópteros, coleópteros y dípteros), Sportak (fungicida) y amonio cuaternario (desinfectante de amplio espectro) 7 días antes del muestreo.
- **Pichanal 1** (23°18'14.2"S 64°12'08.6"W; 316 m.s.n.m.): tomate a cielo abierto destinado a la industria, sin aplicación de plaguicidas al momento de la colecta.
- **Colonia Santa Rosa 1** (23°25'27.7"S 64°25'41.8"W; 366 m.s.n.m.): tomate a cielo abierto; tratamiento con Lufenuron (insecticida regulador del crecimiento, usado principalmente contra lepidópteros y coleópteros), fungicida y bioestimulantes entre 7 y 10 días antes del muestreo.
- **Colonia Santa Rosa 2** (23°26'27.7"S 64°25'41.8"W; 370 m.s.n.m.): tomate a cielo abierto. Última aplicación de plaguicidas entre 20 y 30 días antes del muestreo.

Año 2016

- **Río Blanco 1:** tomate perita colibrí, bajo invernáculo. Tratamiento con Proclaim Forte (insecticida de la familia de las avermectinas para el control de lepidópteros) y fertilizante Basel 4 días antes del muestreo.
- **Pichanal 1:** tomate a cielo abierto (sin datos sobre la variedad de tomate ni aplicación de insecticidas).
- **Colonia Santa Rosa 1:** tomate a cielo abierto, variedad DRW 7810 (Seminis Bayer); tratamiento con un insecticida genérico y Dimetoato (insecticida y acaricida organofosforado) 7 días antes del muestreo.
- **Colonia Santa Rosa 2:** tomate a cielo abierto (perita y cherry); tratamiento con Sunfire (insecticida y acaricida) 15 días previos al muestreo
- **Colonia Santa Rosa 3** (23°25'27.7"S 64°25'41.8"W; 370 m.s.n.m.): tomate a cielo abierto, variedad DRW 7810 (Seminis Bayer); aplicación con un plaguicida 20 días antes del muestreo, pero no se obtuvo información del producto utilizado.
- **Colonia Santa Rosa 4** (23°25'07.1"S 64°26'06.9"W; 380 m.s.n.m.): tomate a cielo abierto, variedad Elpida (Enza Zaden), con un tratamiento con insecticida de volteo (piretroide o clorpirifós) entre 10 y 15 días previos al muestreo.

❖ **RN:** Los muestreos fueron realizados durante la segunda quincena del mes de diciembre del 2017, y durante la segunda quincena del mes de febrero de los años 2018 y 2019. Cada año se recorrieron entre 8 y 10 campos cultivados con tomate tanto a cielo abierto como bajo invernáculo, con y sin aplicación de plaguicidas. Las localidades visitadas fueron Puente Cero, Centenario y Plottier en la provincia de Neuquén, y Lamarque, Luis Beltrán, Choele Choel, Cipolletti y General Roca en la provincia de Río Negro (Fig. 3.3). No todos los cultivos relevados presentaron daños por *T. absoluta*, por lo tanto, los campos muestreados fueron los siguientes:

Año 2017

- **Lamarque 1** (39°25'26.2"S 65°37'46.3"W; 125 m.s.n.m.): tomate bajo cubierta, variedad Isabella (BHN Seed); última aplicación realizada seis días antes del muestreo con Solomon (insecticida foliar para un amplio espectro de plagas y cultivos), Goti Glex (insecticida piretroide), Proclaim Forte (insecticida altamente activo contra larvas de lepidópteros), Matrero 35 (insecticida de contacto y sistémico).
- **General Roca 1** (39°01'31.0"S 67°31'21.3"W; 240 m.s.n.m.): tomate bajo invernáculo, variedades Kartier (HM Clause) e Imperial (Latam seeds); tratamiento con Karate Zeon (insecticida piretroide) 15 días previos al muestreo.

Año 2018

- **Lamarque 1:** tomate bajo invernáculo, variedades Isabella y Tarija (BHN Seed), tratado con Karate (insecticida piretroide) 4 días antes de la colecta.
- **General Roca 1:** tomate bajo invernáculo, variedad Kartier (HM Clause), tratamientos con piretroides y otros agroquímicos 2 meses antes del muestreo.
- **General Roca 2** (39°01'16.3"S 67°32'18.4"W; 240 m.s.n.m.): tomate bajo invernáculo, variedad Isabella (BHN Seed); tratamiento con Tracer (insecticida) varios meses antes del muestreo.
- **Lamarque 2** (39°22'24.1"S 65°46'30.3"W; 135 m.s.n.m.): tomate a cielo abierto, variedades Alfa Plus e Isabella (BHN Seed) y El Valle (Alliance). Se realizó un tratamiento con plaguicidas 20 días o más antes del muestreo, pero no se pudo obtener información acerca del producto utilizado.
- **Luis Beltrán** (39°20'31.9"S 65°45'46.3"W; m.s.n.m.): tomate bajo invernáculo, variedades Isabella (BHN Seed) y Platense, y cherries de diversas variedades; se trató con Matrero (insecticida de amplio espectro), 4 días antes del muestreo.
- **Lamarque 3** (39°24'17.2"S 65°41'56.2"W; 135 m.s.n.m.): tomate bajo invernáculo, se realizaron aplicaciones con plaguicidas varios meses antes

del muestreo, pero no se pudo obtener información acerca del producto utilizado.

Año 2019

- **Choele Choel** (39°21'56.7"S 65°42'51.0"W; 132 m.s.n.m.) tomate bajo invernáculo, variedades Isabella y Jaguareté (BHN Seed); modalidad convencional, sin datos respecto al uso reciente de agroquímicos.
- **General Roca 2**: tomate bajo invernáculo; modalidad convencional, sin datos respecto al uso reciente de agroquímicos o de la variedad de tomate.
- **Lamarque 2**: tomate bajo invernáculo, variedad Jaguareté (BHN Seed); tratado 15 días antes del muestreo con Tracer y otros productos.

❖ **BA**: Los muestreos fueron realizados entre los meses de febrero y marzo de los años 2016 y 2019, en cultivos de tomate orgánicos del Cinturón Hortícola Platense (CHP), particularmente en las localidades Ángel Etcheverry e Ignacio Correas (Partido de La Plata). Los campos muestreados fueron los siguientes:

- **A. Etcheverry** (35°01'21.3"S 58°03'25.5"W; 28 m.s.n.m.): tomate bajo invernáculo; modalidad orgánica.
- **I. Correas** (35°01'57.3"S 57°47'13.1"W; 10 m.s.n.m.): tomate bajo invernáculo; modalidad orgánica.



Figura 3.2. Muestreos en el noroeste argentino



Figura 3.3. Muestreos en región Patagónica

Colecta del material

En cada relevamiento se tomaron entre 300 y 350 unidades muestrales, cada una representada por una hoja de tomate del tercio superior de la planta, elegida al azar, con indicios de ataque de *T. absoluta*. Cada hoja se acondicionó individualmente entre dos papeles de filtro para absorber la humedad, y se la colocó en una bolsa tipo Ziploc® con cierre hermético, rotulada con datos sobre la fecha, lugar de procedencia y un número de identificación. Las bolsas fueron posteriormente depositadas en cajas plásticas, de 50 cm x 40 cm x 30 cm, con tapa, para poder ser trasladadas inmediatamente al laboratorio de Ecología de Plagas y Control Biológico del CEPAVE (CCT CONICET- UNLP), en la ciudad de La Plata (Fig. 3.4).

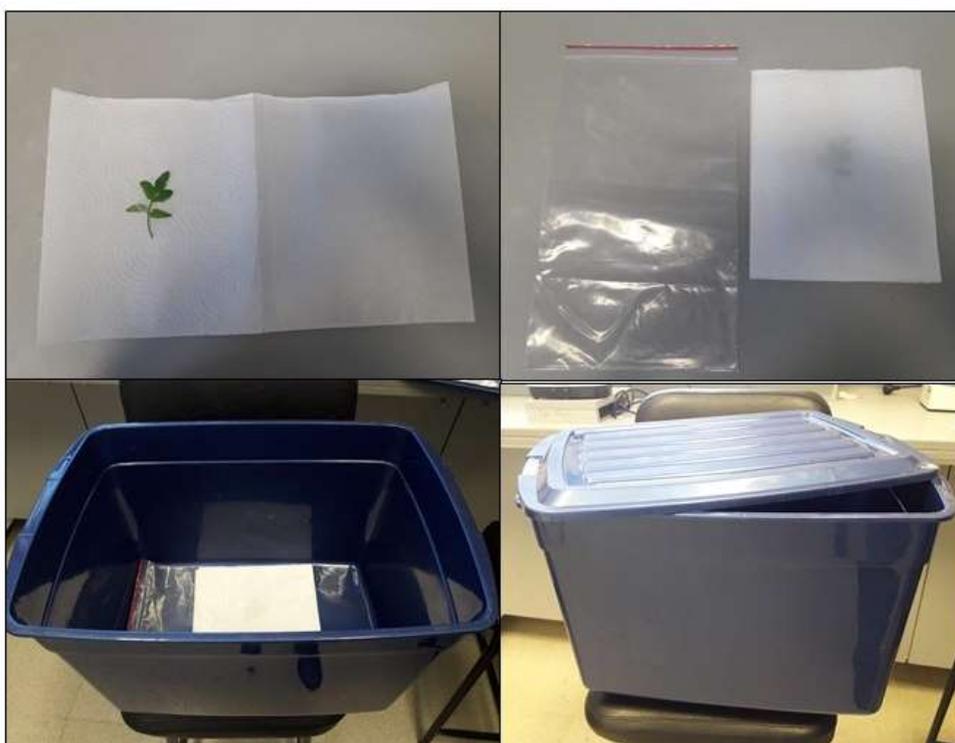


Figura 3.4. Acondicionamiento de hojas de tomate con indicios de daño de *Tuta absoluta* para su traslado al laboratorio del CEPAVE

Para el traslado del material colectado en NOA y Patagonia se tramitaron y obtuvieron los permisos correspondientes, otorgados por el Ministerio de Ambiente y Producción Sustentable de Salta, y SENASA (Centro Regional

Patagonia Norte), respectivamente. El Laboratorio de Ecología de Plagas y Control Biológico cuenta con permisos de colecta y traslado de material entomológico en la provincia de Buenos Aires, de la Dirección de Flora y Fauna, Ministerio de Agroindustria de la Prov. de Buenos Aires.

Acondicionamiento en el laboratorio del material colectado

Una vez en el laboratorio, cada hoja fue revisada bajo microscopio estereoscópico (Arcano), registrando el número de larvas de *T. absoluta* por hoja, y luego transferida a una bandeja plástica con tapa (500 ml), con papel de filtro para absorber la humedad, y rotulada con los datos del muestreo. Luego, cada caja se encerró en una bolsa de cierre hermético tipo Ziploc® para evitar el escape y pérdida de larvas de *T. absoluta*. Las bandejas se mantuvieron en un bioterio con condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperíodo ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 5\% \text{RH}$, 14:10 L: O). Cada 48 h se revisaban para verificar el desarrollo de las larvas, a las que se les proporcionaban hojas de tomate frescas para su alimentación hasta la formación de las pupas del parasitoide o de la polilla (Fig. 3.5).

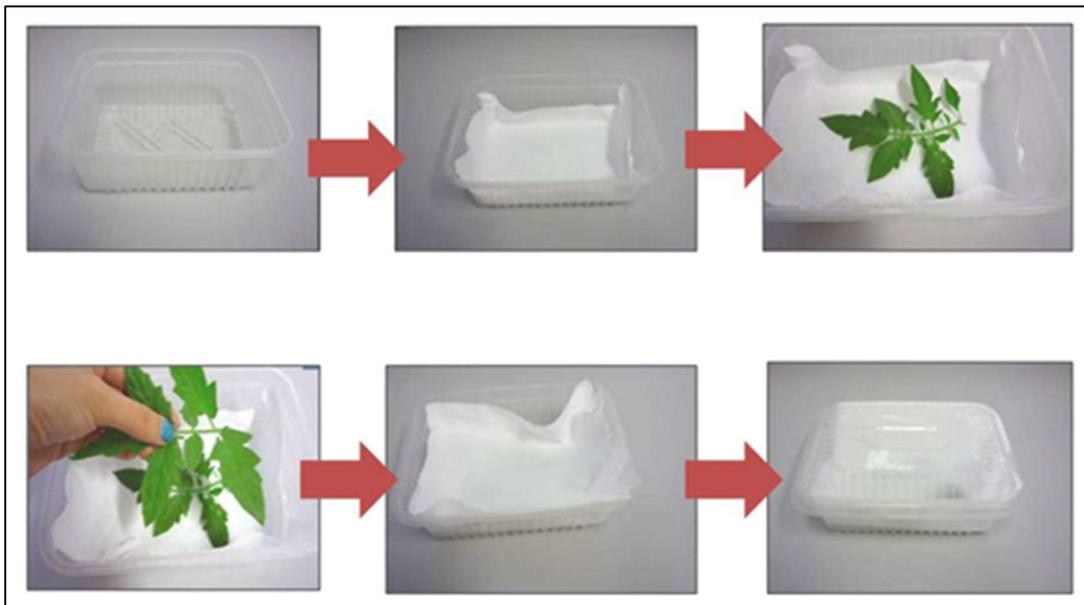


Figura 3.5. Acondicionamiento del material traído de campo en bandejas plásticas con suministro de alimento fresco

Las pupas de la polilla fueron separadas para fundar colonias de *T. absoluta* según la región de procedencia (ver capítulos siguientes).

Los cocones obtenidos del parasitoide fueron colocados individualmente en cápsulas plásticas (10 cm diámetro por 2 cm altura) con una traza de miel como fuente de alimentación para el adulto, una vez que emergiera. Las cápsulas se etiquetaron con la información correspondiente de los muestreos, y se mantuvieron en el bioterio (Fig. 3.6).

Asimismo, se mantuvo un registro del número de pupas y cocones obtenidos por hoja y por región, junto al número de larvas por hoja registrado anteriormente.



Figura 3.6. Acondicionamiento de cocones

Luego de la emergencia de los adultos del parasitoide, los mismos fueron examinados por el Dr. Daniel A. Aquino, de la División de Entomología del Museo de La Plata (FCNyM, UNLP) y revisados utilizando claves y la diagnosis y descripciones proporcionadas por bibliografía específica para identificar la especie (Muesebeck 1938; Mason 1981; Goulet y Huber, 1993; Wharton et al. 1997; Fernández y Sharkey 2006). Parte del material colectado fue depositado en la colección de la División de Entomología del Museo de la Facultad de Ciencias y Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata.

Posteriormente, un grupo de individuos de cada región fue fijado para llevar a cabo los estudios morfométricos, y otro grupo de adultos fue mantenido vivo para iniciar las colonias de *P. dignus* correspondientes según la región de origen (ver capítulos siguientes).

Parasitismo a campo por región

Con los datos registrados se calcularon la densidad de larvas de *T. absoluta*, como el número promedio de larvas por hoja, y el porcentaje de parasitismo promedio de *P. dignus* por hoja, por campo y año de muestreo, y por región y año de muestreo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ parasitismo} = \frac{\text{larvas de } T. \text{ absoluta parasitadas}}{\text{larvas de } T. \text{ absoluta colectadas}} \times 100$$

3.2.2 Estudios Morfométricos

Hembras adultas del parasitoide se fijaron en etanol al 70%, y se etiquetaron con el lugar y fecha de recolección. Posteriormente, cada una fue diseccionada y montada en tarjetas o portaobjetos utilizando las técnicas convencionales (Noyes 1990), para luego fotografiarlas y medirlas. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio estereoscópico Nikon SMZ1270 y una cámara Micrometrics 519CU CMOS de 5.0 megapíxeles, y las mediciones se realizaron utilizando el software Micrometrics Standard Edition Premium ACCU-SCOPE INC. (Fig. 3.7).



Figura 3.7. Toma de las medidas morfométricas del ala anterior

El estudio morfométrico se realizó sobre las alas anteriores, patas posteriores, ovipositor y cabeza, elementos más bien rígidos, lo cual disminuye la posibilidad de error. La elección de estas partes del cuerpo fue hecha en base a la bibliografía consultada (Yu et al. 1992; Azidah et al. 2000; Baylac et al. 2003; Aguirre-Fernández 2009; Marinho et al. 2014; Schwarzfeld y Sperling 2014). Para las alas se utilizó un aumento de 40x y para el resto de las partes se usó un aumento de 60x.

Para la terminología morfológica y de las mediciones generales de las estructuras se siguió a Azidah et al. (2000) y a Goulet y Huber (1993), mientras que la terminología usada para la venación del ala correspondió a la propuesta por Fitton et al. (1988), Gauld y Bolton (1996), y Wharton et al. (1997).

Las **alas anteriores** (Fig. 3.8) fueron extraídas de su base, y montadas en portaobjetos.

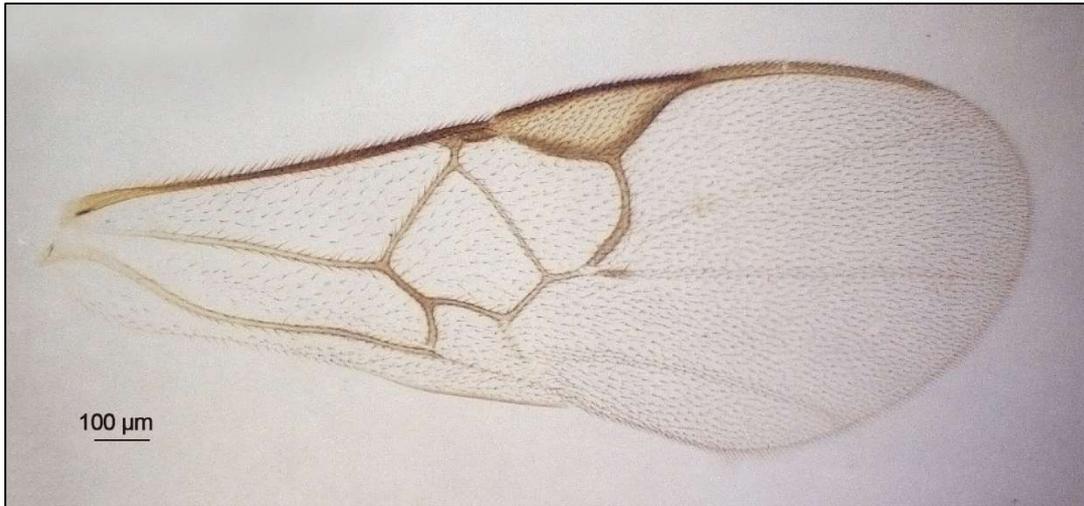


Figura 3.8. Fotografía del ala anterior de *P. dignus* tomada con microscopio estereoscópico Nikon SMZ1270, cámara Micrometrics 519CU CMOS de 5.0 megapíxeles, y software Micrometrics Standard Edition Premium ACCU-SCOPE INC.

Se definieron y registraron 14 puntos de referencia (denominados de A a N) utilizando, en la mayoría de los casos, las intersecciones de las venas (Fig. 3.9).

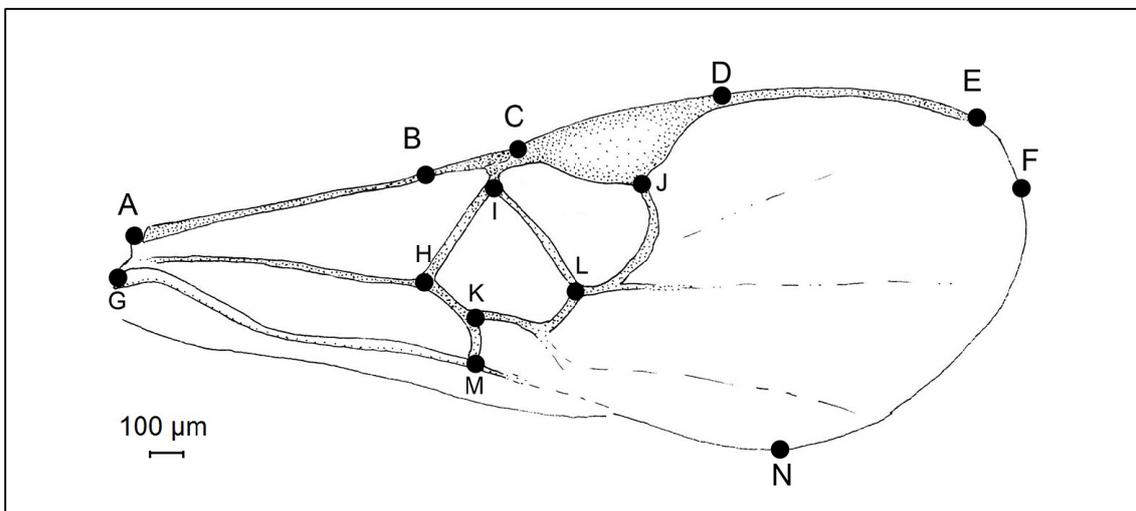


Figura 3.9. Puntos de referencia establecidos sobre el ala anterior de *P. dignus* utilizados para mediciones morfométricas.

Así, se establecieron 13 mediciones lineales:

- longitud máxima del largo (**A-F**) y ancho (**D-N**) del ala;
- longitud de la vena C + Sc + R (**A-C**);
- longitud del pterostigma (**C-D**);
- longitud de la vena M + Cu (**A-H**);
- distancia en línea recta vertical desde la vena C + SC + R a la intersección de la vena M + Cu con la vena M (**B-H**);
- longitud de la vena 1A (**G-M**);
- distancia desde la intersección de las venas M y CU hasta la intersección de las venas 1A y CU (**H-M**);
- distancia de la intersección de la vena M con la vena RS + M (**I-K**);
- distancia desde la intersección de las venas M y CU hasta la intersección de la vena RS + M con la vena recurrente m + cu (**H-L**);
- distancia desde la intersección de las venas M, y RS + M hasta la intersección de la vena RS + M con la vena RS (**I-L**);
- distancia desde la intersección de las venas M y RS + M hasta el comienzo de la vena r en el pterostigma (**I-J**);
- distancia desde el comienzo de la vena r en el pterostigma hasta la intersección de la vena RS + M con la vena RS (**J-L**).

Las **patas posteriores** (3.10-a) fueron extraídas y montadas sobre portaobjetos. Se midió la longitud de la tibia desde el ápice dorsal del fémur hasta el ápice dorsal de la tibia (**LMT**) (Fig. 3.11-a).

El **ovipositor** (3.10-b) fue extraído, montado en portaobjetos y medido desde el extremo anterior al posterior (**LOV**) (Fig. 3.11-b).

Finalmente, después de extraer las alas anteriores, las patas traseras y el ovipositor, los individuos se montaron sobre una tarjeta y se midió la **cabeza** (3.10-c), tomando las siguientes dimensiones: longitud máxima de la cara desde la base de los toruli hasta el margen superior del cílopeo (**MLF**) y anchura máxima de la cara, como la distancia entre el borde anterior de los ojos compuestos, por debajo del borde anterior de los toruli (**MWF**) (Fig. 3.11-c).

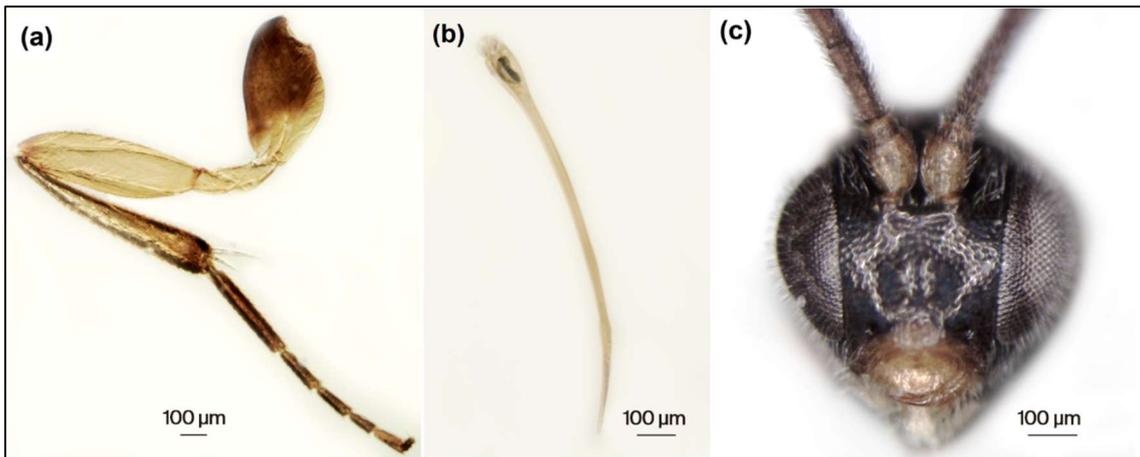


Figura 3.10. Fotografías de a) pata posterior; b) ovipositor; c) cabeza en vista frontal de *Pseudapanteles dignus*, tomadas con microscopio estereoscópico Nikon SMZ1270, cámara Micrometrics 519CU CMOS de 5.0 megapíxeles, y software Micrometrics Standard Edition Premium ACCU-SCOPE INC.

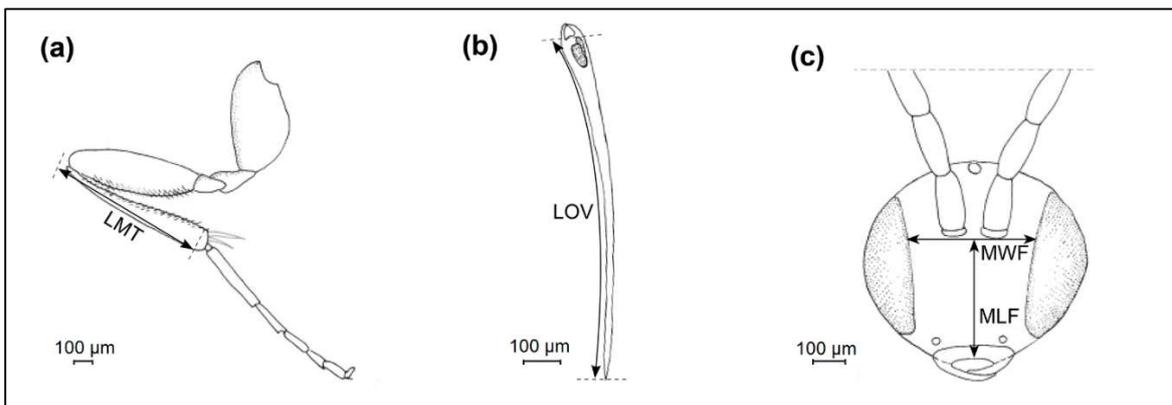


Figura 3.11. Medidas utilizadas en estudios morfométricos, esquemas de: a) pata posterior; b) ovipositor; c) cabeza de *P. dignus*. Las abreviaturas y explicaciones se encuentran en el texto.

Además de considerar las mediciones lineales, con el objetivo de minimizar las diferencias en las estimaciones individuales, se calcularon las siguientes proporciones con base en las mediciones lineales (Sneath y Sokal 1973; Daly 1985): A-F / D-N; A-C / C-D; A-H / B-H; A-H / H-M; G-M / H-M; H-L / I-K; I-J / I-L e I-J / J-L (alas anteriores), MLF / MWF (cabeza); LOV / LMT (ovipositor y metatibia).

Las proporciones calculadas fueron comparadas entre ejemplares de las distintas regiones geográficas mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y Test HSD de Tukey, cuando las condiciones de normalidad y homocedasticidad de los datos lo permitieron. En los casos en los cuales no fue posible aplicar

ANOVA, los análisis fueron realizados mediante la prueba Kruskal-Wallis y el test Conover–Iman para las comparaciones múltiples *post-hoc*. Se eligió un nivel de significancia del 5% para todos los análisis.

Por otro lado, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para reducir el conjunto de variables (proporciones) y buscar aquellas que expliquen mejor la posible variación morfológica de las diferentes poblaciones de *P. dignus*. Primero, se realizó un análisis de correlación con el conjunto de las 10 variables, se eliminaron tres altamente correlacionadas, y finalmente se utilizaron para el análisis PCA las siguientes proporciones: A-F / D-N, A-C / C-D, A-H / B-H, A-H / H-M, I-J / J-L, MLF / MWF y LOV / LMT. Todos los análisis y el procesamiento de los datos se realizaron con el software R versión 3.5.0 (R CoreTeam 2018; Wickam et al. 2018).

3.3 Resultados

3.3.1. Poblaciones locales de *P. dignus* y parasitismo a campo

Pseudapanteles dignus estuvo presente en las regiones estudiadas: NOA (provincia de Salta), Pampeana (Buenos Aires) y Patagónica (Río Negro), parasitando larvas de *T. absoluta* en cultivos de tomate durante los muestreos realizados. Cabe mencionar que la presencia de otros parasitoides fue mínima (< 0,1%). Se registraron individuos de los géneros *Bracon* sp (Hymenoptera: Braconidae), *Conura* sp. (Hymenoptera: Chalcididae), *Bassus* sp (Hymenoptera Braconidae) e individuos himenópteros de la familia Eulophidae. Por otro lado, no se detectó hiperparasitismo de *P. dignus*.

En la provincia de Salta se halló a *P. dignus* en los cuatro campos relevados que presentaron daño por *T. absoluta* en el año 2015 (Río Blanco 1, Pichanal 1, Col. Santa Rosa 1 y Col. Santa Rosa 2); y en dos de los campos relevados en el año 2016 (Río Blanco 1 y Col. Santa Rosa 3) (Tabla 3.1). Todos ellos habían sido tratados con plaguicidas en un periodo comprendido entre la fecha de muestreo y hasta unos 20 días antes del mismo; y eran tanto cultivos bajo invernáculo como a cielo abierto. El parasitismo promedio de todos los campos muestreados para esta región mostró valores muy bajos, siendo 3,84%

en el año 2015, y 0,24% el año 2016 (Tabla 3.2).

En la provincia de Río Negro, en el año 2017 no se registró a *P. dignus* en ninguno de los campos muestreados con presencia de *T. absoluta*; y en los años 2018 y 2019 se lo encontró en un campo cada año, Lamarque 2 y General Roca 1, respectivamente (Tabla 3.1). El primero, había sido tratado con plaguicidas 20 días antes del muestreo (tomate a cielo abierto), y exhibió el valor de parasitismo más alto estimado de todos los campos muestreados, y el segundo había sido fumigado recientemente (tomate bajo invernáculo). El parasitismo promedio hallado en esta región fue altamente variable, siendo de 10,33% para el año 2018 y de 1,03% para el año 2019 (Tabla 3.2).

Por último, en los dos campos muestreados en la provincia de Buenos Aires, ambos sin aplicación de insecticidas, se encontró al parasitoide *P. dignus* parasitando a *T. absoluta*, en ambos casos bajo invernáculo (Tabla 3.1). Los valores de parasitismo registrados fueron los más altos (con excepción de Lamarque 2 en Patagonia), y variaron entre un 37,5 % en el 2016 y 42% en el año 2019 (Tabla 3.2).

Tabla 3.1. Número de campos muestreados por región y año, con presencia de *T. absoluta* y *P. dignus*.

Región y fecha de muestreo	Campos muestreados	Campos con <i>T. absoluta</i>	Campos con <i>P. dignus</i>
NOA - Octubre 2015	10	4	4
NOA - Octubre 2016	8	6	2
Patagonia - Diciembre 2017	8	2	0
Patagonia - Febrero 2018	10	6	1
Patagonia - Febrero 2019	8	3	1
Pampeana – Febrero/Marzo 2016	2	2	2
Pampeana – Febrero/Marzo 2019	2	2	2

Tabla 3.2. Número de larvas de *T. absoluta* promedio por hoja (\pm E.E.) y porcentaje de parasitismo promedio de *P. dignus* por campo y año de muestreo, y por región y año de muestreo (I=invernáculo; C=a campo)

Región y año	Campo-localidad	N° larvas promedio <i>T. absoluta</i> /hoja \pm E.E.	% parasitismo promedio	% parasitismo región/año
NOA octubre 2015	Río Blanco 1 (I)	4,97 \pm 1,03	5	3,84
	Pichanal 1 (C)	8,37 \pm 1,21	1	
	Col. Santa Rosa 1 (C)	5,43 \pm 0,67	6,9	
	Col. Santa Rosa 2 (C)	38,86 \pm 6,71	2,44	
NOA octubre 2016	Río Blanco 1 (I)	17,64 \pm 2,13	0,96	0,24
	Pichanal 1 (C)	10,07 \pm 2,29	0	
	Col. Santa Rosa 1 (C)	0,57 \pm 0,23	0	
	Col. Santa Rosa 2 (C)	1,67 \pm 0,55	0	
	Col. Santa Rosa 3 (C)	3,9 \pm 0,99	0,45	
Patagonia Diciembre 2017	Lamarque 1 (I)	2,7 \pm 0,31	0	0
	Gral. Roca 1 (I)	4,93 \pm 0,4	0	
Patagonia Febrero 2018	Lamarque 1 (I)	9,3 \pm 2,26	0	10,33
	Gral. Roca 1 (I)	6,89 \pm 0,83	0	
	Gral. Roca 2 (I)	1,68 \pm 0,15	0	
	Lamarque 2 (C)	11,02 \pm 1,15	61,96	
	L. Beltrán (I)	7,6 \pm 1,6	0	
Patagonia Febrero 2019	Lamarque 3 (I)	3,07 \pm 0,3	0	1,03
	Choele Choel (I)	17,48 \pm 1,72	0	
	Gral. Roca 2 (I)	2,22 \pm 0,27	3,1	
Pampeana Febrero/Marzo 2016	Lamarque 2 (I)	5,33 \pm 1,54	0	37,5
	A. Etcheverry (I)	1,25 \pm 0,05	48	
Pampeana Febrero/Marzo 2019	I. Correas (I)	1,44 \pm 0,8	27	42
	A. Etcheverry (I)	1,67 \pm 0,41	52	
	I. Correas (I)	2,64 \pm 0,61	32	

Referencias:

- Aplicación de insecticida reciente (< 20 días)
- Aplicación de insecticida no reciente (> 20 días)
- Sin aplicación de insecticida

3.3.2. Estudio morfométrico

El promedio (\pm D.E.) de cada medición lineal y de cada proporción estimada del ala anterior, la metatibia, el ovipositor y la cabeza de *P. dignus* de las tres poblaciones estudiadas se muestran en las tablas 3.3 y 3.4. Puede observarse a grandes rasgos que la población de Buenos Aires es la que presenta los valores mayores, seguida por la de Salta, y luego la de Río Negro.

Tabla 3.3. Media (\pm D.E.) de cada medición lineal estimada en μm en el ala anterior, la metatibia, el ovipositor y la cabeza de *P. dignus* de tres poblaciones locales

	Medida	Salta			Buenos Aires			Río Negro		
		Media	D.E.	N	Media	D.E.	N	Media	D.E.	N
Ala anterior	A-C	1208,8	85,16	78	1250,9	64,12	81	1169,9	61,13	65
	A-F	2572,1	167,36	78	2673,5	110,13	81	2516,8	113,03	65
	A-H	908,7	62,55	78	948,9	50,93	81	870,2	46,3	65
	B-H	297,3	24,24	78	312,8	20,33	81	286,2	19,98	65
	C-D	539,2	34,92	78	556,6	23,51	81	513	25,3	65
	D-N	963,4	64,72	78	1028,9	45,8	81	932,4	48,32	65
	G-M	1072,4	73,4	78	1111,5	57,35	81	1027,5	52,59	65
	H-L	426,1	28,65	78	442,5	21,43	81	414,3	22,35	65
	H-M	261,5	16,22	78	271,3	14,84	81	251,1	13,49	65
	I-J	439,5	27,93	78	448,8	19,05	81	417,8	20,64	65
	I-K	379,9	27,07	78	395,3	20,92	81	365,8	21,88	65
	I-L	391,5	23,72	78	402,3	19,34	81	372,5	20,42	65
Metatibia	LMT	777,2	47,63	64	801,7	35,32	48	751,8	40,07	61
Ovipositor	LOV	1024,1	59,22	64	1068	40,76	48	1020,9	48,12	61
Cabeza	MLF	321,1	20,13	62	328,2	15,41	61	308,5	16,78	66
	MWF	366,5	15,76	62	376,5	13,29	61	361,6	15,78	66

Tabla 3.4. Media (\pm D.E.) de cada proporción establecida para el ala anterior, la metatibia, el ovipositor y la cabeza de *P. dignus* de tres poblaciones locales

Variable	Salta		Buenos Aires		Río Negro	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
A-F/D-N	2,67	0,07	2,60	0,06	2,70	0,07
A-C/C-D	2,24	0,06	2,25	0,08	2,28	0,08
A-H/B-H	3,06	0,13	3,04	0,12	3,05	0,12
A-H/H-M	3,48	0,16	3,50	0,15	3,47	0,13
G-M/H-M	4,10	0,17	4,10	0,16	4,10	0,15
H-L/I-K	1,12	0,03	1,12	0,02	1,13	0,03
I-J/I-L	1,12	0,03	1,12	0,03	1,12	0,03
I-J/L-J	1,21	0,03	1,19	0,02	1,21	0,03
LOV/LMT	1,32	0,02	1,33	0,02	1,36	0,02
MLF/MFW	0,88	0,04	0,87	0,03	0,85	0,03

Se encontraron diferencias significativas interpoblacionales en 6 de las 10 relaciones estudiadas: cuatro relaciones del ala (AF / DN, AC / CD, HL / IK, IJ / JL), la relación ovipositor / metatibia (LOV / LMT) y la relación entre la longitud y el ancho de cara (MLF / MWF) (Tablas 3.5 y 3.6; Fig. 3.12). La población de RN difirió en todas estas variables en comparación con las otras dos poblaciones (BA, SA), cuyos individuos mostraron alas más largas y delgadas, ovipositor 1,36 veces más largo que la metatibia y cara más ancha que larga. Las poblaciones de SA y BA resultaron ser morfológicamente más similares, difiriendo sólo en los valores para tres proporciones del ala (A-F/D-N, H-L/I-K e I-J/J-L) y la relación metatibia/ovipositor (LOV / LMT). Con respecto a la longitud y el ancho de la cara no presentaron diferencias, siendo más largas que anchas en comparación con las de RN. En cuanto a las alas, las de BA resultaron ser más cortas y anchas que las de SA, y en cuanto al ovipositor, es 1,33 y 1,32 veces más largo que la metatibia en las poblaciones de BA y SA, respectivamente.

Tabla 3.5. Parámetros estadísticos resultantes de las pruebas ANOVA y Kruskal-Wallis para comparar medias de las relaciones morfométricas tomadas en las tres poblaciones locales de *P. dignus*

Proporción	Prueba	Estadísticos	p-valor
A-F / D-N	F	49,13	2,23E-18 *
A-C / C-D	H	8,74	0,013 *
A-H / B-H	F	0,74	0,48
A-H / H-M	F	0,96	0,39
G-M / H-M	F	0,04	0,96
H-L / I-K	F	4,55	0,012 *
I-J / J-L	H	24,63	4,48E-06 *
I-J / I-L	F	1,14	0,32
LOV / LMT	F	52,01	2,39E-18 *
MLF / MWF	F	9,16	0,000 *

F: Fisher; H: Kruskal-Wallis; gl= 2; * nivel de significancia del 5%. Las leyendas de las variables son explicadas la sección materiales y métodos

Tabla 3.6. Resultados de los tests *post hoc* Tukey (T) y Conover-Iman (CI), para comparar medias de las relaciones morfométricas estimadas para las poblaciones locales de *P. dignus*

Proporción	Test	Provincias	p-valor	Proporción	Test	Provincias	p-valor
A-F/D-N	T	BA-RN	<1e-04*	I-J/L-J	CI	BA-RN	0,0002*
		BA-SA	<1e-04*			BA-SA	1,9E-06*
		RN-SA	0,02*			RN-SA	0,17
A-C/C-D	CI	BA-RN	0,02*	LOV/LMT	T	BA-RN	< 1e-04*
		BA-SA	0,26			BA-SA	0,002*
		RN-SA	0,001*			RN-SA	< 1e-04*
H-L/I-K	T	BA-RN	0,01*	MLF/MWF	T	BA-RN	0,004*
		BA-SA	0,8254			BA-SA	0,75973
		RN-SA	0,06			RN-SA	< 0,001*

Poblaciones locales: Buenos Aires (BA), Salta (SA), Río Negro (RN). * Nivel de significancia del 5%. Las abreviaturas de las variables están explicadas en el texto

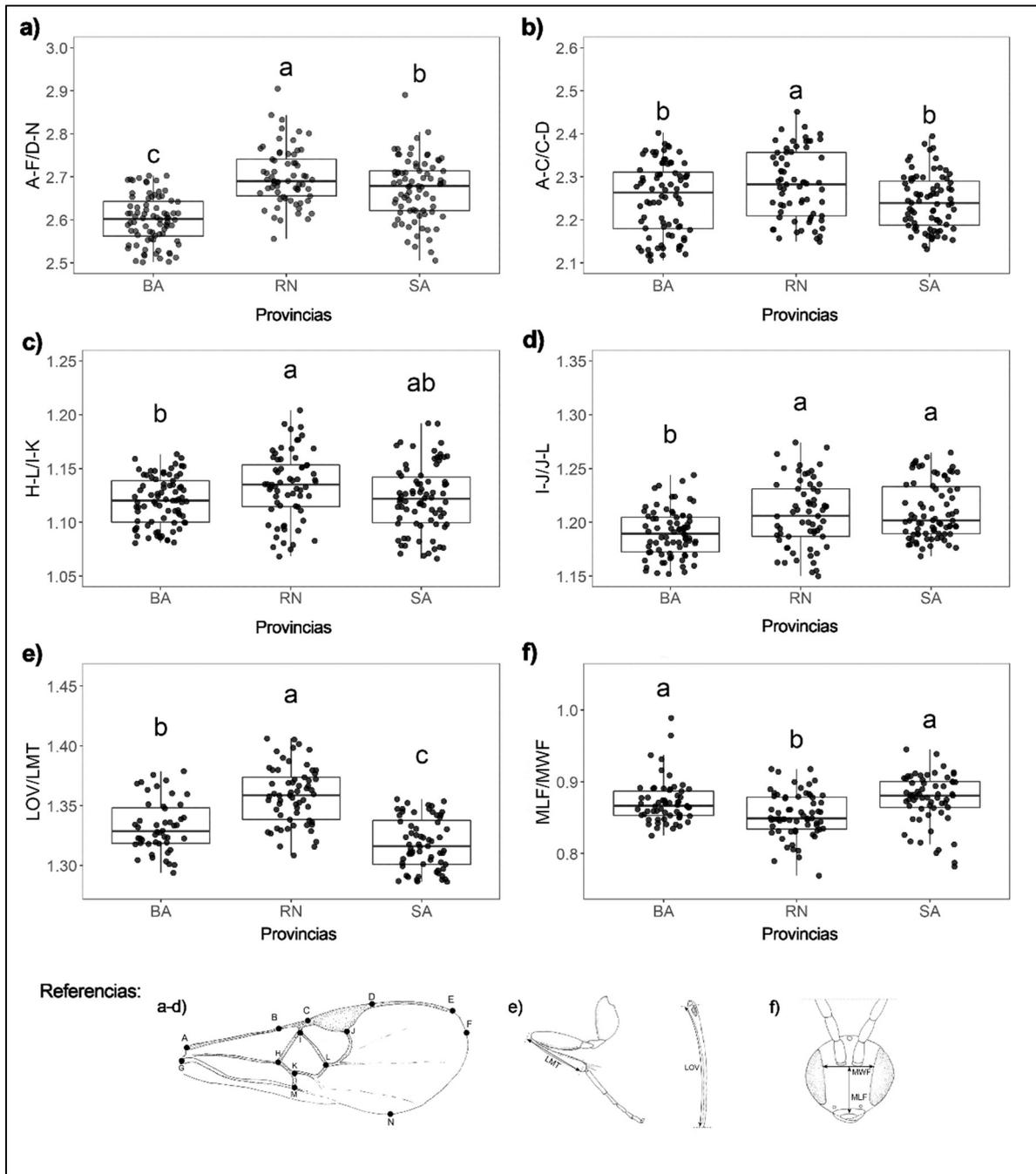


Figura 3.12. Boxplots mostrando la distribución de los datos de las proporciones morfológicas medidas en el ala anterior (a-d), metatibia (e), ovipositor (e) y cabeza (f) de avispas hembras de *P. dignus*, que resultaron significativamente diferentes entre tres poblaciones geográficas argentinas estudiadas (BA, Buenos Aires; RN, Río Negro y SA, Salta provincias). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las poblaciones (prueba HSD de Tukey). Las abreviaturas de las variables están explicadas en el texto

Con respecto al análisis de PCA, los primeros tres componentes explicaron el 59% de la variabilidad total, y cada componente contribuyó con 22,2%, 20,6% y 16,2% respectivamente (Fig. 3.13).

El primer componente (PC 1) separó individuos de *P. dignus* con alas más largas y estrechas, y caras más anchas que largas de individuos con alas más cortas y anchas, y caras más largas que anchas. El segundo componente (PC 2) separó grupos según si las relaciones medidas en las alas, A-C/C-D, A-H/B-H y A-H/H-M, aumentan o disminuyen en conjunto; y el tercer componente (PC 3) organizó a los individuos en función de las proporciones medidas en las alas A-H/B-H, I-J/J-L y las relacionadas con el ovipositor y metatibia LOV/LMT.

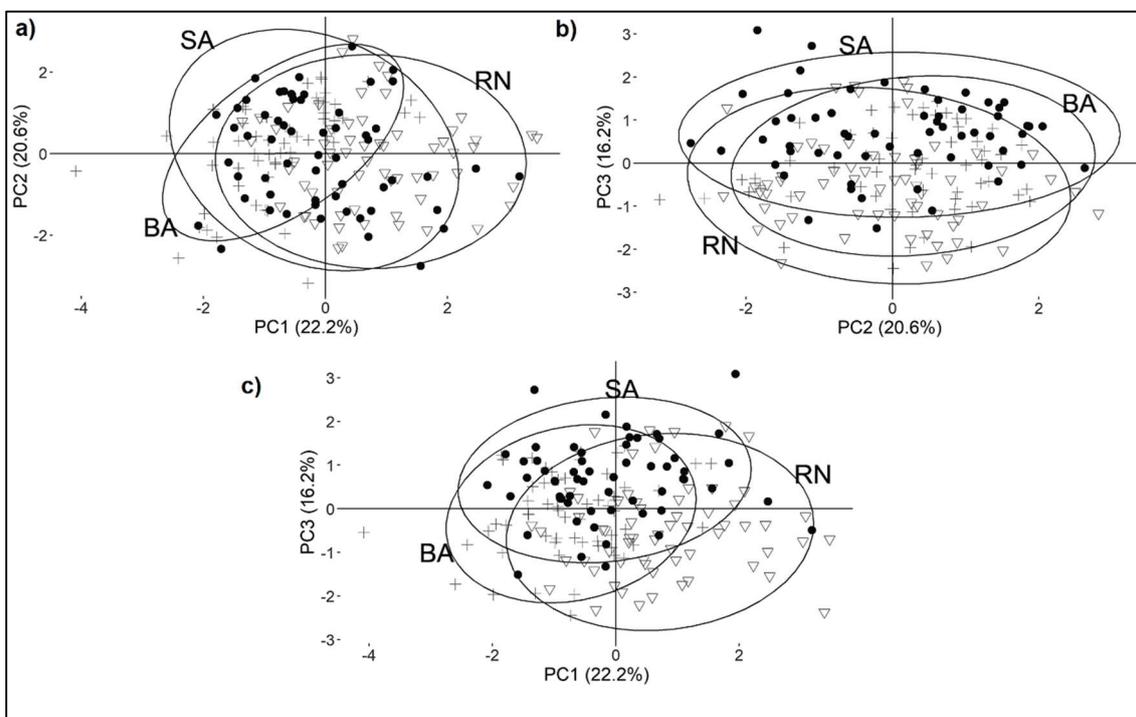


Figura 3.13. Biplots de análisis PCA de las proporciones morfométricas de las poblaciones locales de *P. dignus*, mostrando la carga de cada variable y las elipses de confianza conteniendo el 95% de los datos. a) PC1 y PC2; b) PC2 y PC3; c) PC1 y PC3. Referencias: +BA (Buenos Aires); ● SA (Salta); ■ RN (Río Negro)

3.4 Discusión

El conocimiento sobre la distribución geográfica de *P. dignus*, un potencial agente de biocontrol de *T. absoluta*, es importante a la hora de evaluar su éxito en programas de control biológico, tanto por conservación o aumentativo, en cultivos de tomate distintas regiones de la Argentina donde se sabe que efectivamente la plaga está presente.

Este estudio contribuyó a ampliar los conocimientos respecto a la distribución geográfica de *P. dignus* en la Argentina, poco estudiada y conocida hasta el momento. Se lo halló por primera vez en las localidades de Río Blanco, Pichanal y Colonia Santa Rosa (provincia de Salta) y en las localidades de Lamarque y General Roca (provincia de Río Negro). Estos nuevos registros de su presencia en zonas productoras de tomate distantes entre sí de la Argentina, hace suponer que también puede encontrarse en el resto de las regiones productoras de tomate de latitudes intermedias no muestreadas en este trabajo.

Es interesante destacar que el número de campos en los cuales se registró *P. dignus* en NOA y Patagonia fue muy bajo respecto al total de campos muestreados, particularmente en la región patagónica. A su vez, los porcentajes de parasitismo encontrados por campo y año de muestreo también fueron muy bajos (<7%), sobre todo en comparación con los hallados en BA (27-52%). Una posible explicación del bajo nivel de parasitismo encontrado en NOA y Patagonia sería el uso elevado de plaguicidas que no permite la supervivencia o establecimiento del parasitoide. Sin embargo, llama la atención lo observado en el campo Lamarque 2 (Patagonia), ya que en el relevamiento del año 2018 presentó un parasitismo de casi 62% a pesar de haber sido tratado con plaguicidas 20 días antes del muestreo. Probablemente, prácticas de manejo de la plaga que prescindan o reduzcan el uso de plaguicidas favorecerían la acción de este parasitoide.

Los estudios morfométricos realizados, como parte de una taxonomía integrativa, reafirmaron la identidad del parasitoide hallado en las tres regiones muestreadas parasitando a *T. absoluta*. Si bien se encontraron diferencias entre las poblaciones estudiadas, no fueron suficientes para poder distinguir entidades taxonómicas diferentes.

Asimismo, en este trabajo de Tesis se comunica nueva información morfométrica, relevante y adicional a la descripción original de la especie *P. dignus* hecha por Muesebeck (1938) y revisada en parte por Cardona y Oatman (1971) y Fernández-Triana (2014), ya que estos autores aportaron información mayormente cualitativa y en base a pocos individuos hembras de Norteamérica. Así, se presentan medidas de partes de las alas, patas, ovipositor y cabeza, y algunas proporciones entre estas partes que aportan conocimientos sobre la variación del tamaño corporal de adultos hembras de *P. dignus* de la Argentina. Esta nueva información puede servir de referencia para futuros estudios en otras regiones del país donde se encuentra la especie.

Las diferencias morfométricas encontradas indican que existe una ligera variación natural intraespecífica entre las tres poblaciones de *P. dignus* presentes en áreas geográficas distantes de la Argentina. Los individuos correspondientes a RN mostraron mayores diferencias morfológicas en cuanto a las proporciones analizadas en comparación con las poblaciones de BA y SA. Estos dos últimos resultaron ser más similares entre sí. Además, en líneas generales, los individuos de BA resultaron ser ligeramente más grandes, seguidos por los de SA, y luego los de RN.

La forma es una característica importante en los sistemas biológicos, debido a que proporciona un vínculo entre el genotipo y el medio ambiente. Se habla de plasticidad fenotípica cuando un genotipo es capaz de producir diferentes fenotipos en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Cuanto mayor sea la plasticidad fenotípica de un determinado carácter, más sensible será a los cambios ambientales, y permitirá que una población o especie tenga una mayor distribución (Ricklefs y Miles 1994; Adams 1999; Berns 2014).

Por ejemplo, la relación existente entre el tamaño corporal y la temperatura es compleja, y puede definir patrones en los que intervienen la variación fenotípica individual, la diversidad genética intraespecífica y la escala geográfica, entre otros (García-Barros 1999), llevando por lo tanto a una estructuración espacial de los tamaños de los cuerpos de los organismos a una escala biogeográfica. Así, se ha observado que en muchas especies de insectos el tamaño promedio de los adultos aumenta a bajas temperatura (Danks 1994). Asimismo, patrones recurrentes en el tamaño del cuerpo analizados a través de latitudes han llevado a establecer “reglas” biogeográficas, como la regla de

Bergmann, que establece que los individuos de una especie de mayores latitudes (y por tanto climas más fríos) poseen mayor tamaño que aquellos que se encuentran en latitudes menores. Entre las explicaciones que se han postulado para este patrón 'temperatura - tamaño corporal', se pueden mencionar la capacidad de intercambio de calor de los organismos con el ambiente, la disponibilidad y estacionalidad de los recursos, o la suposición de que una mayor masa corporal almacena mayor cantidad absoluta de sustancias de reserva. También, la existencia de un gradiente latitudinal de diversidad influye en una disminución de la riqueza específica hacia los polos, como así también se reduce el número de interacciones ecológicas (por ejemplo, con competidores y enemigos naturales). Esto puede liberar de presión a ciertos rasgos de las especies, y permitir el desarrollo de una mayor talla (Bombi Haedo 2016).

En el caso de las poblaciones estudiadas de *P. dignus*, la regla de Bergmann no se cumpliría. Sin embargo, con respecto a las temperaturas máximas medias durante los meses de producción de tomate en cada región, BA presenta el menor valor (25°C) y los individuos de mayor tamaño.

Por otro lado, el tamaño del parasitoide también suele verse afectado por el de su hospedador (Atkinson 1994), por lo cual surge una nueva pregunta, ¿lo que varía será en realidad el tamaño del hospedador en cada región y eso se ve reflejado en el de su parasitoide? El tamaño de las larvas de *T. absoluta* de las distintas regiones no ha sido evaluado como para poder establecer una relación con su tamaño corporal, ni tampoco se encontró una correlación con la latitud o temperatura del lugar de origen de cada población.

Otro punto a tener en cuenta es la fuente de alimentos para los parasitoides adultos, que pueden diferir por región a causa de las diferencias agronómicas, climáticas y geográficas, y estar influyendo en su tamaño. Las diferencias que mostró el análisis morfométrico entre las tres poblaciones podrían verse influenciadas por su lugar de origen, debido a las interacciones con factores bióticos, tales como las larvas del huésped, y factores abióticos (temperatura, humedad, precipitación pluvial) del lugar. Esto, a su vez, podría estar indicando que las poblaciones geográficas locales se están estructurando en biotipos (Olson et al. 2004; Wajnberg et al. 2008; Rodríguez-Zabala et al. 2016).

Cabe mencionar que los estudios morfométricos para BA fueron

realizados con individuos provenientes de cultivos sin aplicación de plaguicidas, mientras que los estudios realizados con SA y RN fueron realizados con individuos provenientes de cultivos con un manejo convencional (con aplicación más o menos reciente de plaguicidas), debido a que en esas dos últimas regiones en algunos casos no se relevaron campos manejados sin aplicación de plaguicidas, o los mismos no presentaron daño por *T. absoluta* o parasitismo por *P. dignus*. Esta situación plantea el interrogante de si la aplicación de agroquímicos estaría influenciando el tamaño de los individuos de la población a través de procesos de selección artificial.

Otros autores evaluaron diferencias morfológicas entre poblaciones locales de parasitoides. Por ejemplo, Zikic et al. (2009) que estudiaron biotipos del braconido parasitoide de áfidos *Ephedrus persicae* Frogatt, mediante morfometría clásica, y encontraron que los biotipos de la zona Paleártica, a pesar de presentar cierta variabilidad intraespecífica significativa, ésta no era suficiente para separar a *E. persicae* en grupos diferentes. Por otro lado, Marinho et al. (2014) realizaron análisis morfométricos en especímenes de *Opius* sp. aff. *bellus* para clarificar su identidad. Los resultados de los análisis mostraron una gran similitud morfológica entre los especímenes, lo cual indicó que todos ellos pertenecían a la especie *Opius bellus* (Gahan), parasitoide la mosca de la fruta.

En conclusión, *P. dignus* se registró parasitando a *T. absoluta* casi con exclusividad en cultivos de tomate de distintas regiones de la Argentina con características ambientales y geográficas distintas, y con una leve plasticidad fenotípica.

Capítulo 4

Compatibilidad reproductiva entre poblaciones locales del parasitoide *Pseudapanteles dignus*

4.1 Introducción

Cuando una especie biológica presenta una amplia distribución geográfica, cabe esperar cierta variabilidad intraespecífica, tanto variaciones genotípicas como fenotípicas, que eventualmente deriven en algún grado de incompatibilidad reproductiva (van Lenteren 2003; Luna y Hawkins 2004; Phillips et al. 2008).

La incompatibilidad reproductiva total o parcial en los experimentos de cruce ha sido demostrada especialmente en aquellos parasitoides himenópteros que presentan una estructura de poblaciones geográficas aisladas o representadas por biotipos (Quicke 1997). Este es un punto crucial para los programas de control biológico aumentativo con liberaciones inoculativas, como las practicadas en cultivos hortícolas, cuyo objetivo es que sean los descendientes de los individuos liberados los que logren el control de una plaga determinada. Por lo general, los parasitoides se crían en masa y se liberan muchas veces en regiones bastante distantes de donde fueron recolectados (poblaciones de origen con las que se inician los pie de cría), y finalmente se cruzan con las poblaciones ya existentes en las áreas de liberación (van Lenteren 2003).

Por lo tanto, cuando se evalúan y seleccionan poblaciones geográficas locales de una especie escogida como posible agente de biocontrol, se deben tener en cuenta las variaciones interpoblacionales, ya sea para poder elegir la población con atributos biológicos óptimos, y que se adapte a la región donde deberá actuar, como para prevenir fracasos en el control biológico a causa de la posible incompatibilidad reproductiva entre los organismos liberados y los que se encuentran ya presentes en los agroecosistemas. Esto ayudaría a mejorar la práctica del control biológico aumentativo (Lommen et al. 2017).

Se han señalado varias causas para explicar las fallas en el uso de artrópodos como agentes de biocontrol en el campo, asignadas a la reproducción. Entre ellas, la ocurrencia de depresión por exogamia de la descendencia luego de la fecundación, debido a la interrupción de complejos de genes coadaptados en las poblaciones locales (Luna y Hawkins 2004; Vorsino et al. 2012), o la diferencia de tamaños entre morfos o ecotipos que conduce a que el apareamiento ocurra preferentemente entre individuos de tamaño similar (Crespi 1989), e incluso la presencia de bacterias endosimbióticas, como por ejemplo *Wolbachia*, que

pueden alterar la reproducción sexual de varias maneras, causando distintos tipos de fenotipos reproductivos (Mochiah et al. 2002; Pistone et al. 2014; Bertin et al. 2018). En este último caso, se ha observado que en los himenópteros parasitoides con sistema de determinación de sexo haplodiploide, las poblaciones que no están infectadas con la bacteria tienen individuos hembras y machos a partir de huevos fertilizados y no fertilizados, respectivamente. Cuando en la población hay individuos infectados con *Wolbachia*, ésta altera su sistema de reproducción causando la “diploidización” de huevos haploides por alteración de los procesos meióticos y/o mitóticos, lo que resulta en la producción de sólo hijas hembras de huevos no fertilizados, conocida como partenogénesis telitóquica (Furihata et al. 2015; Werren 2008).

Particularmente para el caso del parasitoide braconídeo *Pseudapanteles dignus*, las poblaciones estudiadas en la región Pampeana (del norte de la provincia de Buenos Aires) han demostrado comportarse como una especie arrenotoca en el laboratorio, con una producción de sexos en la descendencia igualitaria o levemente sesgada hacia las hembras, una característica considerada positiva para un agente de biocontrol (Nieves et al. 2015). Sin embargo, el endosimbionte *Wolbachia* podría estar presente con un bajo título y no manifestarse alguna alteración en la proporción de sexos de la descendencia. Una situación como la descrita ha sido comprobada para *Asobara japonica* Belokobylskij (Hymenoptera: Braconidae), un parasitoide larvo-pupal de moscas drosofilidas, que son capaces de producir machos con una incipiente infección de *Wolbachia*, la cual podría dispersarse en las poblaciones y comenzar a observarse sus efectos una vez que la interacción simbiótica entre la bacteria y el hospedador haya coevolucionado (Reumer et al. 2012).

Existen reportes que indican que *Wolbachia* infecta a varias especies de himenópteros braconídeos de importancia económica. Además de la ya mencionada *A. japonica* (Furihata et al. 2015), se reporta a *Cotesia sesamiae* Cameron, que ataca barrenadores del tallo de gramíneas (Mochiah et al. 2002), y a *Fopius* sp. y *Doryctobracon* sp., parasitoides ovo-larvales de moscas tefritidas, entre otros, alterando la proporción de sexos de la descendencia (Mohammed et al. 2015; Mascarenhas 2016). A su vez, se han caracterizado diferentes cepas de la bacteria en una misma especie de parasitoide. Por otra parte, se han identificado algunas cepas que no inducen anomalías reproductivas en sus hospedadores.

Por lo expuesto, se considera entonces que cuando se pretende implementar un programa de control biológico aumentativo en diferentes regiones con un mismo enemigo natural, es importante determinar varios aspectos. Entre ellos, si es necesario criar colonias del agente con individuos provenientes de cada región por separado, si la intercrusa entre poblaciones es posible y exitosa (deja descendencia fértil) e incluso necesaria para renovar *pooles* genéticos, si hay alguna población local con mejor desempeño que otra como agente de biocontrol y si alguna de las poblaciones presenta algún tipo de infección que modifique su sistema reproductivo.

Pseudapanteles dignus, tiene una proporción de sexos de la descendencia levemente sesgada hacia las hembras, y la capacidad de dejar descendencia macho a pesar de no haber copulado. Por otra parte, su distribución geográfica conocida para la Argentina (según la literatura y lo reportado en el Capítulo 3) se estructura en poblaciones regionales bastante aisladas geográficamente unas de otras y sujetas a diferentes presiones de selección. En base a esto, la hipótesis de trabajo para esta investigación es que los cruzamientos entre las poblaciones locales de *P. dignus* exhibirán cierto grado de incompatibilidad reproductiva, evidenciada por el desvío de la proporción de sexos hacia los machos, características indeseables para un parasitoide como agente de control biológico (van Lenteren 2003).

El objetivo de este capítulo fue determinar la existencia de aislamiento reproductivo entre las diferentes poblaciones locales de *P. dignus* y la población tomada como de referencia, la de la provincia de Buenos Aires. Previamente se indagó sobre la posible infección con *Wolbachia* en las poblaciones, de modo de conocer posibles fuentes de alteración en la reproducción.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1. Identificación de *Wolbachia* en poblaciones locales de *Pseudapanteles dignus*

Individuos hembras y machos de *P. dignus* provenientes de las tres regiones en estudio fueron fijados en etanol 70% y enviados al Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Agronómica IGAEF - CNIA-INTA Castelar para analizar si las poblaciones locales presentaban infección por *Wolbachia*. Para ello, se trabajó en colaboración con la Dra. Silvia Lanzavecchia y la Lic. Claudia Conte, ambas del mencionado laboratorio.

La extracción de ADN fue realizada según el protocolo de Baruffi et al. (1995). En una primera etapa, se realizó la detección de *Wolbachia* en individuos provenientes de Salta y Buenos Aires mediante la utilización de la técnica PCR con la amplificación de fragmentos de genes conservados del genoma de *Wolbachia*: el gen ribosomal 16S rRNA (438 pb) (Werren et al 2000) y wsp (proteína de membrana, 590 -632 pb) (Braig et al. 1998). Como control positivo de infección se utilizó ADN de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) obtenido de la cría del IGAEF, especie de mosca de la fruta infectada con *Wolbachia*.

En una segunda etapa se realizó la detección de *Wolbachia* de la misma manera que en la etapa anterior, pero esta vez con individuos provenientes de las provincias de Río Negro y Buenos Aires y sólo del fragmento del gen ribosomal 16S rRNA. Posteriormente, se realizó la amplificación del fragmento 16S rRNA F/R (603 pb) (Heddi et al. 1999) en individuos y grupos de individuos (*pools*) de las tres poblaciones (Salta, Buenos Aires y Río Negro). Como control positivo de amplificación se utilizó nuevamente ADN extraído de *A. fraterculus*.

4.2.2 Cría de insectos para ensayos de compatibilidad reproductiva de *P. dignus*

Se establecieron colonias de *T. absoluta* y *P. dignus* para cada región con individuos colectados en cada una de ellas, en un bioterio a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 5\% \text{RH}$, 14:10 L:O en el CEPAVE, y utilizando el protocolo descrito en Nieves et al. (2015).

Cría de *Tuta absoluta*: para iniciar el ciclo, las pupas obtenidas de los muestreos descritos en el Capítulo 3 fueron colocadas en pastilleros de acrílico abiertos (10 cm. de diámetro) dentro de la “jaula de oviposición” (Fig. 4.1) hasta la emergencia de los adultos de la polilla. La jaula de oviposición (36 x 36 x 61 cm, Bioquip®) consistía en una estructura plegable de *voile* y vinilo transparente. En su interior, estas jaulas contenían adultos de *T. absoluta* de ambos sexos, plantines de tomate como sustrato de oviposición y trozos de algodón embebidos en solución de miel (85%) para la alimentación de las polillas. Cada 72 h los plantines con presencia de huevos y/o L1 de *T. absoluta* eran reemplazados por nuevos, provenientes del invernáculo experimental del CEPAVE. También se realizaba el recambio de algodones con miel y se introducían nuevas pupas provenientes de la misma colonia.

Los plantines removidos de la jaula de oviposición eran colocados en otra “jaula de cría”, similar a la anterior, pero solamente conteniendo plantines nuevos para permitir la alimentación de los estadios inmaduros (L1, L2, L3) en desarrollo.

Cuando las larvas de la polilla se hallaban en el último estadio (L4), los plantines eran transferidos a la “jaula de pupación”, de igual estructura que las anteriores, con la excepción que contenía un piso de rejilla metálica (con una luz de aproximadamente 3 cm), que permitía que las pupas cayeran desde los folíolos a una bandeja con arena seca estéril, previamente desinfectada en autoclave, ubicada por debajo de la rejilla. Cada 72 h la arena era tamizada para la recuperación de las pupas de la polilla, las cuales eran colocadas dentro de la jaula de oviposición para reiniciar el ciclo.



Figura 4.1. Cría de *Tuta absoluta* en bioterio experimental bajo condiciones controladas: jaula de oviposición

Cría de *Pseudapanteles dignus*: las colonias de *P. dignus* se iniciaron con los cocones obtenidos del material traído del campo, según lo descrito en el Capítulo 3, y colocados individualmente en cajas de acrílico (10 cm. diámetro x 2 cm. de alto) cerradas, con suministro de miel *ad libitum* para alimentación de los adultos al momento de su emergencia. Los parasitoides recién emergidos eran sexados y colocados en parejas (macho-hembra) en cápsulas de plástico (10 cm de diámetro x 2 cm de altura) con miel *ad-libitum* durante 48 h para permitir el apareamiento. Luego, cada hembra se transfería individualmente a la “unidad de cría” (Fig. 4.2), a fin de evitar la interferencia entre hembras en la oviposición, y el superparasitismo. La unidad de cría consistió en un frasco de plástico (750 ml) en cuyo interior se colocaba una traza de miel en la parte superior para la alimentación de la hembra y un recipiente (25 ml) con agua, a modo de “florero”, conteniendo folíolos de tomate infestados por 10-30 larvas de *T. absoluta* extraídas de las colonias correspondientes a cada región. La unidad se cerraba con un rectángulo de *voile* fijado por una goma elástica, con el fin de evitar la fuga de los parasitoides y permitir la aireación de la unidad. Después de 48 h, las hojas con larvas hospedadoras se colocaban en recipientes de plástico sellados (500 ml) con papel de filtro en la parte inferior para absorber la humedad. Las larvas hospedadoras se

alimentaban cada 2 o 3 días con hojas frescas de tomate, hasta la finalización del desarrollo larvario. Una vez que se formaban los capullos de *P. dignus*, se transferían individualmente a cápsulas de plástico con miel esperando la emergencia del adulto.



Figura 4.2. Vistas externa e interna de la unidad de cría de *P. dignus*, conteniendo un “florero” con folíolos de tomate infestados por larvas de *T. absoluta*

4.2.3 Ensayos de intercuza

Se realizaron experimentos de cruzamiento para determinar la compatibilidad reproductiva entre Buenos Aires (BA) y Salta (SA), y entre las poblaciones de BA y Río Negro (RN). Las poblaciones de SA y RN no se pudieron cruzar debido a que las muestras se tomaron en distintos años y las colonias no se pudieron mantener simultáneamente. Se realizaron cuatro tipos diferentes de cruces (tratamientos), con 15 repeticiones cada uno: 1) una hembra de BA × un macho de SA, 2) una hembra de BA × un macho de RN, 3) una hembra de SA × un macho de BA, y 4) una hembra de RN × un macho de BA. Los cruces entre individuos de la misma población (BA × BA, SA × SA y RN × RN) se replicaron 15 veces como controles.

Los ensayos se realizaron seleccionando, al azar, cocones de *P. dignus* (F1)

provenientes de las colonias de cada región, los cuales se colocaron individualmente en cápsulas de plástico con miel hasta la emergencia del adulto. Sólo se utilizaron individuos vírgenes de 24 h de edad en cada tratamiento, y las parejas se aislaron y se mantuvieron durante 48 h en cápsulas de plástico (10 cm de diámetro x 2 cm) para permitir el apareamiento. Luego, las hembras de *P. dignus* se transfirieron individualmente a la misma unidad experimental que se describió para la colonia del parasitoide durante 48 h para la oviposición. Una vez que se obtuvieron los adultos de la progenie (F2), los individuos fueron sexados y contados. El experimento se llevó a cabo en un bioterio a 25 ± 2 ° C, $70 \pm 5\%$ HR, 14:10 L: O.

Teniendo en cuenta que *P. dignus* es una especie arrenotoca (Luna et al. 2007; Nieves et al. 2015), la presencia de descendientes hembra se tomó como evidencia para determinar la compatibilidad reproductiva entre las poblaciones locales. Primero, se estimó la proporción de parejas que dejaron descendencia femenina (PF). Posteriormente, se calculó la proporción de la progenie femenina para cada cruce como:

$$\text{Proporción de hembras} = \frac{n^{\circ} \text{ de hembras emergidas}}{n^{\circ} \text{ de hembras emergidas} + n^{\circ} \text{ de machos emergidos}}$$

Luego, se compararon dichas proporciones con un test de chi cuadrado y test de diferencias de proporciones para todos los pares posibles con un ajuste del p-valor por el método de Sidak para que el nivel de significación global se mantenga en 5%. De esta manera, se pudieron realizar 21 comparaciones múltiples, y el p-valor de cada comparación fue de 0,00244.

La compatibilidad reproductiva (RC) se evaluó mediante el valor promedio de la proporción de hembras en la progenie (MSR) de un cruce interpoblacional con respecto al del de los cruces correspondientes intrapoblacionales (Pinto et al. 1991):

$$RC = \frac{MSR (A_{\text{♀}} \times B_{\text{♂}})}{MSR (A_{\text{♀}} \times A_{\text{♂}})} \times 100 \quad \text{y} \quad RC = \frac{MSR (B_{\text{♀}} \times A_{\text{♂}})}{MSR (B_{\text{♀}} \times B_{\text{♂}})} \times 100$$

Los valores de RC iguales, inferiores o superiores a 100 indican que el cruce interpoblacional produjo la misma, menor o mayor proporción de hembras que el cruce de intrapoblacional, respectivamente.

Para evaluar el grado de aislamiento sexual entre las poblaciones geográficas, se estimaron índices propuestos por Rolán-Alvarez y Caballero (2000), utilizando el programa JMATING (Carvajal-Rodríguez y Rolán-Alvarez 2006). Este programa se basa en la frecuencia de pares de apareamiento (intra e interpopulacionales) que producen progenie femenina con respecto al total de parejas evaluadas.

El I_{PSI} , índice de aislamiento sexual por pareja, presenta la siguiente fórmula (Pérez Figueroa et al. 2008):

$$I_{PSI} = \frac{(PSI_{aa} + PSI_{bb}) - (PSI_{ab} + PSI_{ba})}{(PSI_{aa} + PSI_{ab} + PSI_{ba} + PSI_{bb})}$$

El PSI se define para cada combinación de parejas como el número de parejas observadas de un tipo de cruce dividido el número esperado de parejas para ese cruce. Por ejemplo, para calcular PSI_{ab} :

$$PSI_{ab} = \frac{ab \cdot t}{(aa + ab) \cdot (ab + bb)}$$

Donde aa , ab , ba y bb son el número de parejas observadas para cada población de macho y hembra, y $t = aa + ab + ba + bb$

I_{PSI} puede variar entre -1 a 1, siendo -1 cuando la pareja está formada por individuos de diferentes poblaciones, 0 cuando existe apareamiento aleatorio y 1 cuando los individuos son de la misma población (Bertin et al. 2018; Carvajal-Rodríguez y Rolán-Alvarez 2006; Rolán-Alvarez y Caballero 2000).

Además, se estimó el índice de asimetría (IA_{PSI}), que ayuda a detectar asimetría en el aislamiento sexual, es decir, si el apareamiento ocurre con mayor frecuencia cuando las hembras de la población A están emparejadas con los machos de la población B, que en el cruce recíproco (Arnold et al. 1996). Este índice calcula la asimetría de las desviaciones del apareamiento aleatorio en cruces intra e interpoblación. Por ejemplo, entre la población A y B, este índice sería PSI_{aa} / PSI_{bb} y PSI_{ab} / PSI_{ba} para cruces intra e interpoblaciones, respectivamente. Los

valores varían entre 1 (simetría), y aquellos significativamente diferentes de 1 (asimetría) (Carvajal-Rodríguez y Rolán-Alvarez 2006).

Asimismo, para evaluar la aptitud sexual reproductiva de una población con respecto a otra en los cruces interpoblaciones, se calculó para cada sexo por separado el estimador de productos cruzados W , siendo 1 el valor máximo de referencia (Rolán-Alvarez y Caballero 2000). Por ejemplo:

$$w_{\text{♂}A} = \frac{(aa + ab) \text{♂}B}{\text{♂}A (ba + bb)}$$

Donde aa , ab , ba y bb son el número de parejas observadas para cada población de macho y hembra; y A y B número de machos (o hembras) de la respectiva población.

Por último, para calcular la desviación estándar (D.E.) de I_{PSI} , $I_{\text{A}_{\text{PSI}}}$ y W , así como la probabilidad (p) de rechazar la hipótesis nula ($I_{\text{PSI}}= 0$, $I_{\text{A}_{\text{PSI}}}= 1$, y $W=1$), se utilizó un análisis de *bootstrap* (10.000 iteraciones).

4.3 Resultados

4.3.1 Identificación de *Wolbachia* en poblaciones locales de *Pseudapanteles dignus*

Los estudios realizados para la identificación de *Wolbachia* mediante la amplificación de los fragmentos 16S rRNA (438 pb) (Fig. 4.3) y *wsp* (Fig. 4.4, 4.5 y 4.6) mostraron ser negativos para las tres poblaciones. Sin embargo, el fragmento *Wol* 16S F/R se pudo amplificar en la mayoría de las muestras analizadas de manera individual, para las tres poblaciones de *P. dignus* (Fig. 4.7 y 4.8).

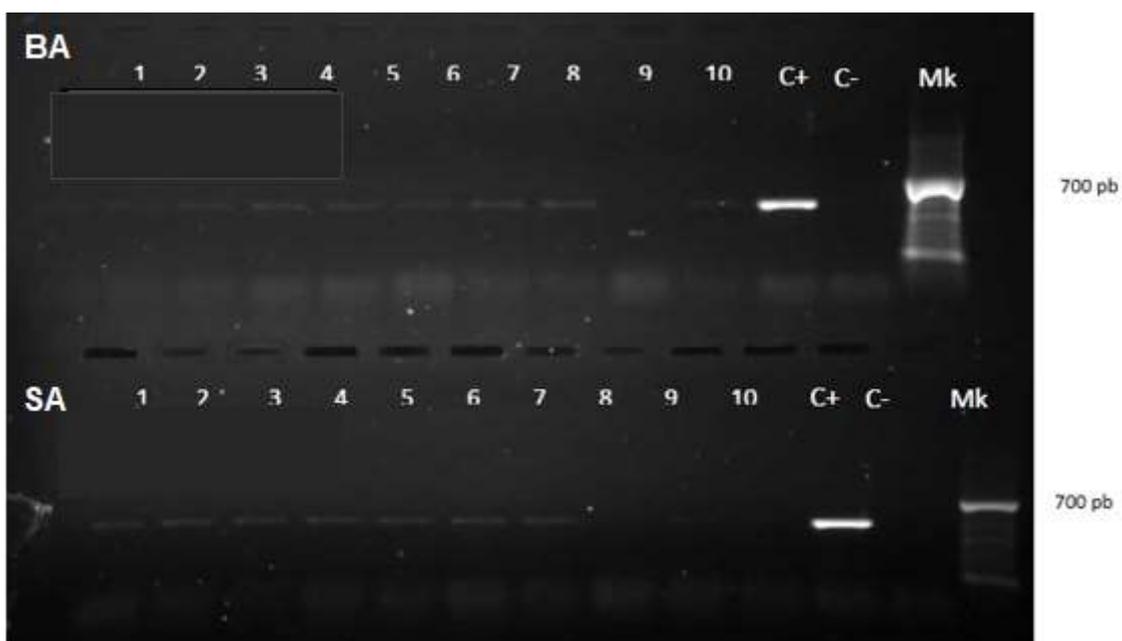


Figura 4.3. Amplificación de fragmentos 16S rRNA en poblaciones de BA y SA; C=controles

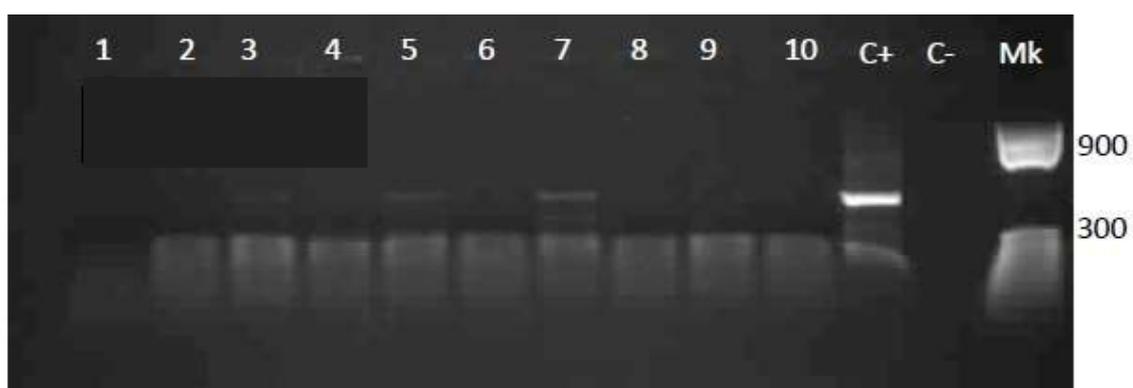


Figura 4.4. Amplificación de fragmentos wsp en población de BA; C=controles

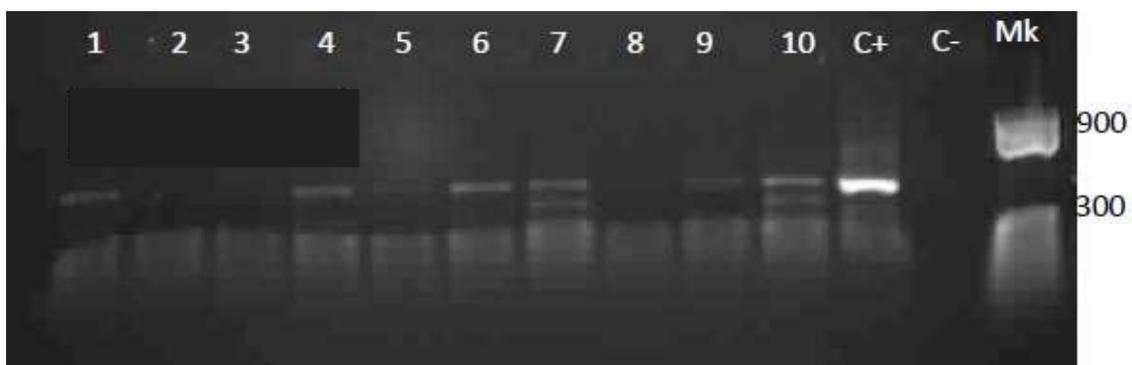


Figura 4.5. Amplificación de fragmentos wsp en población de SA; C=controles



Figura 4.6. Amplificación de fragmentos 16S rRNA en poblaciones de RN y BA (=LP); C=controles

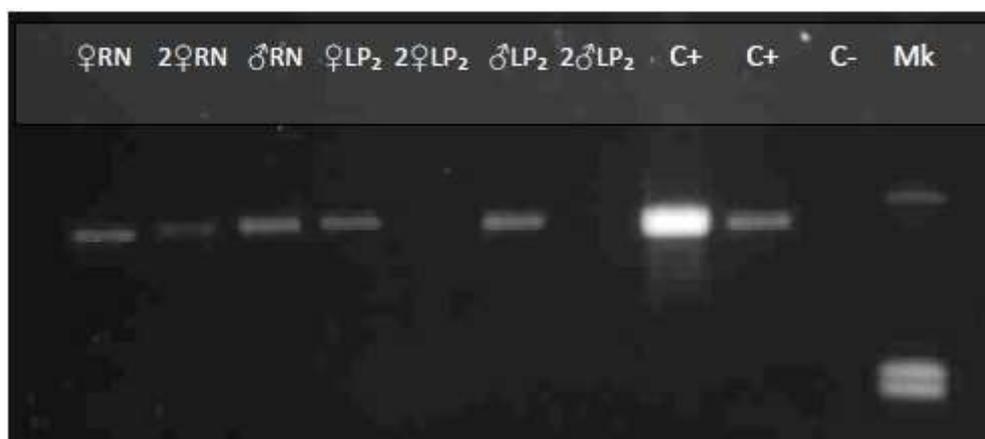


Figura 4.7. Amplificación de 16S rRNA F/R en poblaciones de RN y BA (=LP); C=controles

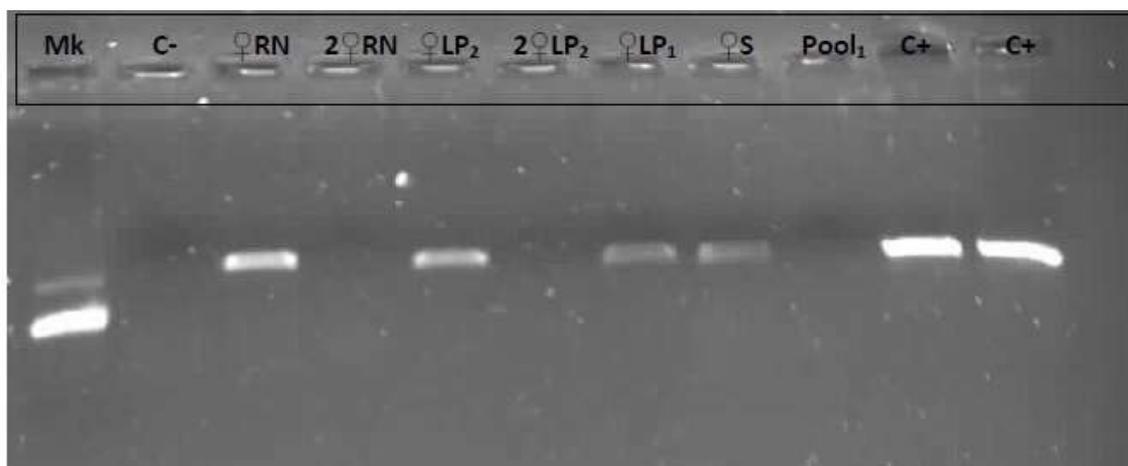


Figura 4.8. Amplificación de 16S rRNA F/R en poblaciones de RN, BA (=LP) y SA (=S)

4.3.2 Ensayos de Intercruza

Los cruces entre poblaciones exhibieron compatibilidad reproductiva, ya que se obtuvo progenie femenina en al menos el 50% de las réplicas de cada uno (Tabla 4.1). Las proporciones de sexos promedio (MSR) para los cruces ♀SA × ♂BA y ♀BA × ♂SA fueron las más bajas ($\approx 0,30$), en comparación con los otros cruces interpoblacionales y con los obtenidos para cada cruzamiento intrapoblacional (Tabla 4.1, Fig. 4.9). En consecuencia, los valores de RC fueron más bajos, lo que indica una compatibilidad reproductiva reducida entre las poblaciones locales de SA y BA. Los mayores valores de RC se registraron para los cruces entre las poblaciones BA y RN, cuando los individuos se probaron en ambas combinaciones recíprocas (>80% de compatibilidad sexual), y fueron bastante similares a sus cruces intrapoblacionales (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Proporciones de parejas que dejaron descendencia femenina (PF), proporciones de sexo promedio (MSR), y porcentajes de compatibilidad relativa (RC) para ensayos de cruzamiento entre tres poblaciones geográficas de *P. dignus* de Argentina

Cruces	PF \pm (E.E.)	MSR (\pm E.E.)	RC (%)
Interpoblacional			
♀ BA \times ♂ RN	0,79 \pm 0,11	0,41 (\pm 0,03)	82
♀ RN \times ♂ BA	0,86 \pm 0,09	0,51 (\pm 0,03)	89
♀ BA \times ♂ SA	0,50 \pm 0,13	0,34 (\pm 0,04)	68
♀ SA \times ♂ BA	0,63 \pm 0,12	0,29 (\pm 0,03)	60
Intrapoblacional			
♀ BA \times ♂ BA	0,80 \pm 0,10	0,50 (\pm 0,02)	
♀ RN \times ♂ RN	0,79 \pm 0,11	0,57 (\pm 0,03)	
♀ SA \times ♂ SA	0,88 \pm 0,08	0,48 (\pm 0,03)	

Poblaciones geográficas: BA, Buenos Aires; SA, Salta; RN, Río Negro. Las leyendas de las variables se explican en el texto.

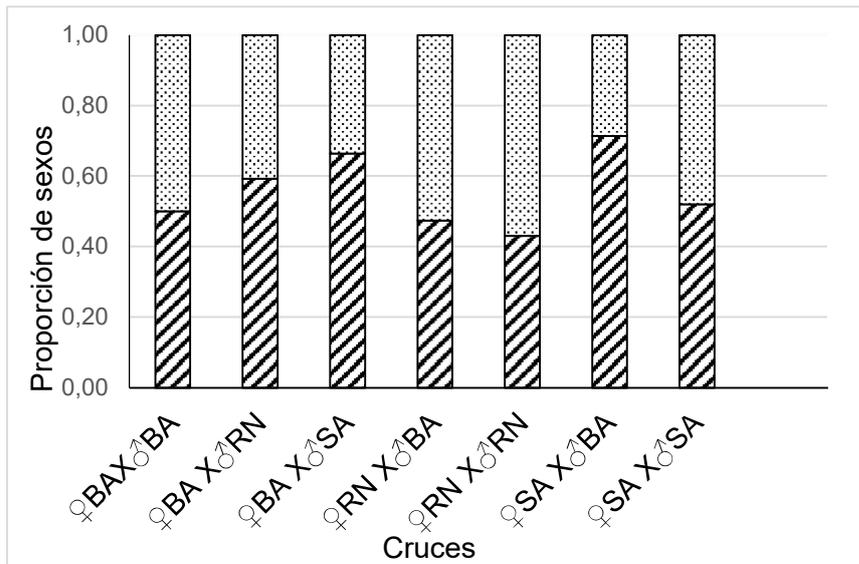


Figura 4.9. Proporción de sexos de cruces intra e interpoblacionales entre tres poblaciones de *P. dignus*: Salta (SA), Buenos Aires y Río Negro (RN). Barras rayadas indican proporción de machos y barras punteadas proporción de hembras

Mediante los análisis estadísticos llevados a cabo se observó que las proporciones de sexo difirieron entre los grupos ($\chi^2 = 49,736$; $gl = 6$; $p < 0,001$). Al realizar las comparaciones de a dos se observó que la proporción de hembras del cruce ♀SA x ♂BA difirió significativamente al ser contrastado con las proporciones obtenidas de los tres cruces intrapoblacionales y con la proporción de hembras obtenida del cruce ♀RN x ♂BA. A su vez, la proporción de hembras del cruce ♀BA x ♂SA difirió significativamente respecto a los cruces ♀RN x ♂RN y ♀RN x ♂BA (Tabla 4.2). Estos resultados concuerdan con las bajas proporciones de hembras obtenidas de los cruces entre SA y BA con respecto al resto de los cruces. El resto de las comparaciones no fueron significativamente diferentes.

Tabla 4.2. Comparaciones de a pares entre proporciones de sexo obtenidas de cruces inter e intrapoblacionales

Cruces		χ^2	G.L.	p-valor
♀ SA × ♂ BA	♀ SA × ♂ SA	19,03	1	<0,0001*
♀ SA × ♂ BA	♀ BA × ♂ BA	19,59	1	<0,0001*
♀ SA × ♂ BA	♀ RN × ♂ RN	33,56	1	<0,0001*
♀ SA × ♂ BA	♀ BA × ♂ SA	0,72	1	0,3976
♀ SA × ♂ BA	♀ RN × ♂ BA	24,72	1	<0,0001*
♀ SA × ♂ BA	♀ BA × ♂ RN	6,11	1	0,0134
♀ BA × ♂ SA	♀ SA × ♂ SA	6,43	1	0,0112
♀ BA × ♂ SA	♀ BA × ♂ BA	7,46	1	0,0063
♀ BA × ♂ SA	♀ RN × ♂ RN	14,16	1	0,0002*
♀ BA × ♂ SA	♀ RN × ♂ BA	11,59	1	0,0007*
♀ BA × ♂ SA	♀ BA × ♂ RN	1,48	1	0,2231
♀ RN × ♂ BA	♀ SA × ♂ SA	3,11	1	0,0780
♀ RN × ♂ BA	♀ BA × ♂ BA	1,35	1	0,2449
♀ RN × ♂ BA	♀ RN × ♂ RN	0,04	1	0,8490
♀ RN × ♂ BA	♀ BA × ♂ RN	5,54	1	0,0186
♀ BA × ♂ RN	♀ SA × ♂ SA	1,41	1	0,2352
♀ BA × ♂ RN	♀ BA × ♂ BA	2,22012	1	0,136222
♀ BA × ♂ RN	♀ RN × ♂ RN	7,05	1	0,0079
♀ BA × ♂ BA	♀ RN × ♂ RN	1,68	1	0,5968
♀ BA × ♂ BA	♀ SA × ♂ SA	0,28	1	0,5968
♀ SA × ♂ SA	♀ RN × ♂ RN	5,22	1	0,0224

*significancia <0,00244

Por otro lado, los índices de aislamiento sexual no mostraron tal fenómeno ni tampoco asimetría en ninguno de los cruces testeados entre las poblaciones locales. El I_{PSI} no fue significativamente diferente de 0, y el IA_{PSI} no fue diferente de 1, lo que indica un apareamiento aleatorio y cruces simétricos entre las poblaciones (Tabla 4.3).

El estimador W mostró que las hembras y los machos de las tres poblaciones

alcanzaron una aptitud sexual alta en todos los cruces analizados. Sin embargo, las hembras BA apareadas con machos SA tuvieron una aptitud ligeramente inferior. De todas maneras, las diferencias entre valores fueron muy pequeñas y ningún valor fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$) (tabla 4.4).

Tabla 4.3. Estimaciones de los coeficientes de aislamiento sexual (I_{PSI}) \pm D.E. e índice de asimetría (IA_{PSI}) \pm D.E. para tres poblaciones geográficas de *P. dignus* de Argentina

Cruce	I_{PSI}	p	IA_{PSI}	p
SA \times BA	0,21 \pm 0,15	0,18	1,07 \pm 0,22	0,79
RN \times BA	-0,02 \pm 0,15	0,89	1 \pm 0,07	0,9

Poblaciones geográficas: BA, Buenos Aires; SA, Salta; RN, Río Negro. Las leyendas variables se explican en el texto.

Tabla 4.4. Estimador de productos cruzados (W) para cada sexo en cruces interpoblacionales entre poblaciones geográficas de *P. dignus*

Población	W ♀	p	W ♂	p
SA	1		0,99 \pm 0,31	0,43
BA	0,91 \pm 0,28	0,33	1	
RN	1		1 \pm 0,31	0,43
BA	1 \pm 0,32	0,45	1	

4.4 Discusión

Los resultados de este estudio indican que la bacteria *Wolbachia* podría estar presente en las poblaciones de *P. dignus*, lo cual plantea a futuro la necesidad de verificar que la amplificación del ADN de la bacteria sea más específica, lo que permitiría a su vez caracterizar su cepa. Además, sería importante analizar si se trata de una infección activa tratando algunos individuos de la población con antibióticos (Espinosa et al. 2017), y evaluar en ese caso si hay cambios en la proporción de sexos, a fin de comprender cómo esta endobacteria afectaría a las poblaciones de *P. dignus*. La presencia de infecciones de *Wolbachia* en *T. absoluta* ha sido hallada en la Argentina por la Dra. Lanzavecchia y la Lic. Conte (comunicación personal). Teniendo esto en cuenta, se puede hipotetizar respecto de una posible infección horizontal entre hospedador y parasitoide. Esta vía de infección ha sido detectada para otros parasitoides como por ejemplo *Elenchus japonicus* Esaki y Hashimoto (Strepsiptera: Elenchidae) (Noda et al. 2001). Considerando que generalmente las proporciones de sexo de *P. dignus* observadas en el laboratorio en la presente investigación fueron siempre cercanas a una relación 1:1, sugiere que las poblaciones analizadas no presentaban una infección activa por *Wolbachia*.

En las especies de himenópteros haplodiploides, como lo es el caso de *P. dignus*, la incompatibilidad en la reproducción entre poblaciones puede dar como resultado una descendencia sesgada hacia los machos (ya que son producidos a partir de huevos no fertilizados), lo cual representa una desventaja cuando se desea realizar una cría masiva para liberaciones aumentativas, puesto que son las hembras las que atacan a los hospedadores, ya sea mediante alimentación (*host-feeding*) u oviposición (Wajnberg et al. 2008). En este estudio, en todos los cruces realizados en el laboratorio se obtuvo progenie femenina en al menos en el 50% de las réplicas.

La hipótesis planteada de que las poblaciones locales de diferentes áreas hortícolas de la Argentina exhiben cierto grado de incompatibilidad reproductiva no puede aceptarse completamente según los resultados de esta investigación. Las poblaciones locales de las provincias de Río Negro (RN) y Buenos Aires (BA), a pesar de presentar diferencias morfológicas como se demostró en el Capítulo

anterior, fueron altamente compatibles. Por el contrario, existió una menor compatibilidad reproductiva entre las poblaciones de Salta (SA) y Buenos Aires (BA), como puede verse en los valores obtenidos del índice RC, también en la proporción disminuida de hembras en la descendencia del cruce entre SA y BA, y las diferencias significativas encontradas al compararlas con los cruces intrapoblacionales. Esto podría sugerir que la separación reproductiva está ocurriendo incipientemente entre estas poblaciones. De todas formas, la compatibilidad reproductiva observada entre las tres poblaciones geográficas de *P. dignus* involucradas en este estudio reafirma que aún pertenecen a una misma entidad taxonómica específica.

Pinto et al. (1991), al estudiar la variación en la compatibilidad reproductiva entre tres especies de *Trichogramma*, plantearon considerar, arbitrariamente, que los cruces resultan parcialmente incompatibles cuando la progenie femenina, en cualquier dirección del cruce interpoblacional, fuera menor a un 75% respecto del cruce intrapoblacional ($RC < 75\%$). En este estudio se obtuvieron resultados tanto mayores como menores al valor establecido por estos autores, lo que indicaría lo mencionado anteriormente: compatibilidad reproductiva entre las poblaciones de BA y RN, e incompatibilidad parcial entre las poblaciones de BA y SA.

En los programas de control biológico, la selección de individuos de una población local específica para la cría en masa de un agente de biocontrol, basada en rasgos de rendimiento reproductivo más altos para una población en particular (es decir, elevada fecundidad de las hembras, una proporción de sexos de la descendencia sesgada hacia las hembras y mayores tasas de parasitismo en el campo, entre otros), puede enfrentar diferentes limitaciones en el momento de liberar individuos a escalas regionales más grandes y, en consecuencia, afectar su eficiencia de control (Hoddle et al. 2015; Sexton et al. 2009; Thomas 2010; Worsham et al. 2017).

Los resultados de este trabajo indicarían que *P. dignus* podría ser criado y liberado en distintas regiones de la Argentina sin necesidad de mantener colonias separadas de las diferentes poblaciones locales. Las colonias podrían establecerse y mantenerse con individuos provenientes de una sola región, o de la cruce de regiones, ya que estos parasitoides serían capaces cruzarse con individuos de la población local. Sin embargo, aún resta evaluar la eficacia a campo de estos parasitoides y el desempeño de la descendencia de los cruces interpoblaciones a

más largo plazo, así como otras combinaciones de cruza. No obstante, los cruces entre las poblaciones SA y BA si bien produjeron descendencia femenina, merecen una reflexión. La baja proporción de hembras con respecto a los machos, y significativamente diferente respecto de los cruces intrapoblacionales, podría limitar en alguna medida el éxito del control si por ejemplo se implementan programas de control de *T. absoluta* con liberaciones de *P. dignus* provenientes de crías de otra región.

La compatibilidad de cruces intraespecíficos se determinó también para otras especies parasitoides seleccionadas como agentes de biocontrol para ser liberados a escalas geográficas muy diferentes, como por ejemplo, *Diadro muscollaris* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), un parasitoide pupal de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) (Liu et al. 2002) y los estudios realizados en *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae), un enemigo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) (Bertin et al. 2018). Se ha demostrado un aislamiento reproductivo completo o parcial entre biotipos para otras especies de parasitoides, como *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae), un parasitoide de áfidos (Takada y Tada 2000); *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae), un parasitoide de *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) (Heimpel et al. 1997); *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de larvas de noctuidos y crambidos (Joyce et al. 2010); *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Braconidae), otro parasitoide de *P. xylostella* (Rincón et al. 2006) y *Spalangia cameroni* Perkins (Hymenoptera: Pteromalidae), un parasitoide pupal de moscas muscoides (Birkemoe et al. 2012).

Capítulo 5

Atributos bioecológicos de poblaciones locales de *Pseudapanteles dignus*

5.1 Introducción

Como ya se mencionó, los parasitoides son los enemigos naturales para los cuales se reporta el mayor éxito en cuanto a las tasas de establecimiento y al control efectivo en programas de control biológico de plagas agrícolas. Su éxito se adjudica a varios factores o atributos, fundamentalmente a que presentan gran especificidad por la especie a controlar, una característica altamente valorada en relación a los artrópodos depredadores que suelen ser más generalistas en cuanto a su alimentación. Esto les otorga alta eficiencia en el campo (Bellows y Van Driesche 1999; van Lenteren 2012).

Así, el estudio de los atributos bioecológicos de una o varias especies de parasitoides (aunque esto se cumple también para otros enemigos naturales, tanto macro como microorganismos) resulta de gran importancia a la hora de identificarlos como potenciales agentes de biocontrol y poder realizar una exhaustiva selección de especies y/o biotipos. Entre los atributos que han sido propuestos como rasgos fundamentales para medir en un agente de biocontrol se encuentran: el tiempo de desarrollo de los estados inmaduros, la fecundidad, la longevidad y la proporción de sexos de la descendencia en adultos, el nivel de parasitismo a campo, la capacidad de competencia con otros enemigos y la dispersión (Smith 1996; Bellows y Fisher 1999; Berryman 1999; van Lenteren 2003).

La estimación de la respuesta funcional, i.e., el comportamiento de parasitización en respuesta a cambios en la densidad del huésped, también resulta un atributo de interés, ya que permite estimar la tasa de ataque, un parámetro que brinda información sobre la capacidad potencial del agente para reducir la densidad de la plaga (Holling 1959; Bellows y Fisher 1999; Berryman 1999; van Lenteren 2003; Yang et al. 2012; Shah y Khan 2013). No obstante, algunos autores consideran que la respuesta funcional no está directamente relacionada con el éxito o falla de un programa de control biológico. Ellos señalan que las tasas intrínsecas de incremento y las interacciones con otros componentes del agroecosistema, sumado a la complejidad del ambiente donde el CB se desarrolla, a las prácticas agrícolas y al NDE, pueden contribuir a que la respuesta funcional sea un débil indicador del éxito del agente de control biológico (Fernández Arhex y Corley 2003).

El término **respuesta funcional** fue originalmente propuesto por Solomon (1949) para describir la relación entre el número de presas u hospedadores atacados por un depredador o parasitoide en función de la densidad de presas u hospedadores, en un intervalo de tiempo (Holling 1959; Hassel 2000).

Se han descrito tres tipos de respuesta, las cuales producen diferentes efectos sobre la dinámica poblacional del hospedador (Holling 1959):

- **Respuesta de tipo I:** el número de hospedadores atacados (N_p) por el parasitoide aumenta linealmente al aumentar la densidad del hospedador (N_0) hasta alcanzar un consumo máximo donde permanece constante. La *tasa de ataque*, también conocida como *eficiencia de búsqueda* (a'), es la proporción de hospedadores atacados por unidad de tiempo (T), y es constante hasta que el consumo alcanza el valor máximo, luego decrece (Fig. 5.1). Esta respuesta es *densoindependiente*, lo que indica que la tasa de ataque no varía con la densidad del hospedador. Se puede expresar mediante la siguiente fórmula:

$$N_p = a' T N_0 \quad (5.1)$$

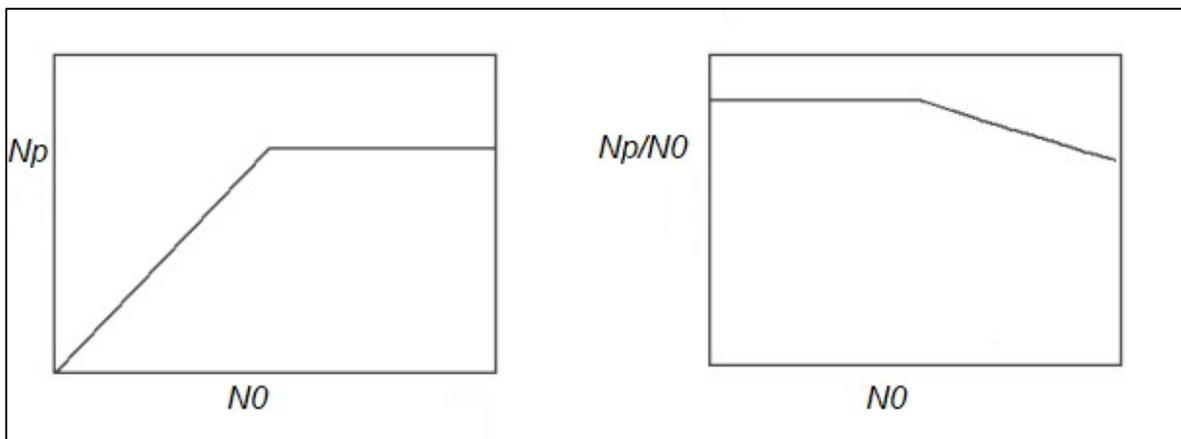


Figura 5.1. Respuesta funcional tipo I según Holling 1959 (adaptado de Juliano 2001): N_p = número de hospedadores atacados por unidad de tiempo; N_0 = densidad del hospedador; N_p / N_0 = proporción de hospedadores atacados por unidad de tiempo

- **Respuesta de tipo II:** el número de hospedadores atacados aumenta en forma curvilínea con la densidad de la presa hasta alcanzar una asíntota. La tasa de consumo disminuye hasta llegar a una plataforma en la que permanece aproximadamente constante. Se observa así, un aumento desacelerado de hospedadores atacados a medida que aumenta la densidad de los mismos (Fig. 5.2). Esto se debe a un parámetro denominado *Tiempo de manipuleo* (T_m), definido como el tiempo dedicado para buscar, dominar y atacar al hospedador, y prepararse para la siguiente búsqueda. Por consiguiente, un T_m prolongado conduce a una baja tasa de ataque y viceversa. Este tipo de respuesta es *densodependiente inversa*; a altas densidades poblacionales del hospedador, estos tendrán menor probabilidad de ser atacados que cuando se encuentran a bajas densidades. La ecuación que representa este tipo de respuesta es la “ecuación de los discos de Holling”:

$$N_p = a' T N_0 / 1 + a' T_m N_0 \quad (5.2)$$

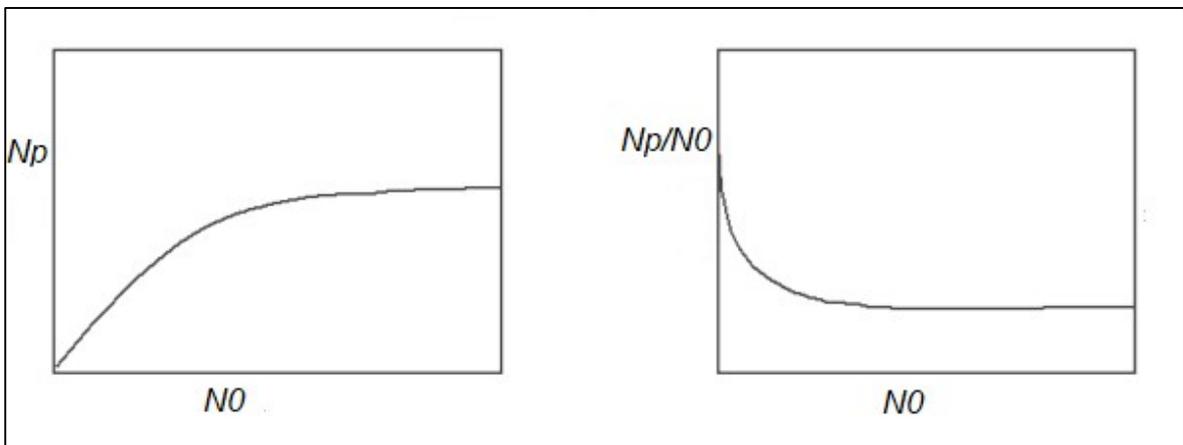


Figura 5.2. Respuesta funcional tipo II según Holling 1959 (adaptado de Juliano 2001): N_p = número de hospedadores atacados por unidad de tiempo; N_0 = densidad del hospedador; N_p / N_0 = proporción de hospedadores atacados por unidad de tiempo

- **Respuesta tipo III:** el ataque de hospedadores sigue una curva sigmoidea. A baja densidad del hospedador la respuesta tiene una fase de aceleración con el aumento de la densidad hasta que el tiempo de manipulación comienza a limitar el número de ataques y alcanza una asíntota.

Inicialmente, a medida que aumenta la densidad del huésped la tasa de ataque se acelera debido a que el parasitoide es más eficiente en su búsqueda o tiene un menor tiempo de manipuleo, actúa de manera densodependiente directa. A partir del punto de inflexión de la curva, a mayores densidades del hospedador, el T_m comienza a limitar el ataque (densodependencia inversa) y tiene un efecto similar a la respuesta de Tipo II (Fig. 5.3). Se puede modelar este tipo de respuesta usando la ecuación 5.2 pero haciendo variar la tasa de ataque (a') en función de la densidad de hospedadores (Hassell 1978):

$$a' = (d + bN_0) / (1 + cN_0) \quad (5.3)$$

Donde: d , b , y c son constantes

Reemplazando 5.3 en la ecuación 5.2, obtenemos la ecuación para una respuesta de tipo III.

$$N_p = (dN_0T + b N_0^2 T) / (1 + cN_0 + dN_0T_m + bN_0^2 T_m) \quad (5.4)$$

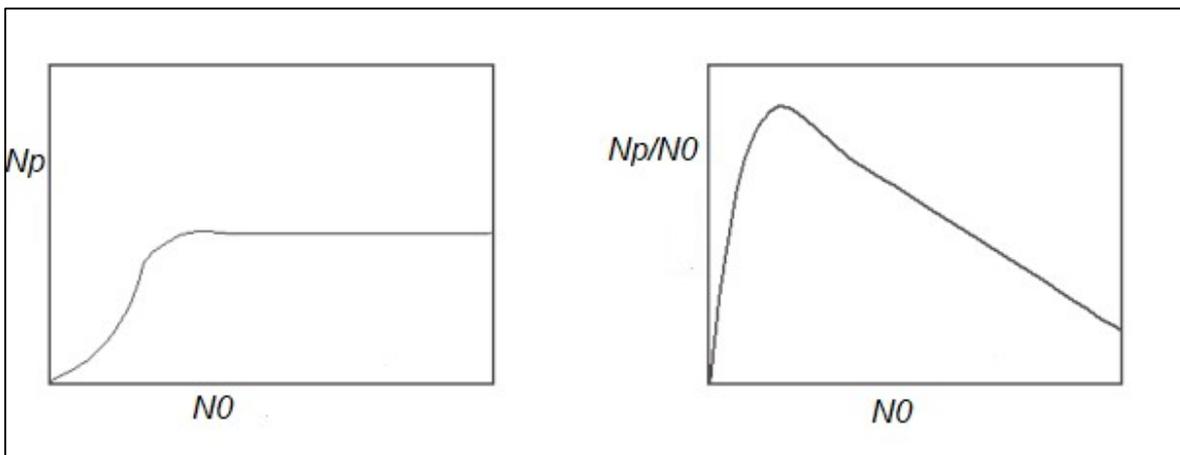


Figura 5.3. Respuesta funcional tipo III según Holling 1959 (adaptado de Juliano 2001): N_p = número de hospedadores atacados por unidad de tiempo; N_0 = densidad del hospedador; N_p / N_0 = proporción de hospedadores atacados por unidad de tiempo

Teniendo en cuenta que el desarrollo de un programa de control biológico eficiente debe involucrar la selección de poblaciones locales o biotipos de parasitoides con una alta eficiencia contra la plaga en un ambiente dado (Kalyebi

et al. 2005), los parámetros de la respuesta funcional resultan de interés para comparar la eficiencia de ataque entre diferentes poblaciones locales de parasitoides (Juliano 2001; van Lenteren 2012b).

El éxito y el establecimiento de cualquier población de insectos depende también de varios factores ambientales como la temperatura y la humedad (van Lenteren et al. 2006). La temperatura es un factor abiótico crítico que influye en la dinámica de los insectos plaga y sus enemigos naturales, por lo que la adaptabilidad a las condiciones climáticas es un punto clave para el éxito de la cría en masa y el establecimiento de parasitoides en los programas de control biológico (Rodríguez et al. 2004). Los insectos son organismos cuya temperatura corporal varía con la temperatura del ambiente, y esto lleva a que varíe su tasa metabólica y en consecuencia muchos aspectos de su biología y ecología. Por ejemplo, la tasa de desarrollo aumenta casi linealmente con la temperatura, sobre el rango normal de temperaturas de acción de la especie (Gilbert y Raworth 1996; Huffaker et al. 1999). En los insectos parasitoides el efecto de la temperatura puede influir sobre la supervivencia, reproducción, crecimiento y desarrollo de sus poblaciones, y por ende ayudan a predecir las interacciones naturales del enemigo con las plagas (Jervis y Copland 1996). Por ello, el conocimiento de las adaptaciones de los insectos a las condiciones climáticas desempeña un papel esencial en el manejo de plagas, específicamente para ayudar a predecir el momento del desarrollo y la reproducción, y seleccionar enemigos naturales que se adapten mejor a las condiciones climáticas imperantes en una región, y también contribuyen a determinar las condiciones adecuadas para la cría masiva del enemigo natural (Nechols et al. 1999; Rodríguez-Saona y Miller 1999). Además, la respuesta a distintas condiciones térmicas puede variar entre poblaciones (Lee y Elliott 1998; Kalyebi et al. 2005), etapas de desarrollo (Honek y Kocourek 1988) y con otros factores ecológicos como la fuente de alimento (Gilbert y Raworth 1996).

A nivel individual, existen en la literatura estudios que muestran que la temperatura afecta el resultado de las interacciones huésped-parasitoide, y que esto tiene consecuencias en el control biológico de plagas. Por ejemplo, Wang y Ferro (1998), Kalyebi et al. (2005), Moezipour et al. (2008), y Khan et al. (2016) demostraron que la temperatura tiene efectos significativos en la respuesta funcional y tasa de ataque de insectos parasitoides; Sigsgaard (2000), Roy et al.

(2002) y Malina y lička (2008) lo comprobaron sobre el tiempo de desarrollo, y Malina y lička (2008) a su vez lo demostraron para el porcentaje de parasitismo.

En resumen, una mayor comprensión de las características de la historia de vida de agentes de biocontrol y su efecto sobre las poblaciones plaga es necesaria para obtener un control de plagas más eficiente y aumentar los beneficios de los agricultores (Plouvier y Wajnberg 2018). Para ello, la selección de un conjunto limitado de criterios que muestran ser óptimos en pruebas de laboratorio para un agente, deberán ser medidos y validados en el campo (van Lenteren et al. 2003).

Por todo lo expuesto anteriormente, en este trabajo de Tesis se abordaron estudios comparativos entre poblaciones geográficas de *P. dignus* para indagar si existen variaciones intraespecíficas según la procedencia de las poblaciones, que puedan aportar un mejor uso de este parasitoide para el control biológico de *T. absoluta* a mayores escalas regionales. De aquí, surgen los siguientes interrogantes: ¿existe variación en los valores de los atributos biológicos y ecológicos del parasitoide que habitan distintas poblaciones locales de las principales zonas productoras de tomate? De existir esa variación ¿se deberá a factores intrínsecos de la población o a factores climáticos (temperatura) propios de la región?

La hipótesis de este capítulo entonces, es que algunas características bioecológicas de *P. dignus* difieren entre poblaciones de distintas regiones de la Argentina. Se espera identificar poblaciones locales de *P. dignus* más adaptadas a las condiciones climáticas de la región de origen, lo que potencialmente las haría más eficientes en el control de *T. absoluta* en tomate.

El objetivo de este estudio fue estimar en el laboratorio, atributos bioecológicos (respuesta funcional y tasa de ataque, tiempo de desarrollo pre-imaginal y proporción de sexos de la descendencia) de individuos de *P. dignus* provenientes de poblaciones de distintas regiones de la Argentina.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1. Colonias de insectos y diseño de ensayos

Las colonias de *T. absoluta* y *P. dignus* se establecieron en el laboratorio de Ecología de Plagas y Control Biológico del CEPAVE, como fue descrito en el Capítulo 4.

Se contó con una colonia de *T. absoluta* por región (Salta, Buenos Aires y Río Negro) en un bioterio a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 5\% \text{RH}$ y 14:10 L:O. En lo que respecta a *P. dignus*, para establecer si las diferencias que pudiesen existir entre las poblaciones de las distintas regiones se deben a factores intrínsecos de la población o a factores climáticos propios de la región, tanto la cría del parasitoide como la determinación de los atributos bioecológicos se realizaron por región y bajo dos condiciones: 1) condición de temperatura (25°C) bajo la cual se estudió previamente la biología de *P. dignus* con individuos provenientes del Cinturón Hortícola Platense (provincia de Buenos Aires), población tomada como de referencia; a su vez, esta condición de temperatura se corresponde con el promedio de temperaturas máximas medias medidas durante los meses de producción de tomate en el Cinturón Hortícola Platense; 2) condiciones correspondientes al promedio de temperaturas máximas medias medidas durante los meses de producción de tomate del lugar de origen de la población en estudio. Todas las condiciones y sus combinaciones se indican en la tabla 5.1.

A los fines de la comparación con la población de referencia (Buenos Aires) los datos de la respuesta funcional, del tiempo de desarrollo pre-imaginal y la proporción de sexos correspondientes a dicha población a 25°C ($70 \pm 5 \text{HR}$ y 14:10 de fotoperiodo) fueron tomados de ensayos llevados a cabo por otros integrantes del laboratorio durante los primeros años de desarrollo de este trabajo de Tesis (D'Auro et al. 2018; Nieves y D'Auro, datos sin publicar).

Tabla 5.1. Condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo para la cría de *P. dignus* y realización de ensayos

	Salta		Bueno Aires		Río Negro	
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	25 ± 1	30 ± 1	28 ± 1	30 ± 1	25 ± 1	28 ± 1
Humedad Relativa (%)	70 ± 5	60 ± 5	65 ± 5	60 ± 5	70 ± 5	65 ± 5
Fotoperiodo (L:O)	14:10	14:10	14:10	14:10	14:10	14:10

5.2.2. Determinación de atributos bioecológicos

Respuesta funcional y tasa de ataque

Para evaluar la respuesta funcional de *P. dignus* por región, adultos parasitoides recién emergidos de la colonia correspondiente (por región y condición de temperatura), se sexaron, emparejaron en cápsulas de plástico (10 cm de diámetro x 2 cm de altura) para permitir la cópula, y se alimentaron con miel *ad libitum* durante 24 h. Transcurrido ese periodo, las hembras fueron transferidas individualmente a unidades experimentales que consistían en vasos plásticos de 750 ml, cubiertos con *voile* (como las descritas en el capítulo 4), los cuales contenían ramilletes de hojas de tomate infestadas con larvas de *T. absoluta* en estadios L2-L3 a distintas densidades: 3, 5, 7, 10, 15, 20 y 30. Para la selección del rango de densidades se siguió a Luna et al. (2007). Cada tratamiento de densidad se replicó al menos 10 veces y duró 24 h. Al final del experimento, las hembras fueron retiradas de la unidad experimental, y las larvas de *T. absoluta* expuestas al ataque (N_0) se criaron para registrar, diariamente, el número de larvas parasitadas (N_p), el cual se obtuvo en base al número de cocones de *P. dignus* formados, verificando de este modo el parasitismo efectivo.

Con los datos obtenidos se calculó la proporción de hospedadores parasitados (N_p/N_0) por *P. dignus* para cada densidad de *T. absoluta* ofrecida (N_0).

La respuesta funcional se analizó por medio de una regresión logística entre una variable dependiente binomial (hospedador parasitado y no parasitado) y una variable independiente (número de hospedadores) (Juliano 2001; Fernández Arhex y Corley 2003; Luna et al. 2007; Romero Sueldo et al. 2010). La regresión permite dilucidar la forma de la curva de la respuesta funcional resultante, i.e., tipo I, II o III (Juliano 2001).

Primero, se realizó el ajuste de los datos a la siguiente ecuación cúbica:

$$N_p/N_0 = \frac{\exp(P_0 + P_1N_0 + P_2N_0^2 + P_3N_0^3)}{1 + \exp(P_0 + P_1N_0 + P_2N_0^2 + P_3N_0^3)}$$

donde P_0 , P_1 , P_2 y P_3 representan la intercepción y los coeficientes lineal, cuadrático y cúbico, respectivamente.

Si los coeficientes P_1 , P_2 y P_3 no son significativos, la respuesta es de tipo I. Si P_2 es significativo y negativo, la respuesta es de Tipo II; y si P_2 es positivo y significativo, y P_3 es negativo y significativo, la respuesta es de Tipo III.

Si los datos no ajustan a una expresión cúbica se continúa con el ajuste a una expresión cuadrática. En ésta, la significancia y el valor del coeficiente lineal y el cuadrático permiten identificar el tipo de respuesta. Finalmente, si la ecuación cuadrática no resultase significativa se realiza el ajuste de los datos a un modelo más simple, usando una ecuación lineal. En este caso, es el valor de P_1 el que nos define el tipo de respuesta. Valores iguales, mayores o menores que cero nos indican que existe densoindependencia (tipo I), densodependencia directa (tipo III) o densodependencia inversa (tipo II), respectivamente. El coeficiente P_0 (intercepto) es la ordenada en el origen y no brinda información relevante (Juliano 2001).

La significancia de los coeficientes de la regresión se estimó mediante el método de máxima verosimilitud, con el estadístico de Wald, y chi-cuadrado utilizando el programa Statistica (Statsoft 2007).

Luego de determinar el tipo de respuesta funcional, se procedió al cálculo de la tasa de ataque o eficiencia de búsqueda (a'), es decir el número de hospedadores parasitados por unidad de tiempo. Este parámetro fue estimado mediante una regresión lineal (Statistica Statsoft 2007), utilizando la fórmula (5.1) $N_p = a' TN_0$, donde: T es el tiempo en que los hospedadores son expuestos al parasitoide (24 h).

Tiempo de desarrollo pre-imaginal y proporción de sexos

Este ensayo se llevó a cabo por región, bajo 2 condiciones de temperatura y humedad para cada una, y se replicó al menos 20 veces para cada región y temperatura.

La unidad experimental usada en este ensayo consistió en un frasco de plástico (750 ml), conteniendo un plantín de tomate infestado con 15-20 larvas de estadio L2-L3 de *T. absoluta*, similar a la ya descrita anteriormente. En ella se colocó una avispa hembra, menor a 48 h de edad, la cual previamente, había sido emparejada con un macho durante 24 h para permitir la cópula. Cada unidad era provista con una traza de miel en la parte superior para alimentación de la avispa. Luego de 24 h, la hembra del parasitoide se retiró de la unidad y las larvas de *T.*

absoluta se mantuvieron dentro de recipientes de plástico sellados (500 ml) con papel de filtro en la parte inferior para absorber la humedad. Las larvas se acondicionaron y alimentaron cada 48 h con hojas de tomate frescas hasta la finalización del desarrollo larvario.

Una vez obtenidos los cocones del parasitoide, se colocaron individualmente en cápsulas de acrílico de 10 cm de diámetro, con miel, rotulados con fecha de oviposición, número de réplica, región y temperatura, y fueron revisados cada 24 h para registrar la fecha de emergencia y sexo del adulto.

Para estimar el tiempo de desarrollo de huevo a imago de ejemplares de *P. dignus* obtenidos en este ensayo, se calculó el número de días desde la fecha de exposición de las larvas de *T. absoluta* al parasitoide (oviposición), hasta la emergencia de las avispas adultas.

Para comparar los valores del tiempo de desarrollo obtenidos para cada región y temperatura, se realizó un ANOVA Welch, con un nivel de significancia del 5%, debido a la falta de homocedasticidad de las varianzas. Al encontrarse diferencias significativas se realizó una prueba *post-hoc* con Test T-Welch con ajuste Benjamini Hochberg para mantener la significación global en 5% (Maxwell et al. 2017). Luego, se incorporó al análisis el factor sexo, y los análisis se realizaron mediante test ANOVA y *post-hoc* mediante pruebas Tukey HSD.

Una vez registrado el número de avispas de cada sexo en la progenie (F1), se procedió a calcular la proporción de hembras por región y temperatura como:

$$\text{Proporción de hembras} = \frac{n^{\circ} \text{ de hembras emergidas}}{n^{\circ} \text{ de hembras emergidas} + n^{\circ} \text{ de machos emergidos}}$$

Primero, se testeó la desviación de la relación 1:1 mediante una prueba de chi-cuadrado ($p < 0,05$). Luego, se compararon las proporciones de hembras intra e interpoblacionalmente según temperaturas. Para ello, se estimaron los odd ratio (OR) y los intervalos de confianza (IC) al 95 %; y se utilizó el test de chi-cuadrado con un nivel de significancia del 5 %.

5.3 Resultados

5.3.1 Respuesta funcional y tasa de ataque

El ajuste al modelo de regresión logística no fue significativo para las expresiones cúbica y cuadrática, mientras que se condijo con una expresión lineal, siendo no significativamente distinto de cero el coeficiente lineal (P_1), indicando una respuesta funcional de Tipo I para las tres poblaciones a las distintas temperaturas (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Resultado de los análisis de regresión logística de la proporción de larvas de *T. absoluta* parasitadas por *P. dignus* en relación al número inicial de hospedadores ofrecidos

Región y T°	Estimado	Estimación	E.E.	X ² (Wald)	p	IC (95%)
SA 25°C N=130	P ₀	-1,85	0,39	22,77	0,000*	-2,61; -1,08
	P ₁	0,004	0,003	2,01	0,16	-0,01; 0,09
RN 25°C N=188	P ₀	2,95	0,94	9,83	0,001*	2,91; 126,46
	P ₁	-0,15	0,09	2,36	0,12	0,70; 1,04
BA 28°C N=150	P ₀	1	0,45	5,03	0,02*	1,12; 6,65
	P ₁	-0,01	0,03	0,22	0,64	0,93; 1,04
RN 28°C N=150	P ₀	1,13	0,45	6,38	0,01*	1,26; 7,55
	P ₁	-0,02	0,03	0,67	0,43	0,93; 1,03
SA 30°C N=75	P ₀	-1,04	0,42	5,98	0,02*	-1,88; 0,19
	P ₁	0,03	0,03	1,08	0,30	-0,03; 0,09
BA 30°C N=141	P ₀	0,58	0,45	1,62	0,20	0,72; 4,42
	P ₁	0,03	0,03	0,69	0,40	0,96; 1,09

* Nivel de significancia <0,05

La respuesta funcional de individuos de *P. dignus* pertenecientes a las distintas regiones y bajo distintas condiciones de temperatura mostró que el número de hospedadores atacados aumentó al incrementar la densidad, sin llegar a una meseta a la densidad de 30 hospedadores. El rango del número de larvas de *T. absoluta* parasitadas por *P. dignus* en un lapso de 24 h fue altamente variable, entre 1 y 22 – 29 a una densidad de 30 hospedadores, dependiendo de la provincia y temperatura (Fig. 5.4).

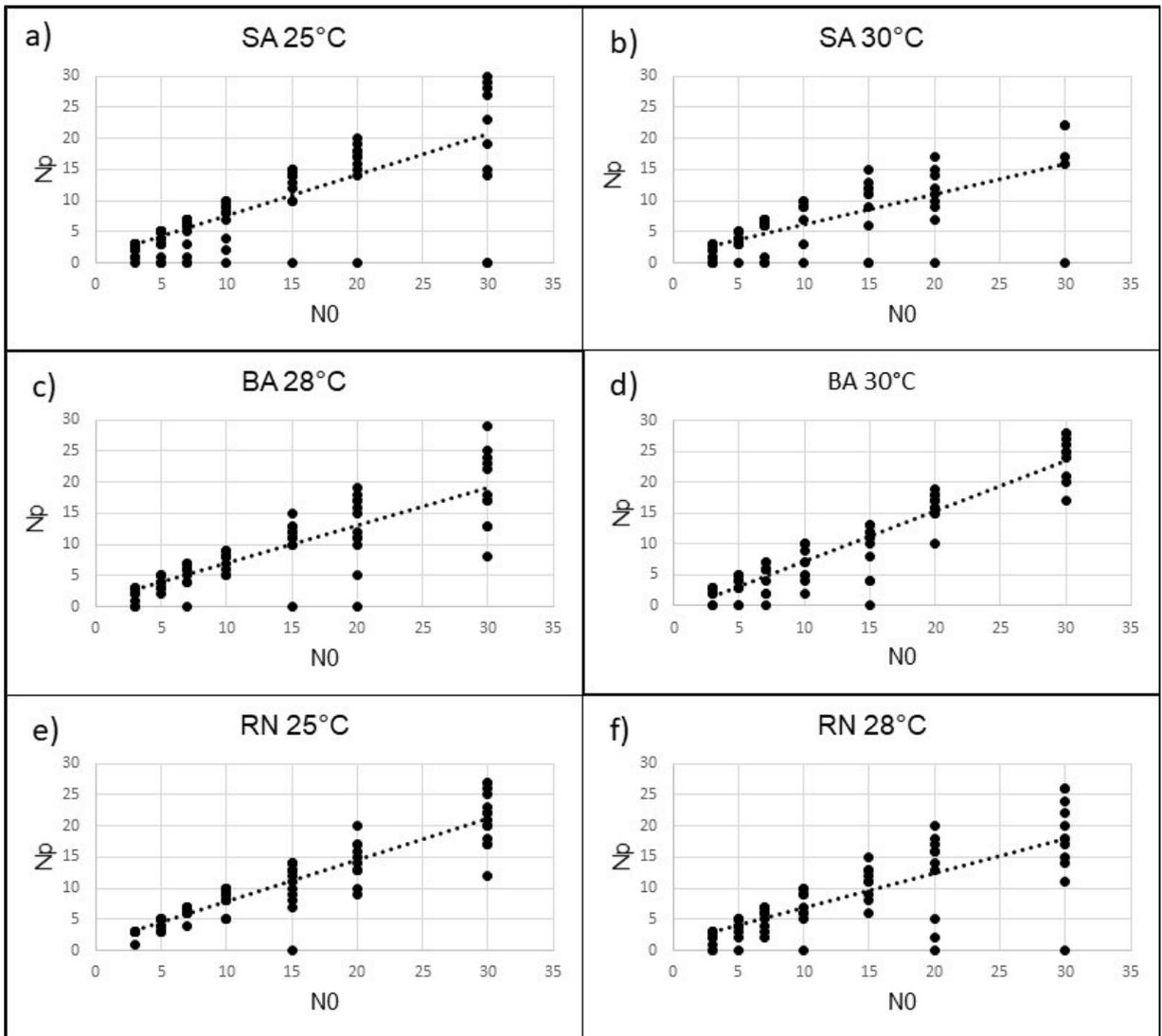


Figura 5.4. Número de larvas de *T. absoluta* parasitadas (N_p) por avispas de *P. dignus* provenientes de tres poblaciones locales de Argentina (Salta=SA, Buenos Aires=BA y Río Negro=RN) a distintas densidades del hospedador (N_0) en un ensayo de 24 h y a distintas temperaturas (25°, 28° y 30°C)

Consecuentemente, la proporción de individuos parasitados fue independiente de la densidad de larvas de *T. absoluta* ofrecidas, y altamente variable (Fig. 5.5).

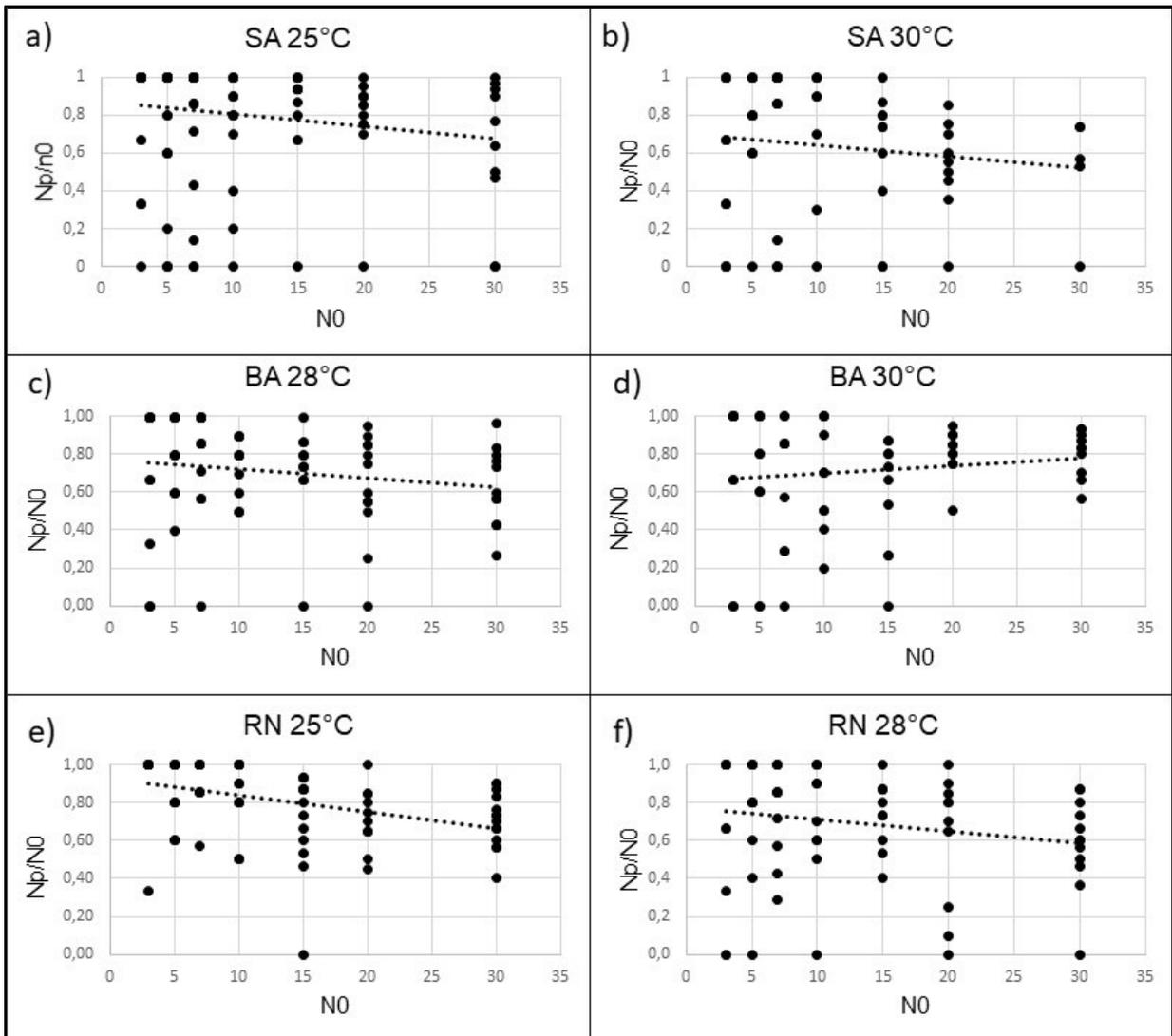


Figura 5.5. Proporción de larvas de *T. absoluta* parasitadas (N_p / N_0) por avispas de *P. dignus* provenientes de tres poblaciones locales de Argentina (Salta=SA, Buenos Aires=BA y Río Negro=RN) a distintas densidades del hospedador (N_0) en un ensayo de 24 h y a distintas temperaturas (25°, 28° y 30°C)

Las tasas de ataque (a') de *P. dignus* calculadas para una respuesta funcional de Tipo I, usando la ecuación 5.1, fueron similares a 25 y 28°C, independientemente de la población (Tabla 5.3.). Por otra parte, a 30°C se observó una disminución de a' en la población de Salta y un aumento en la de la población de Buenos Aires.

Tabla 5.3. Tasa de ataque diaria (a') y parámetros de la regresión lineal de distintas poblaciones locales de *P. dignus*, en ensayos a distintas temperaturas

	$a' \pm E.E.$	F	G.L.	p	R ²
SA 25°C	0,65 ± 0,05	195,38	1,128	<0,0001	0,60
RN 25°C	0,66 ± 0,03	452,76	1,92	<0,0001	0,83
BA 28°C	0,61 ± 0,05	159,33	1,73	<0,0001	0,68
RN 28°C	0,56 ± 0,05	110,95	1,73	<0,0001	0,60
SA 30°C	0,49 ± 0,06	70,55	1,74	<0,0001	0,48
BA 30°C	0,82 ± 0,04	411,61	1,69	<0,0001	0,85

5.3.2 Tiempo de desarrollo pre-imaginal

El tiempo de desarrollo disminuyó con el incremento de la temperatura en todos los sitios y para ambos sexos, presentando los machos menor tiempo de desarrollo que las hembras en todos los casos. La población de Buenos Aires registró el mayor tiempo de desarrollo a las tres temperaturas, en comparación con Río Negro y Salta. A su vez, a 25°C la población de Río Negro fue la que presentó el menor tiempo de desarrollo (Tabla 5.4; Figura 5.6).

Tabla 5.4. Tiempo de desarrollo pre-imaginal de *P. dignus* \pm E.E. (días) por provincia, temperatura y sexo (SA= Salta, BA= Buenos Aires; RN= Río Negro; H= hembras; M=machos)

Provincia - Temperatura	Sexo	Tiempo de desarrollo promedio \pm E.E. (días)	N
SA - 25 °C	M + H	21,6 \pm 0,15	195
	M	20,7 \pm 0,19	98
	H	22,3 \pm 0,20	97
BA - 25°C (€)	M + H	22,2 \pm 0,16	263
	M	21,5 \pm 0,25	106
	H	22,6 \pm 0,18	157
RN - 25°C	M + H	20,6 \pm 0,10	200
	M	20,4 \pm 0,13	100
	H	20,8 \pm 0,15	100
RN - 28°C	M + H	17,2 \pm 0,12	200
	M	16,5 \pm 0,17	100
	H	17,9 \pm 0,18	100
BA - 28°C	M + H	17,4 \pm 0,10	209
	M	17 \pm 0,12	100
	H	17,7 \pm 0,15	109
SA - 30°C	M + H	17,2 \pm 0,14	189
	M	16,9 \pm 0,21	104
	H	17,5 \pm 0,16	85
BA - 30°C	M + H	18 \pm 0,11	208
	M	17,5 \pm 0,15	100
	H	18,3 \pm 0,15	108

(€) Datos tomados de ensayos llevados a cabo por otros integrantes del laboratorio de Ecología de Plagas y Control Biológico (CEPAVE-UNLP) (D'Auro et al. 2018; Nieves y D'Auro, datos sin publicar)

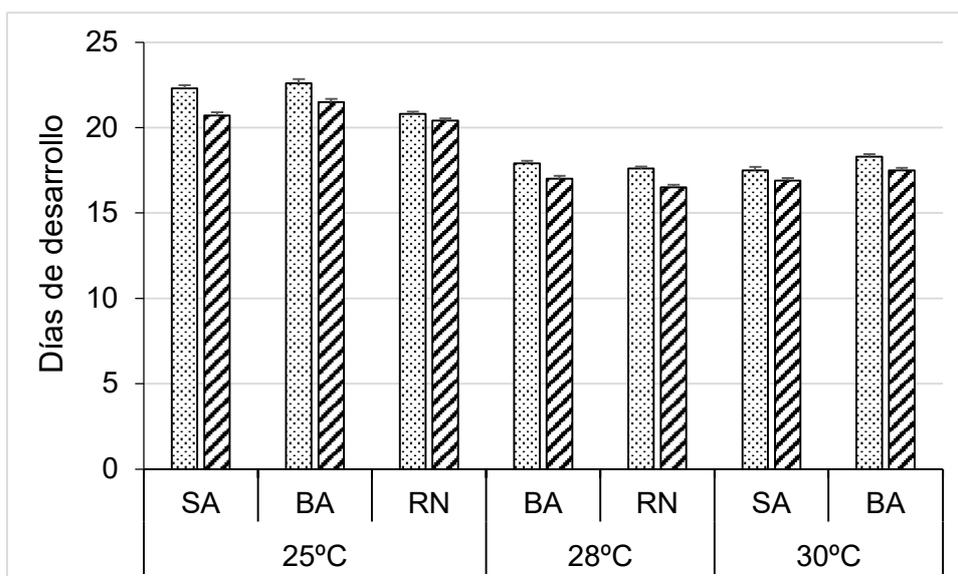


Figura 5.6. Tiempos de desarrollo pre-imaginal, discriminados por sexo, de tres poblaciones locales de *P. dignus* a distintas temperaturas. Las barras punteadas corresponden a las hembras y las barras rayadas a los machos

Las comparaciones estadísticas intra e interpoblaciones de acuerdo a las diferentes temperaturas indicaron que, en el primer caso, las tres provincias difirieron significativamente entre los distintos tratamientos de temperatura (ANOVA Welch: BA 25-30°C $p < 0,001$; BA 25-28°C $p < 0,001$; BA 28-30°C $p < 0,001$; RN 25-28°C $p < 0,001$; SA 25-30°C $p < 0,001$). Un patrón similar se observó para la comparación interpoblacional, donde los tiempos de desarrollo mostraron diferencias significativas al comparar provincias en igual condición de temperatura (ANOVA Welch: BA-RN 25°C $p < 0,001$; BA-SA 25°C $p < 0,001$; BA-SA 30°C $p < 0,001$), con excepción de Buenos y Río Negro a 28°C, que no presentaron diferencias ($p = 0,09$).

Al incluir posteriormente en estas comparaciones la variable sexo, se observó que intrapoblacionalmente, los tiempos de desarrollo fueron significativamente distintos entre hembras a distintas temperaturas ($p < 0,001$) y entre machos a distintas temperaturas; e interpoblacionalmente, se observaron diferencias entre individuos del mismo sexo al comparar la población de RN a 25° con las de SA y BA a 25°C, y las poblaciones de SA y BA a 30°C.

5.3.3 Proporción de sexos

En la tabla 5.5 se muestra la proporción de sexos de cada población local a diferentes temperaturas. Estas proporciones no se desviaron de la relación 1:1 ($p > 0,05$), excepto para el caso de la población de Salta a 30°C, con una marcada disminución de la progenie femenina.

Tabla 5.5. Proporción de hembras (\pm E.E.) por temperatura y provincia de poblaciones locales de *P. dignus*

Temperatura (°C)	Provincia	Media (\pm E.E.)	N	X ²	p
25	SA	0,48 \pm 0,03	39	0,32	0,569
	BA	0,50 \pm 0,02	31	0,002	0,960
	RN	0,57 \pm 0,03	33	2,89	0,089
28	BA	0,51 \pm 0,04 (€)	20	0,067	0,796
	RN	0,50 \pm 0,04	20	0,003	0,958
30	SA	0,29 \pm 0,02	22	40,90	0,000*
	BA	0,54 \pm 0,03	20	1,130	0,288

(€) Datos tomados de ensayos llevados a cabo por otros integrantes del laboratorio de Ecología de Plagas y Control Biológico (CEPAVE-UNLP) (D'Auro et al. 2018; Nieves y D'Auro, datos sin publicar); * nivel de significancia $< 0,05$

La comparación de las proporciones de sexo entre poblaciones y temperaturas (odds ratio obtenidos con respecto a la población de Buenos Aires a 25°C) mostró que a 25° C la proporción de hembras de la población de Salta disminuyó en comparación con las de Buenos Aires y Río Negro 8 y 30%, respectivamente; mientras que la de Río Negro aumentó con respecto a la de Buenos Aires en un 32%. Sin embargo, al aumentar la temperatura, tanto la proporción de hembras de Salta como la de Río Negro se vieron desfavorecidas respecto a la de Buenos Aires, disminuyendo 65 y 4%, respectivamente (tabla 5.6).

Intrapoblacionalmente, tanto en Salta como en Río Negro la proporción de hembras disminuyó con el aumento de temperatura en un 55% y 23% respectivamente. En cambio, en la población de Buenos Aires la proporción de hembras se vio favorecida a temperaturas mayores, aumentando 5% a 28°C y 18% a 30°C, respecto a la proporción de hembras a 25°C (Tabla 5.6).

Al comparar las poblaciones estadísticamente, sólo la población de Salta a 30°C mostró diferencias significativas en su proporción de hembras al ser comparada con la misma población a la condición de 25°C y con la población de Buenos Aires a 30°C. El resto de las comparaciones no resultaron estadísticamente significativas.

Tabla 5.6 Odds ratio (OR), intervalos de confianza (95%) y análisis chi-cuadrado de la proporción de hembras en la descendencia de *P. dignus* entre regiones

	OR	IC	X ²	p
OR (SA:25/BA:25)	0,92	0,66-1,30	0,22	0,641
OR (SA:30/BA:30)	0,35	0,26-0,47	48,05	<0,001*
OR (RN:25/BA:25)	1,32	0,92-1,89	2,28	0,131
OR (RN:28/BA:28)	0,96	0,64-1,44	0,04	0,839
OR (SA:25/RN:25)	0,70	0,52-0,94	5,44	0,02
OR (SA:30/SA:25)	0,45	0,34-0,60	31,05	<0,001*
OR (RN:28/RN:25)	0,77	0,53-1,11	1,98	0,159
OR (BA:28/BA:25)	1,05	0,71-1,57	0,069	0,793
OR (BA:30/BA:25)	1,18	0,83-1,69	0,86	0,354
OR (BA:30/BA:28)	1,12	0,78-1,61	0,38	0,535

*Se considera diferencia significativa cuando el intervalo de confianza no incluye el 1, y el p<0,05

5.4 Discusión

Este trabajo de Tesis reporta por primera vez un estudio comparado de algunos atributos biológicos de distintas poblaciones locales del endoparásitoide larval *P. dignus* de la Argentina, cuando parasita a larvas de *T. absoluta* en el laboratorio bajo distintas condiciones de temperatura y humedad.

En las tres poblaciones estudiadas y a las distintas temperaturas, *P. dignus*, presentó una respuesta funcional de tipo I, lo que implica un parasitismo densoindependiente. Este tipo de respuesta, así como la variación exhibida en la proporción de hospedadores parasitados a las distintas densidades, coincidió con lo hallado por Luna et al. (2007) en tomate y por Salas Gervasio et al. (2018) en berenjena a 25°C para la población de BA. Estos resultados sugieren que *P. dignus*, independientemente del origen de la población y las condiciones a las cuales esté sometida, al menos en laboratorio, presenta un patrón de parasitismo independiente de la densidad de hospedadores.

Una respuesta funcional de tipo I ha sido reportada para varias especies de parasitoides, tales como trichogramátidos y mimáridos parasitoides de huevos (Mills y Lacan 2004; Irvin et al. 2009), el afelínido *Eretmocerus eremicus* Rose y Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide de la mosca blanca (Hoddle et al. 1998) y braconídeos parasitoides de lepidópteros (Hopper y King 1986).

Muchos estudios, basados en modelos teóricos, tradicionalmente, consideraron que sólo una respuesta donde la eficiencia de forrajeo del individuo parasitoide incremente con el aumento de la densidad del hospedador y conduzca a un parasitismo densodependiente directo (respuesta funcional tipo III), constituiría una característica necesaria para que un agente de control biológico resulte efectivo (Hassell y May 1973, 1974; Heads y Lawton 1983). Más recientemente, otros estudios han reportado que la respuesta de tipo III es rara en insectos parasitoides, y que la forma de la curva de respuesta funcional pareciera no estar directamente relacionada con el éxito de un agente de control biológico. Ellos señalan que las tasas intrínsecas de incremento y las interacciones con otros componentes del agroecosistema, sumado a la complejidad del ambiente donde el CB se desarrolla, y a las prácticas agrícolas y el NDE, pueden contribuir, entre otros aspectos, a que la respuesta funcional sea un débil indicador del éxito del agente de control biológico (Fernández Arex y Corley 2003).

Cabe mencionar, que los afelínidos *Eretmocerus eremicus* y *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) son usados a nivel mundial de manera exitosa, mediante liberaciones aumentativas para el control del complejo de mosca blanca, *Bemisia argentifolii* Bellows y Perring (Hemiptera: Aleyrodidae), *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae). El primero de ellos tiene respuesta funcional de tipo I y el segundo de tipo II.

Por otra parte, es interesante destacar que, en condiciones naturales, con mucha mayor complejidad que en el laboratorio, Sánchez et al. (2009) también registraron un parasitismo densoindependiente, pero la hembra de *P. dignus* mostró una respuesta de agregación en los manchones más densos de larvas de *T. absoluta*. Este comportamiento, incrementó la probabilidad de ataque y el riesgo individual de parasitismo para aquellas larvas de la plaga que se encontraban en los manchones más densos. Esta característica es considerada importante, por algunos autores, para estabilizar la interacción parasitoide-hospedador (Hassell 2000) y contribuir a su persistencia (Chesson y Murdoch 1986).

En relación a la tasa de ataque (a'), en todas las poblaciones y a todas las temperaturas testeadas, fueron más altas que las reportadas por Luna et al. (2007) y por Salas Gervasio et al. (2018) para la población de BA. La tendencia a disminuir con temperaturas de 30°C o más, como ocurrió en SA, coincide con lo reportado por Tazerouni et al. (2012) y Khan et al. (2016) para otros braconidos en Irán y China, respectivamente, y por Zamani et al. (2006) para *Aphidius matricariae* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae) parasitoide del áfido del algodón, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae).

La tasa de ataque de *P. dignus* se encuentra dentro del rango estimado para otros parasitoides, a lo cual se suman características positivas para un agente de control biológico (van Lenteren y Manzaroli 1999), tales como tener una tasa intrínseca de incremento ($r= 0,14$) (Nieves et al. 2015) igual a la de *T. absoluta* ($r= 0,14$) (Pereyra y Sánchez 2006), y ser las tasas de ataque calculadas mayores que tasa intrínseca de incremento de su hospedador.

Es escasa la bibliografía que reporta tasas de ataque de parasitoides braconidos. Por ejemplo, *Aphidius gifuensis* Ashmead exhibió su máxima tasa de ataque de $1,32 \pm 0,04$ a 25°C (Khan et al. 2016). En relación a otros parasitoides,

Zamani et al. (2006) estimaron tasas diarias de $0,94 \pm 0,14$ a 30°C y $0,68 \pm 0,15$ a 25°C para *Aphidius colemani* y *A. matricariae*, respectivamente.

Por otro lado, el tiempo de desarrollo pre-imaginal, además de disminuir con el aumento de la temperatura como era de esperar, se observó que los machos se desarrollan más rápido que las hembras, al igual que muchas otras especies de himenópteros que son protándricas (Gauld y Bolton 1988). Los resultados de este estudio indican la existencia de variación interpoblacional, presentando la población de BA, en todos los casos, los tiempos de desarrollo más largos, seguido por SA y luego RN. Conocer la variación interpoblacional en el tiempo de desarrollo y cómo la temperatura afecta la duración de la etapa pre-imaginal, resulta de utilidad a la hora de planificar crías masivas y programas de control biológico aumentativo.

Resultados similares han sido encontrados por otros autores en relación al efecto que tiene la temperatura sobre el desarrollo de parasitoides himenópteros. Por ejemplo, Urbaneja et al. (2002) informaron que *Cirrospilus vittatus* Walker (Hymenoptera: Eulophidae), ectoparasitoide de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), minador de hojas de los cítricos, exhibió tiempos de desarrollo más cortos con el aumento de la temperatura, siendo mayores en las hembras. Krechemer y Foerster (2015) encontraron que el tiempo de desarrollo de tres especies *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), parasitoides de huevos de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) disminuyó con el aumento de la temperatura.

Una proporción de sexos igualitaria o sesgada hacia las hembras se considera un aspecto positivo para un agente de biocontrol. En este trabajo, la proporción de sexos, a excepción de la población de SA, fue de 1:1, tanto en una misma población a distintas temperaturas, como entre poblaciones a igual condición de temperatura. Si bien, varias de estas proporciones exhibieron una leve tendencia hacia una proporción sesgada hacia las hembras, difirieron a lo registrado previamente por Nieves (2013) y por Salas Gervassio et al. (2018), quienes encontraron mayor descendencia femenina para la población de *P. dignus* de BA en ensayos a 25°C , donde se utilizaron plantas de tomate y berenjena.

Rodríguez et al. (2004) por ejemplo, estudiaron la influencia de la temperatura sobre la proporción de sexos de *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae), un parasitoide de *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), y a excepción de la temperatura más baja ensayada (15°), no

encontraron diferencias entre los tratamientos. Qiu et al. (2012) estudiaron el efecto de la temperatura sobre el desarrollo, la supervivencia y la fecundidad de *Microplitis manilae* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide larva de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Si bien estos autores encontraron diferencias significativas para varios de los parámetros estudiados a distintas temperaturas, la proporción de machos y hembras a cada temperatura fue siempre igual.

Las altas temperaturas pueden causar condiciones de estrés para los insectos (Denlinger y Yocum 1998). Por ejemplo, se ha reportado que la exposición a altas temperaturas de la generación parental podría reducir la viabilidad de los espermatozoides o la capacidad de las hembras para fertilizar óvulos, lo que llevaría a la reducción de la proporción de hembras (Bondy y Hunter 2019), como se observó en la población de SA, y levemente en la de RN. Una proporción de sexos sesgada hacia los machos representaría un problema para el control biológico aumentativo, ya que sólo las avispas hembras matan a los huéspedes directamente por oviposición o alimentación (*host-feeding*) o ambas. Por lo tanto, con una población de parasitoides con menor proporción de individuos hembras resultará, con el tiempo, en una disminución o pérdida de su capacidad de controlar a una plaga.

Los resultados de este estudio pueden ser útiles para predecir la eficacia de *P. dignus* en futuros programas de control biológico a nivel regional en la Argentina, principalmente si se desea aplicar esta técnica en invernaderos, donde las temperaturas suelen ser muy altas, mayores a la ambiental (> 30 ° en muchas regiones hortícolas). De todas formas, si bien los parámetros analizados hasta aquí describen aspectos importantes de la ecología y comportamiento de distintas poblaciones de este parasitoide en relación a su hospedador, son todos parámetros medidos bajo distintas condiciones de laboratorio. Por ello, esta información debería ser validada con el análisis de los patrones de parasitismo en condiciones naturales, las cuales son mucho más complejas (Bellows y Fisher 1999).

Consideraciones finales

Esta investigación hace un aporte al conocimiento de la distribución geográfica hasta ahora conocida de la avispa *P. dignus*, parasitoide de la polilla del tomate *Tuta absoluta*, plaga clave del cultivo de tomate en la Argentina. Se pudo confirmar la presencia del parasitoide en tres regiones productoras de tomate muy distantes entre sí, y con características agronómicas y ambientales distintas: Noroeste Argentino (NOA), Región Pampeana y Región Patagónica.

Los porcentajes de parasitismo de *P. dignus* estimados en campos del NOA y la Patagonia (a excepción de un campo) fueron sustancialmente más bajos que los hallados por Sánchez et al. (2009) y Nieves et al. (2015) en predios sin aplicación de plaguicidas, donde los porcentajes variaron entre un 39 y 64%. Se sugiere que el elevado uso de plaguicidas utilizados para la polilla del tomate y otras plagas presentes en el NOA y Patagonia actúan en detrimento de la supervivencia y establecimiento del parasitoide *P. dignus* en los cultivos de Salta y Río Negro, y podría ser la causa fundamental de estas diferencias.

Los estudios morfométricos permitieron ampliar la información respecto a la descripción de esta especie, y establecer diferencias entre poblaciones. Si bien se verificó una variación intraespecífica entre las tres poblaciones locales estudiadas, la misma no fue suficiente como para separar a las poblaciones en tres grupos bien diferenciados respecto a los caracteres estudiados. La población de RN fue la que más se diferenció en relación a sus proporciones morfométricas, y la población de BA mostró tener tamaños mayores.

Desde el punto de vista aplicado, la identificación y optimización de agentes de control biológico eficientes requiere comprender la variación natural de la especie en sus atributos, sobre todo de los rasgos importantes para el control biológico. La eficiencia de ataque de *P. dignus* puede considerarse satisfactoria en comparación con la de otros parasitoides exitosos en el CB, y aunque su respuesta funcional sea densoindependiente, su atributo de agregarse en manchones de mayor densidad de la plaga reportada por otros autores, le confiere, al menos en teoría, la capacidad de dar estabilidad y persistencia a la interacción con la plaga.

El conocimiento generado sobre la existencia de variación interpoblacional en el tiempo de desarrollo, de una proporción de sexos igualitaria o levemente sesgada hacia las hembras, y de compatibilidad

reproductiva entre las poblaciones, resulta de utilidad a la hora de planificar crías masivas y programas de control biológico aumentativo.

Su manipulación para ser usado en futuros programas de control biológico aumentativo contra *T. absoluta*, a una escala regional en la Argentina, se considera factible. Su cría y liberación masiva en las diferentes regiones hortícolas podría usar protocolos que incorporan parasitoides de las tres poblaciones locales, a pesar de su distancia.

En vista de las diferencias intraespecíficas encontradas en los estudios de laboratorio entre las poblaciones locales de *P. dignus*, sería importante complementar este trabajo con estudios genéticos y moleculares que permitan distinguir si dichas poblaciones disyuntas corresponden a distintos biotipos del parasitoide, y si la población con los atributos más ventajosos en el laboratorio, es a su vez, efectiva en el campo.

Como investigaciones futuras se propone profundizar en los siguientes aspectos:

- Evaluar atributos bioecológicos de las poblaciones de *P. dignus* de otras regiones hortícolas de la Argentina (Cuyo y NEA).
- Realizar ensayos de intercrusa entre individuos de las regiones de Cuyo, NOA, NEA y Patagonia.
- Indagar sobre la posibilidad de que las poblaciones locales de *P. dignus* constituyan distintos biotipos, por medio de análisis genéticos y moleculares.
- Continuar con el análisis de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* en las poblaciones locales.
- Evaluar el desempeño en el campo de distintas tasas de liberación de *P. dignus* provenientes de colonias generadas con individuos de las distintas poblaciones locales para el control de *T. absoluta*.

Referencias bibliográficas

- Adams D.C.** (1999) Methods for shape analysis of landmark data from articulated structures. *Evolutionary Ecology Research*, 1:959-970
- Aguirre-Fernández H.** (2009) Revisión taxonómica del género *Meteorus* Haliday, 1835 (Hymenoptera: Braconidae) en Colombia. Tesis de Maestría en Biología. Universidad Nacional de Colombia, 152 pp
- Altieri M.A.** (1992) Biodiversidad, agroecología y manejo de plagas. CETAL (Centro de Estudios de Tecnologías Apropriadas para América Latina y el Caribe). Chile, 162 pp
- Altieri M. A.** (2009) Agroecology, small farms and food sovereignty. *Monthly Review*, 61(3):102-111
- Altieri M.A. y Nicholls C.I.** (2012) Agroecology Scaling Up for Food Sovereignty and Resiliency. En: Lichtfouse E. (eds) *Sustainable Agriculture Reviews*. Sustainable Agriculture Reviews vol 11. Springer, Dordrecht
- Argerich C.** (2011) La importancia del cultivo de tomate en Argentina. Libro de Resúmenes del Taller: La polilla del tomate en la Argentina: Estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. FCNyM, UNLP e INTA, p 4
- Argerich C.** (2017) Asociación Tomate 2000. Programa para el aumento de la competitividad de la industria del tomate. Informe progresos 2016-2017. Cosme A. Argerich (ed.). La Consulta, INTA EEA La Consulta <http://inta.gob.ar/unidades/512000> ISSN 1853-6972.
- Argerich C. y Troilo L.** (2010) Buenas prácticas agrícolas en la cadena de tomate. FAO, INTA. Buenos Aires, Argentina, 258 pp. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/019/i1746s/i1746s> (acceso: diciembre 2018)
- Argerich C. y Gaviola J.C.** (2011) Manual de producción de semillas hortícolas. Tomate. INTA, 81 pp

- Arnold S.J., Verrell P.A., Tilley S.G.** (1996) The evolution of asymmetry in sexual isolation –a model and a test case. *Evolution*, 50:1024-1033
- Arroyo A.R.** (2004) Diagnostico productivo del Departamento de Oran, INTA Orán, 13 pp
- Azidah A.A., Quicke D.L.J** (2000) Identification of the *Diadegma* species (Hymenoptera: Ichneumonidae, Campopleginae) attacking the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bulletin of Entomology Research*, 90:375-389
- Bahamondes L.A. y Mallea A.R.** (1969) Biología en Mendoza de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), especie nueva para la República Argentina. *Rev. Fac. Cs. Agrarias, UNC (Argentina)*, 15:96-104
- Bale J.S., van Lenteren J.C., Bigler F.** (2008) Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363:761-776
- Barrientos Z.R., Apablaza H.J., Norero S.A., Estay, P.P.** (1998) Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ciencia e Investigación Agraria*, 25:133-137
- Baruffi L., Damián G., Guglielmino C.R., Bandis C., Malacrida A.R., Gasperi G.** (1995) Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity*, 74:425-437
- Bassil K.L., Vakil C., Sanborn M., Cole D.C., Kaur J.S., Kerr K.J.** (2007) Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Canadian Family Physician*, 53(10):1704-1711

- Bawin T., Dujeu D., De Baker L., Fauconnier M.L., Lognay G., Delaplace P., Francis F., Verheggen F.J.** (2015) Could alternative solanaceous hosts act as refuges for the tomato leafminer, *Tuta absoluta*? *Arthropod-Plant Interactions*, 9:(4) 425-435
- Baylac M., Villemant C., Simbolotti G.** (2003) Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80: 89-98
- Becerra V.C., Lombardich J., Gonzalez Maldonado D.J.** (1999) *Scrobipalpuoides absoluta* (Meyrick) Povolny Eficiencia de insecticidas en su control. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 31(2):1-6
- Bellows T.S. y Fisher T.W.** (1999) (eds.) Handbook of biological control. Principles and applications of biological control. Academic Press, 1046 pp
- Bellows T.S., y Van Driesche R.G.** (1999) Life table construction and analysis for evaluating biological control agents. In: T. S. Bellows & T. W. Fisher (Eds.). Handbook of Biological Control. Academic Press, San Diego, California, USA
- Benamú M.A., Schneider, M.I., Sánchez N.E.** (2010) Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Aranae: Araneidae), in laboratory. *Chemosphere*, 78: 871-876
- Benitez-Leite S., Macchi M.A., Acosta M.** (2009) Malformaciones congénitas asociadas a agrotóxicos. *Archive Pediatric Drug*, 80: 237–247
- Bennett F.D.** (1995) Parasites of the pepper flower-Bud Mot (Lepidoptera: Gelechiidae) in Florida. *Florida Entomologist*, 78 (3):546-549
- Berns AS.R.** (2014) A geometric morphometric analysis of wing shape variation in monarch butterflies *Danaus plexippus*. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Michigan

- Berryman A.A.** (1999) The theoretical foundations of biological control. 3-21 pp.
En: Theoretical Approaches to Biological Control. Hawkins B.A. y Cornell H.V. (eds). Cambridge University Press, Cambridge
- Berta C.D., Pérez E.C.** (2011) Una alternativa biológica para el control de la “polilla del tomate”. Taller: La polilla del tomate en la Argentina: Estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. FCNyM, UNLP e INTA, p 5
- Bernardos J., Zaccagnini M.E.** (2011) El uso de insecticidas en cultivos agrícolas y su riesgo potencial para las aves en la Región Pampeana. El Hornero, 26(1):55-64
- Bertin A., Pavinato V.A.C., Parra J.R.P.** (2018) Effects of intraspecific hybridization on the fitness of the egg parasitoid *Trichogramma galloi*. BioControl, 63:555–563
- Biondi A., Guedes R.N.C., Wan F.H., Desneux N.** (2018) Ecology, Worldwide Spread, and Management of the Invasive South American Tomato Pinworm, *Tuta absoluta*: Past, Present, and Future. Annual Review of Entomology, 63:239–258
- Birkemoe T., Soleng A., Skovgård H.** (2012) Life history parameters of two geographically separated populations of *Spalangia cameroni*, a microhymenopteran pupal parasitoid of muscoid flies. BioControl, 57(3):375–385
- Blackburn T.M. y Gaston J.K.** (1994) Animal body size distributions: patterns, mechanisms and implication. Tree, 9:471-474
- Bombi Haedo K.** (2016) Regla de Bergmann en ensambles de hormigas: un estudio de ponerineas (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) neotropicales. Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito

parcial para la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas –
Ecología y Biodiversidad

- Bondy E.C. y Hunter M.S.** (2019) Sex ratios in the haplodiploid herbivores, Aleyrodidae and Thysanoptera: A review and tools for study. En: Jurenka R. (eds) *Advances in Insect Physiology*, 56(7)251-281
- Bouzzo C.A.; Pilatti R.A.; Favaro J.C.; Gariglio N.F.** (2003) Cultivo de tomate en invernadero. Alternativas para el control de temperaturas extremas. *Revista Idia XXI*, 4: 137-141
- Botto, E.N.** (1999) Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 58: 58-64
- Botto E.N., Ceriani S.A., López S.N., Saini E.D., Cédola C.V., Segade G., Vizcarret M.** (2000) Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. La experiencia argentina hasta el presente. *RIA INTA*, 29: 83-98
- Braig H.R., Zhou W., Dobson S.L., O'Neill S.L.** (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology*, 180:2373–2378
- Brodeur J.C., Sánchez M., Castro L., Rojas D.E., Cristos D., Damonte M.J., Poliserpi M.B., D'Andrea M.F., Andriulo A.E.** (2017) Accumulation of current-use pesticides, cholinesterase inhibition and reduced body condition in juvenile one-sided livebearer fish (*Jenynsia multidentata*) from the agricultural Pampa region of Argentina. *Chemosphere*, 185:36-46
- Brogliá V., Hernández C., Pocoví M., Gilardón E., Caruso G.** (2011) Protocolo para evaluación de resistencia, medición del grado de ataque de *Tuta absoluta*. Libro de Resúmenes del Taller: La polilla del tomate en la Argentina: Estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. FCNyM, UNLP e INTA, p 6

- Bueno V.H.P., van Lenteren J.C., Lins Jr. J.C., Flavio C., Montes F.C., Calixto A.M., Silva D.B.** (2013) Biological control of *Tuta absoluta*: sampling and evaluation of new hemipteran predators found in Brazil. 4th International Symposium of Biological control of Arthropods, Pucón, Chile
- Cáceres S.** (1992) La polilla del tomate en Corrientes. Biología y control. Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista INTA, 19 p
- Cáceres S.** (2000) La polilla del tomate: Manejo químicocultural. Hoja de Divulgación 15. Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista, INTA, p 5
- Cáceres S., Aguirre A., Miño V., Almonacid R.** (2011) Líneas de trabajo para el manejo integrado de la polilla del tomate en Corrientes. Libro de Resúmenes del Taller: La polilla del tomate en la Argentina: Estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. FCNyM, UNLP e INTA, p 7
- Cagnotti C.L., Viscarret M., Riquelme M.B., López S.N.** (2012) Effects of X-rays on *Tuta absoluta* for use in inherited sterility programmes. Journal of Pest Science, 85: DOI: 10.1007/s10340-012-0455-9
- Cagnotti C.L., Andorno A.V, Hernández C. M., Carabajal Paladino, L.Z., Botto, E.N.; S.N. López.** (2016a) Inherited sterility in *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): pest population suppression and potential for combined use with a generalist predator. Florida Entomologist. 99: 87-94
- Cagnotti, C., Hernández, C.M., Andorno, A.V., Viscarret, M., Riquelme, M.B., Botto, E.; S. N. López.** (2016b) Acceptability and suitability of eggs of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) from irradiated parents to parasitism by *Trichogramma nerudai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Agricultural and Forest Entomology. 18: 198-205

- Carballo González C** (2018) Soberanía alimentaria y desarrollo: caminos y horizontes en Argentina. 1a ed. revisada Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Mónadanomada
- Cardona C. y Oatman E. R.** (1971) Biology of *Apanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae), a primary parasite of the tomato pinworm. *Annals of the Entomological Society of America*, 64: 996-1007
- Carneiro L.S., Aguiar C.M.L., Aguiar W.M., Aniceto E.S., Nunes L.A., Ferreira V.S.** (2019) Morphometric variability among populations of *Euglossa cordata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) from different phytophysiognomies. *Sociobiology* 66(4): 575-581
- Carvajal-Rodríguez A. y Rolan-Alvarez E.** (2006) JMATING: a software for the analysis of sexual selection and sexual isolation effects from mating frequency data. *BMC Evolutionary Biology*, 6 (1):40 DOI: 10.1186/1471-2148-6-40
- Castresana J. y Puhl L.** (2017) Estudio comparativo de diferentes trampas de luz (LEDs) con energía solar para la captura masiva de adultos polilla del tomate *Tuta absoluta* en invernaderos de tomate en la Provincia de Entre Ríos, Argentina. *IDESIA (Chile)*, 35 (4):87-95
- Castro J. E., Favaro J. C., Tapia, C., Aguirre A., Cáceres S., Colombo M., Ishikawa A., Molina N., Obregón V., Pacheco R., Verón R., Miño V.** (2006) I Jornada Regional Hortícola INTA EEA Bella Vista, Publicación Técnica N° 18 ISSN 1515-9299
- Cely L., Cantor F., Rodríguez D.** (2010) Determination of levels of damage caused by different densities of *Tuta absoluta* populations (Lepidoptera: Gelechiidae) under greenhouse conditions. *Agronomía Colombiana*, 28(3):401-411
- Chesson P.L. y Murdoch W.W.** (1986) Aggregation of risk: relationships among host-parasitoid models. *The American Naturalist*, 127: 696-715

- Chesters D., Wang Y., Yu F., Bai M., Zhang T-X., Hu H-Y., Zhu C-D, Li C-D., Zhang Y-Z.** (2012) The integrative taxonomic approach reveals host specific species in an Encyrtid parasitoid species complex PLoS ONE 7(5): e37655. doi:10.1371/journal.pone.0037655
- Chown S. y Gaston K.J.** (2010) Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biological Reviews*, 85: 139–169
- Colmenárez Y., Vásquez C., Corniani N., Franco J.** (2016) Implementation and adoption of integrated pest management approaches in Latin America: Challenges and Potential. In: Gill H K, Goyal G (eds.). *Integrated Pest Management (IPM): Environmentally Sound Pest Management*, 1-18
- Colomo M.V. y D.C. Berta** (1995) Fluctuación de la población de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae) en plantaciones de tomate en el Departamento de Lules, Tucumán. *Acta Zoológica Lilloana*, 43:165-177
- Colomo M.V., Berta D.C., Chocobar M.J.** (2002) El complejo de himenópteros parasitoides que atacan a la “polilla del tomate” *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) en la Argentina. *Acta Zoológica Lilloana* 46: 81–92
- Consoli F.L., Parra J.R.P., Hassan S.A.** (1998) Side- effects of insecticides used in tomato fields on the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym, Trichogrammatidae), a natural enemy of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Applied Entomology*, 122: 43-47
- Costanza R., d'Arge R., de Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., O'Neill R.V., Paruelo J., Raskin R.G., Sutton P., van den Belt M.** (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387:253–260

- Corvo Dolcet S.** (2005) Zonas de producción del cultivo del tomate en la Argentina. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Forestación. Dirección de Agricultura
- Crespi B.J.** (1989) Causes of assortative mating in arthropods. *Animal Behaviour*, 38:980–1000
- Danks H.V. (1994)** Diversity and integration of life-cycle controls in insects. En: Danks H.V. (Ed.) *Insect*, 5-40
- Daly H.V.** (1985) Insect morphometrics. *Annual Review of Entomology* 30:415-438
- D'Auro F., Nieves E.L., Sánchez N.E., Pereyra P.C.** (2018) Estudio de optimización de la cría del parasitoide *Pseudapanteles dignus*, un potencial agente de biocontrol de la polilla del tomate *Tuta absoluta* en Argentina. Libro de resúmenes X Congreso Argentino de Entomología
- Dayrat B.** (2005) Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85:407–415
- DeBach, P.** (1964). *Biological control of insect pests and weeds*. Chapman and Hall. London, U.K
- De Gerónimo E., Aparicio V.C., Bárbaro S., Portocarrero R., Jaime S., Costa, J.L.** (2014) Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, 107:423-431
- De Roos A.J., Blair A., Rusiecki J.A, Hoppin J.A, Svec M., Dosemeci M., Sanfler D.P., Alavanja M.C.** (2005) Cancer. Incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural healthy study. *Environmental Health Perspectives*, 113:49-54.
- de Moraes G.J.** (1987) Importance of Taxonomy in Biological Control. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8 (4-6):841-844

- Denlinger D. y Yocum G.** (1998) Physiology of heat sensitivity. Westview Press, Boulder 7-57
- Dent D.** (1993) Insect Pest Management. CAB International, Wallingford, UK, 604pp
- 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., Urbaneja A.** (2010) Biological invasion of European tomato crops *Tuta absoluta*: ecology, history of invasion and prospects for biological control. Journal of Pest Science, 83:197-215
- Desneux N., Luna M.G., Guillemaud T., 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
- Eilenberg J.** (2006) Concepts and visions of biological control. Pp: 1-11. In: J. Eilenberg y H.M.T. Hokkanen (Eds.). An Ecological and Societal Approach to Biological Control. ISBN: 978-1-4020-4320-8 (Print) 978-1-4020-4401-4 (Online)
- Escalona V.C., Alvarado P.V., Monardes H.M., Urbina C.Z., Martin A.B.** (2009) Manual de Cultivo de Tomate. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile, 60 pp.
- Espinosa M.S., Virla E.G., Cuozzo S.** (2017) *Wolbachia* Infections Responsible for Thelytoky in Dryinid Wasps. The Case of *Gonatopus bonaerensis* Virla (Hymenoptera: Dryinidae). Neotropical Entomology 46:409–413

- Fernández Arhex V. y Corley J.C.** (2003) The functional response of parasitoids and its implications for biological control. *Biocontrol Science and Technology* 13(4):403-413
- Fernández Arhex V. y Corley J.C.** (2004) La respuesta funcional: una revisión y guía experimental. *Ecología Austral*, 14:83-93
- Fernández Lozano J.** (2012) La producción de hortalizas en Argentina: Gerencia de calidad y tecnología. Secretaria de Comercio Interior. Mercado Central de Bs. As.
- Fernández F. y Sharkey M.J.** (2006) Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Sociedad Colombiana de Entomología y UNAL, 894 pp
- Fernandez-Triana J. L., Janzen D. H., Hallwachs W., Whitfield J. B., Smith M. A., Kula R.** 2014. Revision of the genus *Pseudapanteles* (Hymenoptera, Braconidae, Microgastrinae), with emphasis on the species in Area de Conservación Guanacaste, northwestern Costa Rica. *ZooKeys*, 446:1–82
- Ferraris G.** (2015) Regiones Productivas de la Argentina. Curso Introducción a las Ciencias Agrarias y Forestales. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, 86 pp
- Fisher R.A.** (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*, Clarendon Press, Oxford
- Fitton M.G., Shaw M.R., Gauld I.D.** (1988) Pimpline ichneumon-flies (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae). *Handbooks for the identification of British insects*, 7:1-110
- Food and Agriculture Organization (FAO)** – Centro de datos (FAOSTAT) <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (acceso: junio 2019)

Food and Agriculture Organization (FAO) – Glosario de Términos Fitosanitarios (acceso: junio 2019)

Furihata S., Hirata M., Matsumoto H., Hayakawa Y. (2015) Bacteria endosymbiont, *Wolbachia*, promotes parasitism of Parasitoid wasp *Asobara japonica*. PLoS ONE, 10(10): e0140914. doi:10.1371/journal.pone.0140914

García-Barros E. (1999) Implicaciones ecológicas y evolutivas del tamaño de los artrópodos. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa, 26:657-678

Gauld I.D. y Bolton B. (eds) (1996) The Hymenoptera. 332 pp. Oxford, Oxford University Press and The Natural History Museum

Galloway T. y Handy R. (2003) Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. Ecotoxicology, 12(1-4):345-363

García-Barros E. (1999) Implicaciones ecológicas y evolutivas del tamaño de los artrópodos. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa 26: 657-678

Gebiola M., Bernardo U., Ribes A., Gibson G.A.P. (2015) An integrative study of *Necremnus* Thomson (Hymenoptera: Eulophidae) associated with invasive pests in Europe and North America: taxonomic and ecological implications. Zoological Journal of the Linnean Society 173, 352–423.

Ghaderi S., Fathipour Y., Asgari S., Reddy G.V.P. (2019) Economic injury level and crop loss assessment for *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) on different tomato cultivars. Journal of Applied Entomology DOI: 10.1111/jen.12628

Ghajarieh H., Dawah H.A., Bruford M. (2007) Morphometric evidence for three sibling species in *Sycophila mellea* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eurytomidae) in Britain, parasitoids of *Tetramesa* sp. (Hymenoptera:

Chalcidoidea: Eurytomidae) in Poaceae. *Journal of Entomology*, 4(2):82-92

Giganti H., Dapoto G., Gonzalez Junyent R. (1997) Insectos y ácaros asociados a los principales cultivos hortícolas del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. *Horticultura Argentina*, 16(40-41):29-36

Gilardón E., Gorustovich M., Petrinich C., Olsen A., Hernández C., Collavino G., Gray L. (1998) Evaluación del nivel de resistencia de plantas de tomate a la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick) mediante un bioensayo simple. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 103 (2):173-176

Gilbert N. y Raworth D. A. (1996) Insects and temperature, a general theory. *The Canadian Entomologist*, 128:1-13

Gliessman S.R. (1997) *Agroecology: Ecological Processes in Sustainable Agriculture*, CRC Press, 384 pp

Gliessman S.R. (2002): *Agroecología. Procesos ecológicos en agricultura sostenible*. Turrialba, C.R.: CATIE XIII, 359 pp

Gordh G. y Beardsley J.W. (1999) Taxonomy and biological control. En *Handbook of Biological Control*; Bellows, T.S., Fisher, T.W., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA 45–55

Goulet H. y Huber J.T. (Eds) (1993) *Hymenoptera of the World: an identification guide to families*, 668 pp. Ottawa, Agriculture Canada Publications

Greco N.M., Cabrera Walsh G., Luna M.G. (2019) Biological control in Argentina. En: van Lenteren J.C., Bueno V.H.P., Luna M.G., Colmenarez Y.C. (eds). *Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future*. CAB International

- Hajek A.** (2004) *Natural enemies: an introduction to biological control*. Cambridge University Press, Cambridge, UK 378 pp.
- Hartl D.L. y Clark A.G.** (2007) *Principles of population genetics*. 4th ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, MA, USA
- Hassell M.P.** (1978) *The dynamics of arthropod predator-prey systems*. Monographs in Population Biology. May RM (Ed). Princeton, N.J., Princeton University Press, 237 p. ISSN: 0077-0930
- Hassell M.P.** (1982) Patterns of parasitism by insect parasitoids in patchy environments. *Ecological Entomology*, 7:365-377
- Hassell M.P.** (2000) Host- parasitoids population dynamics. *Journal of Animal Ecology*, 69:543-566
- Hassell M.P. y May R.M.** (1973) Stability in insect host parasite models. *Journal of Animal Ecology*, 42:693-726
- Hassell M.P. y May R.M.** (1974) Aggregation in predators and insects parasites and its effect on stability. *Journal of Animal Ecology*, 43:567-594
- Hawkins B.A.** (1994) *Pattern and Process in Host-Parasitoid Interactions*. Cambridge University Press, Cambridge, 56 pp
- Hawkins B.A. y Cornell H.V.** (1994) Maximum Parasitism Rates and Successful Biological control. *Science*, 266(5192):1886
- Heimpel G.E., Antolin M.F., Franqui R.A., Strand M.R.** (1997) Reproductive isolation and genetic variation between two "strains" of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 9:149-156
- Heddi A., Grenier A.M., Khatchadourian C., Charles H., Nardon P.** (1999) Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial,

principal endosymbiont, and *Wolbachia* Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96:6814–6819

- Hoddle M.S., van Driesche R.G., Elkinton J.S., Sanderson J.P.** (1998). Discovery and utilization of *Bemisia argentifolii* patches by *Eretmocerus eremicus* and *Encarsia formosa* (Beltsville strain) in greenhouses. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 15 (1):15-28
- Hoddle M.S., Warner K., Steggall J., Jetter K.M.** (2015) Classical Biological Control of Invasive Legacy Crop Pests: New Technologies Offer Opportunities to Revisit Old Pest. *Problems in Perennial Tree Crops. Insects*, 6:13-37
- Holling C.S.** (1959) Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Canadian Entomology*, 91:385-398.
- Honek A. y Kocourek F.** (1988) Thermal requirements for development of aphidophagous Coccinellidae (Coleoptera), Chrysopidae, Hemerobiidae (Neuroptera), and Syrphidae. *Oecologia*, 76(3):455–460
- Hopper K.R. y King E.G.** (1986) Linear functional response of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) to (Hymenoptera: Braconidae) to variation in *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) density in the field. *Environmental Entomology*, 15 (3):476–480.
- Hopper K.R., Roush R.T., Powell, W.** (1993) Management of genetics of biological-control introductions. *Annual Review of Entomology*, 38:27-51
- Hufbauer R. y Roderick G.** (2005) Microevolution in biological control: mechanisms, patterns, and processes. *Biological Control*, 35:227 -239
- Huffaker C. B.** (1971) *Biological Control*. Plenum Press, New York, U.S.A., 511 pp

Huffaker C.B, Berryman A., Turchin P. (1999) Dynamics and regulation of insect populations, pp. 269-305. En Huffaker C.B. and Gutierrez A.P. (eds). Ecological entomology, 2nd ed. Wiley, New York.

Infoagro.com <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm> (acceso: agosto 2015)

Irvin N., Suarez-Espinoza J., Hoddle M. (2009) Functional response of *Gonatocerus ashmeadi* and the "new association" parasitoid *G. tuberculifemur* attacking eggs of *Homalodisca vitripennis*. Environmental Entomology, 38(6):1634–1641

Jacas J.A. y Urbaneja A. (2008) Control Biológico de Plagas Agrícolas. Pytoma Ed. España, 496 pp

Jervis M.A. y Copland M.J.W. (1996) The life cycle. En "Insect Natural Enemies –Practical Approaches to Their Study and Evaluation", Chapman y Hall, London, 63–161

Jervis M.A., Ellers J., Harvey J.A. (2008) Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. Annual Review of Entomology, 53:361–385

Joyce A.L., Hunt R.E., Vinson S.B., Bernal J.S., Schulthess F., Medin R.F. (2010) Geographic variation in male courtship acoustics and genetic divergence of populations of the *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) species complex. Entomologia Experimentalis et Applicata, 137: 153-164

Juliano S.A. (2001). Nonlinear Curve Fitting. Predation and Functional Response Curves. Pp: 178-197. En: Scheiner S.M y J. Gurevitch (eds) Design and Analysis of Ecological Experiments. Second edition. Oxford. University Press.

- Kalyebi A., Overholtb W.A., Schulthessa F., Muekec J.M., Hassand S.A., Sithanantama S.** (2005) Functional response of six indigenous trichogrammatid egg parasitoids (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Kenya: influence of temperature and relative humidity. *Biological Control*, 32:164–171
- Khan M.A.Z., Liang Q., Maria M.S.M., Liu T.X.** (2016) Effect of temperature on functional response of *Aphidius gifuensis* (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Florida Entomologist*, 99(4):696-702
- Kogan M.** (1998) Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annual Review of Entomology*, 43:243–270
- Kogan M. y Bajwa W.I.** (1999) Integrated pest management: a global reality? *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 28(1): 1-25
- Kraaijeveld A.R., van der Wel N.N.** (1994) Geographical variation in encapsulation ability of *Drosophila melanogaster* larvae and evidence for parasitoid-specific components. *Ecological Entomology*, 19:221-229
- Krechemer F.S. y Foerster L.A.** (2015) Temperature effects on the development and reproduction of three *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species reared on *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs. *Journal of Insect Science* 15(1):90 DOI: 10.1093/jisesa/iev072
- Lee J.H. y Elliott N.C.** (1998) Comparison of developmental responses to temperature in *Aphelinus asychis* (Walker) from two different geographic regions. *Southwestern Entomologist*, 23:77-82
- Lietti M.M., Botto E., Alzogaray R. A.** (2005) Insecticide resistance in argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, 34:113-119

- Liu S.S.F.B., Gebremeskel Z.H. Shi** (2002) Reproductive compatibility and variation in survival and sex ratio between two geographic populations of *Diadromus collaris*, a pupal parasitoid of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *BioControl*, 47:625-643
- Lobos E.** (2011) Uso de las feromonas de *Tuta absoluta* Meyrick, para el monitoreo y la protección del cultivo del tomate. . Libro de Resúmenes del Taller: La polilla del tomate en la Argentina: Estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. FCNyM, UNLP e INTA, p 14
- Lommen S.T.E, de Jong P.W., Pannebakkerlt B.A.** (2017) It is time to bridge the gap between exploring and exploiting: prospects for utilizing intraspecific genetic variation to optimize arthropods for augmentative pest control – a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 162:108–123
- López S.N., Cagnotti, C., Andorno A.** (2011) *Tupiocoris cucurbitaceus*: agente potencial de control biológico de *Tuta absoluta*. Libro de Resúmenes del Taller: La polilla del tomate en la Argentina: Estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. FCNyM, UNLP e INTA, p 28
- López S.N., Arce Rojas F., Villalba Velásquez V., Cagnotti C.** (2012) Biology of *Tupiocoris curcubitaceus* (Hemiptera:Miridae), a predator of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera:Aleyrodidae) in tomato crops in Argentina. *Biocontrol Science and Technology*, 22:1107-1117
- López Lastra C.C. y Lecuona R.** (2019) Micopatología de artrópodos: Hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas. INTA Ediciones; ISSN: 978-987-521-975-5, pp 263
- López Marín L.** (2017) Manual técnico del cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum*) San José, C.R. INTA 126 p. ISBN 978-9968-586-27-6

- Lozano J. F.** (2012) La producción de hortalizas en Argentina (caracterización del sector y zonas de producción). Gerencia de Calidad y Tecnología. Secretaría de comercio interior. Corporación del Mercado Central de Buenos Aires.
- Luft E., Luna M.G., Galise G., Speranza S., Virla E.** (2015) Mortalidad natural de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) en Argentina e Italia, y primera mención de *Encarsia porteri* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae) afectando sus poblaciones. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNCUIYO 47(2): 219-229
- Luna M.G. y Hawkins B.A.** (2004) Effects of inbreeding versus outbreeding in *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera, Pteromalidae). Environmental Entomology, 33:765-775
- Luna M.G., Schneider M.I., Wada V.I.** (2006) Comportamiento de oviposición del endoparásitoide *Pseudoapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae) y encapsulación de larvas por la "polilla del tomate", *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Libro de Resúmenes de la I Reunión Argentina de Parasitoidólogos. Bariloche, Argentina.
- Luna M.G., Sánchez N.E. y Pereyra P.C.** (2007) Parasitism of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) by *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae) under laboratory conditions. *Environmental Entomology*, 36(4):887-893
- Luna M.G., Wada V.I., Sánchez N.E.** (2010) Biology of *Dineulophus phtorimaeae* (Hymenoptera: Eulophidae) and Field Interaction With *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae), Larval Parasitoids of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Tomato. Annual Entomology Society of America 103(6): 936-942
- Luna M.G., Pereyra P.C., Sánchez N.E.** (2012) Biological control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in protected tomato crops in

Argentina. IOBC-WPRS Bulletin, 80:177-182

Luna M.G., Pereyra P.C., Coviella C.E., Nieves E., Savino V., Salas Gervassio N.G., Luft E., Virla E., Sánchez N.E. (2015) Potential of biological control agents against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): current knowledge in Argentina. Florida Entomologist, 98:489-494

Luna M.G., Desneux N., Schneider M.I. (2016) Encapsulation and self-superparasitism of *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae). PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0163196

Mac Lennan P.A., Delzell E., Sathiakumar N., Myers S.L., Cheng H., Grizzle W., Chen V.W., Wu X.C. (2002) Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 44:1048–1058

Malina R. y lička J.P. (2008) Effect of temperature on the developmental rate, longevity and parasitism of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). Plant Protection Science, 44(1):19–24

Marín M.S., Quercetti M.J., Díaz Bruno E.A., Caballero A.E. (2002) *Tuta absoluta* cría en condiciones de laboratorio. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo, 34(2):1-6

Marinho C.F., Cônsoli F.L., Zucchi R.A. (2014) Geometric morphometry and molecular analysis clarified the identity of *Opius* sp. aff. *bellus* (Hymenoptera: Braconidae), a fruit fly parasitoid in Brazil Zootaxa 3760 (3):409-419

Mason W.R.M. (1981) The polyphyletic nature of *Apanteles* Foerster (Hymenoptera: Braconidae): a phylogeny and reclassification of Microgastrinae. Memoirs of the Entomological Society of Canada, Ottawa, Canada, 147 pp

- Mascarenhas R.O., Prezotto L.F., Perondini A.L.P., Marino C.L., Selivon D.** (2016) *Wolbachia* in guilds of *Anastrepha* fruit flies (Tephritidae) and parasitoid wasps (Braconidae) Genetics and Molecular Biology 39(4):600-610
- Maxwell S.E., Delaney H.D., Kelley K.** (2017) Designing experiments and analyzing data: a model comparison perspective. New York, Routledge, Third Edition, 1080 pp.
- Menéndez-Helman R.J., Ferreyroa G.V., dos Santos Afonso M., Salibián A.** (2015) Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 111:236-241
- Mills N.J.** (1994) Parasitoid guilds: defining the structure of the parasitoid communities of endopterygote insect hosts. Environmental Entomology, 23:1066-1083
- Mills N.J. y Lacan I.** (2004) Ratio dependence in the functional response of insect parasitoids: evidence from *Trichogramma minutum* foraging for eggs in small host patches. Ecological Entomology, 29(2):208–216
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación.**
Mercados Agropecuarios
https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/hortalizas/index.php (acceso: agosto 2015)
- Mochiah M.B., Ngi-Song A.J., Overholt W.A., Stouthamer R.** (2002) *Wolbachia* infection in *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) causes cytoplasmic incompatibility: implications for biological control. Biological Control, 25:74–80
- Mohammed M.A., Zuki A.A., Yusof S., Yaakop S.** (2015) Isolation and characterization of *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) from

several economic importance parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 5(4):256-263

Moezipour M., Kafil M., Allahyari H. (2008) Functional response of *Trichogramma brassicae* at different temperatures and relative humidities. Bulletin of Insectology, 61:245–250

Morrone J.J. (2016) Biogeografía de América Latina y el Caribe. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol. 3. Zaragoza 148 pp

Muesebeck C.F.W. (1938) Three new reared species of *Apanteles* from California (Hymenoptera: Braconidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington, 40(7):201-204

Mutanen M. y Pretorius E. (2007) Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. Systematic Entomology, 32:371–386

Nechols J.R., Tauber M.J., Tauber C.A., Masaki S. (1999) Adaptations to hazardous seasonal conditions: dormancy, migration, and polyphenism, pp. 159-200. En Huffaker C. B. y Gutierrez A. P. (eds). Ecological entomology, 2da ed. Wiley, New York

Nievas W. y de Placido S. (2012) La planificación estratégica en el Valle Medio del río Negro. Una experiencia de participación con productores y técnicos. Estrategias y experiencias para el trabajo en extensión. I NTA – EEA Alto Valle AER Valle Medio

Nieves E. (2013) Evaluación del parasitoide, *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera, Braconidae) como agente de control biológico de la “polilla del tomate”, *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae). Tesis doctoral presentada. FCNyM-UNLP

- Nieves E., Pereyra P.C., Luna M.G., Medone P., Sánchez N.E.** (2015) Laboratory population parameters and field impact of the larval endoparasitoid *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae) on its host *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato crops in Argentina. *Journal of Economic Entomology*, 108:1553-1559
- Noda H., Miyoshi T., Zhang Q., Watanabe K., Deng K. Hoshizak S.** (2001) *Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasite (Strepsiptera: Elenchidae): a probable case of interspecies transmission. *Molecular Ecology* 10:2101–2106
- Noyes J.S.** (1990) Chalcid parasitoids. En: Rosen D (ed) *The armored scale insects. Their biology, natural enemies and control.* World Crop Pests 4B. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York and Tokyo, pp 247-262
- Oatman E.R. y Platner G.R.** (1989) Parasites of the potato tuberworm, tomato pinworm, and other closely related gelechiids. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 29: 23-30
- Olson D., Takasu K., Lewis W.J.** (2004) Food needs of adult parasitoids: Behavioral adaptations and consequences. En *Plant-Provided Food for Carnivorous Insects: A Protective Mutualism and its Applications* Cambridge University, 137-147 DOI: 10.1017/CBO9780511542220.006
- Organization for Biological Control (IOBC)** <http://www.iobc-global.org> (acceso: junio 2019)
- Pacala S.W. y Hassell M.P.** (1991) The persistence of host-parasitoid associations in patchy environments. II. Evaluation of field data. *American Naturalist*, 138:584-605
- Paganelli A., Gnazzo V., Acosta. H, López S.L., Carrasco A.R.** (2010) Glyphosatebased herbicides produce teratogenic effects on vertebrate by

impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23:1586-1595

Pante E., Schoelinck C., Puillandre N. (2014) From integrative taxonomy to species description: one step beyond. *Systematic Biology* 64(1):152–160

Parodi L. (1964) *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Ed ACME. Vol. 1 (Tomo I y II) y Vol. 2. Buenos Aires. Argentina, 1160 pp.

Pedigo L.P., Hutchins S.H., Higley L.G. (1986) Economic injury levels in Theory and practice. *Annual Review of Entomology*, 31:341-368

Pereyra P.C. (2002) Evidencia de la competencia intraespecífica en estadios larvales tempranos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ecología Austral*, 12:143-148

Pereyra P.C. y Sánchez, N.E. (2006) Effect of two solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, 35:671–676

Pérez J., Hurtado G., Aparicio V., Argueta Q., Larín M. (2002) *Guía Técnica: cultivo de Tomate*. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. El Salvador, 48 pp

Pérez Consuegra N. (2004) *Manejo Ecológico de Plagas*. CEDAR. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. ISBN: 959-246- 083-3. 292 pp

Pérez Figueroa A., de Uña-Alvarez J., Conde-Padín P., Rolán-Alvarez E. (2008) Comparison of two methods for analyzing the biological factors contributing to assortative mating or sexual isolation. *Evolutionary Ecology Research*, 10:1201–1216

- Phillips C.B., Baird D.B., Iline I.I., McNeill M.R., Proffitt J.R., Goldson S.L., Kean J.M.** (2008) East meets west: Adaptive evolution of an insect introduced for biological control. *Journal of Applied Ecology*, 45:948–956
- Pinto J.D., Stouthamer R., Platner G.R., Oatman E.R.** (1991) Variation in reproductive compatibility in *Trichogramma* and its taxonomic significance (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 84:37–46
- Pistone D., Bione A., Epis S., Pajoro M., Gaiarsa S., Bandi C., Sassera D.** (2014) Presence of Wolbachia in Three Hymenopteran Species: *Diprion pini* (Hymenoptera: Diprionidae), *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae), and *Dahlbominus fuscipennis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Journal of Insect Science* 14(147) DOI: 10.1093/jisesa/ieu009
- Plouvier W.N. y Wajnberg E.** (2018) Improving the efficiency of augmentative biological control with arthropod natural enemies: A modeling approach. *Biological Control*, 125:121–130
- Polack L.A., Saini E. y García Sampedro C.** (2002) Guía de monitoreo y reconocimiento de plagas y enemigos naturales de tomate y pimiento. *Boletín de Divulgación Técnica* n° 13 INTA
- Polack L.A.** (2008) Interacciones tritróficas involucradas en el control de plagas de cultivos hortícolas. *Disertación de Tesis Doctoral FCNyM, UNLP.*
- Polack L.A.** (2011) Modelo fenológico. Perspectivas de uso para el monitoreo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae). Libro de Resúmenes del Taller: La polilla del tomate en la Argentina: Estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. FCNyM, UNLP e INTA, p 22
- Ponti L., Gutierrez A.P., Altieri M.A.** (2015) Holistic approach in invasive species research: The case of the tomato leaf miner in the mediterranean

basin. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 39:436-468

- Povolny D.** (1994) Gnorimoschemini of southern South America VI: Identification keys, checklist of Neotropical taxa and general considerations (Insecta, Lepidoptera, Gelechiidae). *Steenstrupia*, 20:1-42
- Puch L.** (2011) Presencia de *Pseudapanteles dignus* (Mues) en larvas de polilla de tomate (*Tuta absoluta*) en la localidad de Yuto, provincia de Jujuy Libro de Resúmenes del Taller: La polilla del tomate en la Argentina: Estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. FCNyM, UNLP e INTA, p 23
- Quicke D.L.J.** (1997) *Parasitic Wasps*. Chapman y Hall, London, 470 pp
- R Core Team** (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Radcliffe E.B, Hutchison W.D., Cancelado R.E.** (eds.) (2009) *Integrated pest management: concepts, tactics, strategies and case studies*. Cambridge University Press
- Relyea R.** (2005) The lethal impact of roundup on aquatic and Terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15(4):1118–1124
- Reumer B.M., van Alphen J.J.M., Kraaijeveld K.** (2012) Occasional males in parthenogenetic populations of *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae): low Wolbachia titer or incomplete coadaptation? *Heredity*, 108:341–346
- Ricklefs R.E. y Miles D.B.** (1994) Ecological and Evolutionary Inferences from Morphology: An Ecological Perspective. In *Ecological Morphology: Integrative Organismal Biology*, Wainwright P.C. and Reilly S.M (Eds), 13–41. Chicago: University of Chicago Press.

- Rincón C., Bordat D., Löhr B., Dupas S.** (2006) Reproductive isolation and differentiation between five populations of *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoid of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Biological Control*, 36:171-182
- Rodríguez S.M.M., Bueno V.H.P., Sampaio M.V., Soglia M.C.M.** (2004) Influência da temperatura no desenvolvimento e parasitismo de *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae) em *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) *Neotropical Entomology*, 33(3):341-346
- Rodríguez-Saona C. y Miller J.C.** (1999) Temperature-Dependent Effects on Development, Mortality, and Growth of *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology*, 28(3):518-522
- Rodríguez Rodríguez R., Tabares Rodríguez J.M. Medina San Juan J.A.** (1989) *Cultivo Moderno del Tomate*. Ediciones Paraninfo S.A, Madrid, España, 255 pp
- Rodríguez-Zabala J., González R., Correa M.M., Gómez G.F.** (2016) Análisis morfométrico de dos poblaciones de *Anopheles (Anopheles) calderoni* (Diptera: Culicidae) del suroccidente colombiano. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87:966–971
- Rohlf F.J. y Marcus L.F.** (1993) A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*, 39:40-59
- Rolán-Alvarez E. y Caballero A.** (2000) Estimating sexual selection and sexual isolation effects from mating frequencies. *Evolution*, 54:30-36
- Rojas P.S.** (1981) Control de la polilla del tomate: enemigos naturales y patógenos. *IPA-La Platina (Chile)*, 8: 18-20

- Romero Sueldo M.R., Bruzzone O.A., Virla E.G.** (2010) Characterization of the earwig, *Doru lineare*, as a predator of larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: A functional response study. *Journal of Insect Science* 10: 38 doi: 10.1673/031.010.3801. Available online: <http://www.insectscience.org/10.38/>
- Root R.B.** (1973) Organization of a plant-arthropod association in simple and diverse habitats: the fauna of collards (*Brassica oleracea*). *Ecological Monographs*, 43:95–124
- Roy M., Brodeur J., Cloutier C.** (2002) Relationship between temperature and developmental rate of *Stethorus punctillum* (Coleoptera: Coccinellidae) and its prey *Tetranychus mcdanieli* (Acarina: Tetranychidae). *Environmental Entomology*, 31(1): 177-187
- Ruisánchez Ortega Y.** (2013) La palomilla del tomate (*Tuta absoluta*): una plaga que se debe conocer en Cuba. *Fitosanidad*, 17:171-181
- Salas Gervassio N.G., Luna M.G., Lee S., Salvo A., Sánchez N.E.** (2016) Trophic web associated with the South American tomato moth *Tuta absoluta*: implications for its conservation biological control in Argentina. *Agricultural and Forest Entomology*, 18:137–144
- Salas Gervassio N.G., Luna M.G., D'Auro F., Sánchez N.E.** (2018) Performance of *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae), a Natural Enemy of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Eggplant. *Journal of Economic Entomology*, 111(2):528-532
- Salas Gervassio N.G., Luna M.G., Minardi G.M., Sánchez N.E.** (2019a) Assessing inoculative releases of *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae) for the biological control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Crop Protection* doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.05.024>

- Salas Gervasio N.G., Aquino D.D., Vallina C., Biondi A., Luna M.G.** (2019b) A re-examination of *Tuta absoluta* parasitoids in South America for optimized biological control. *J Pest Sci* <https://doi.org/10.1007/s10340-018-01078-1>
- Salgado-Negret B., Paz H.** (2015) Escalando de los rasgos funcionales a procesos poblacionales, comunitarios y ecosistémicos. En: Salgado-Negret, B. (ed). La ecología funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. Colombia, 236 pp
- Sarandón S.J., Flores C.C.** (2014) Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP)
- Sánchez N.E., Pereyra P.C., Luna M.G.** (2009) Spatial patterns of parasitism of the solitary parasitoid *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae) on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environmental Entomology*, 38:365-374
- Sánchez N.E.** (2012) Modelo actual de desarrollo agrícola de la Argentina. En: Carrasco, A.E., N.E. Sánchez, y L.E. Tamagno. Modelo agrícola e impacto socio-ambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios. Serie de libros electrónicos Sociedad y Ambiente: reflexiones para una nueva América Latina. Comité de Medio Ambiente de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo, 135 pp. ISSN 2314-1743
- Santadino M., Coviella C., Momo F.** (2014) Glyphosate sublethal effects on the population dynamics of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). *Water, Air and Soil Pollution*, 225: 2207
- Savino V.** (2014) Biología reproductiva del ectoparasitoide *Dineulophus phthorimaeae* De Santis y su interacción con el endoparasitoide

Pseudapanteles dignus (Muesebeck). Implicancias para el control biológico de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). Trabajo de tesis doctoral presentado. FCNyM-UNLP

Savino V., Luna M.G., Salas Gervassio N.G, Coviella C. (2016) Interspecific interactions between two *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) larval parasitoids with contrasting life histories. *Bulletin of Entomology Research*, 107(1):32–38

Schillmiller A., Shi F., Kim J., Charbonneau A.L., Holmes D., Daniel Jones A., Last R.L. (2010) Mass spectrometry screening reveals widespread diversity in trichome specialized metabolites of tomato chromosomal substitution lines. *The Plant Journal*; 62:391-403

Schlick-Steiner B.C., Steiner F.M., Seifert B., Stauffer C., Christian E., Crozier R.H. (2010) Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual. Review of Entomology*. 2010. 55:421–38

Schneider M.I., Sánchez N.E., Pineda S., Chi H., Ronco. A. (2009). Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. *Chemosphere*, 76:1451-1455

Schofield S.F., Bishop T.R., Parr C.L. (2016) Morphological characteristics of ant assemblages (Hymenoptera: Formicidae) differ among contrasting biomes. *Myrmecological News*, 23:129-137

Schwarzfeld M.D. y Sperling F.A.H. (2014) Species delimitation using morphology, morphometrics, and molecules: definition of the *Ophion scutellaris* Thomson species group, with descriptions of six new species (Hymenoptera, Ichneumonidae) *ZooKeys*, 462:59–114

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) (2013) Ficha Técnica No. 28 Palomilla del tomate *Tuta*

absoluta Meyrick

- Sexton J.P., McIntyre P.J., Angert A.L., Rice K.J.** (2009) Evolution and ecology of species range limits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40:415–436
- Shah M.A. y Khan A.A.** (2013) Functional response- a function of predator and prey species. *The Bioscan*, 8:751–758
- Shiberu T. y Getu E.** (2018a) Determination of the economic threshold level of tomato leaf miner, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) on tomato plant under glasshouse conditions. *Journal of Horticulture and Forestry*, 10(2):9-16
- Shiberu T. y Getu E.** (2018b) Experimental Analysis of Economic Action Level of Tomato Leafminer, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) on Tomato Plant under Open Field. *Advances in Crop Science and Technology* 6:(1) DOI: 10.4172/2329-8863.1000327
- Shingleton A.W., Frankino W.A., Flatt T., Nijhout H.F., Emlen D.** (2007) Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. *BioEssays*, 29:536-548
- Silva D.B, Bueno V.H.P., Lins J.C. Jr., van Lenteren J.C.** (2015) Life history data and population growth of *Tuta absoluta* at constant and alternating temperatures on two tomato lines (2015) *Bulletin of Insectology*, 68 (2):223-232
- Silva D.B., Bueno V.H.P., Montes F.C., van Lenteren J.C.** (2016) Population growth of three mirid predatory bugs feeding on eggs and larvae of *Tuta absoluta* on tomato. *BioControl* DOI 10.1007/s10526-016-9736-1
- Sigsgaard L.** (2000) The temperature-dependent duration of development and parasitism of three cereal aphid parasitoids, *Aphidius ervi*, A.

rhopalosiphi, and *Praon volucre*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 95:173–184

Siqueira H. A., Guedes R.N., Picanco M.C. (2000) Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Agricultural and Forest Entomology, 2:147-153

Smith H.S. (1919) On Some Phases of Insect Control by the Biological Method. Journal of Economic Entomology, 2(4):288–292

Sneath P.H.A y Sokal R.R. (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification, 573 pp. San Francisco, WH Freeman

Soares M.A., Campos M.R., Passos LC., Carvalho G.A. et al. (2019) Botanical insecticide and natural enemies: a potential combination for pest management against *Tuta absoluta*. Journal of Pest Science <https://doi.org/10.1007/s10340-018-01074-5>

Speranza S., Melo, M.C. Luna M.G., Virla E.G. (2014) First record of *Zelus obscuridorsis* (Hemiptera:Reduviidae) as a predator of the South American tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae). Florida Entomologist, 97:295-297

StatSoft (2007) Statistica (data analysis software system), version 8.0. Tulsa, OK, StatSoft.

Stern V.M., Smith R.F., Van Den Bosch R., Hagen K.S. (1959) The integrated control concept. Hilgardia, 29:81-101

Strassera M.E. (2009) Análisis de la sustentabilidad de diferentes sistemas de producción comercial de tomate bajo cubierta para el manejo de las plagas *Trialeurodes vaporariorum* y *Tuta absoluta* en el Cinturón Hortícola platense. Trabajo de tesis presentado. Carrera de Magister

Scientiae en Protección Vegetal con orientación en Manejo de Plagas
Animales. Fac. Cs. Agrarias y Forestales, UNLP

Subsecretaría de Mercados Agropecuarios Ministerio de Agroindustria

(2017) Mercado Externo del Tomate

Takada H. y Tada E. (2000) A comparison between two strains from Japan and Europe of *Aphidius ervi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97:11–20

Tazerouni Z., Talebi A. A., Rakhshani E. (2012) Temperature-dependent functional response of *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of the Entomological Research Society* 14(1):31-40

Thomas C.D. (2010) Climate, climate change, and range boundaries. *Diversity Distribution*, 16:488–495

Tonnang H.E.Z., Mohamed S.F., Khamis F., Ekesi S. (2015) Identification and risk assessment for worldwide invasion and spread of *Tuta absoluta* with a focus on Sub-Saharan Africa: Implications for phytosanitary measures and management. *PLOS ONE* 10(8): e0135283

Trexler J.C., McCulloch C.E., Travis J. (1988) How can the functional response best be determined? *Oecologia (Berl.)*, 76:206-214

Trpin V., Abarzúa F.D., Brouchoud M.S. (2015) Producción de tomate para industria en el Valle Medio de Río Negro: una perspectiva desde los actores involucrados. *Revista Interdisciplinaria de Estudios Agrarios*, 43:5-25

Urbaneja A., Hinarejos R., Llacer E., Garrido A., Jacas J.A. (2002) Effect of temperature on life history of *Cirrospilus vittatus* (Hymenoptera:

Eulophidae), an ectoparasitoid of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) *Journal of Economic Entomology* ,95 (2):250-255

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

USDA (2011) New Pest Response Guidelines Tomato Leafminer (*Tuta absoluta*).
USDA

Vallina C., Savino V., Greco N.M., Luna M.G. (2012) Cría de agentes de control biológico: almacenamiento en frío de las pupas de *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera: Braconidae). Libro de actas del VIII Congreso Argentino de Entomología. Bariloche, Argentina, p. 301

van den Bosch R., Messenger P.S., Gutierrez A.P. (1982) An introduction to biological control. Plenum Press, New York and London. 247 pp.

van Driesche R.G., Hoodle M.S., Center T.D. (2007) Control de plagas y malezas por enemigos naturales. USDA Forest Service Forest Health Technology Enterprise Team, Washington, D.C. 765 pp.

van Lenteren, J.C. (Ed) (2003) Quality control and production of biological control agents. CABI Publishing, 327 pp.

van Lenteren, J.C. (2012a). The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, 57:1-20

van Lenteren, J.C. (2012b) Internet Book of Biological Control. Available from: www.IOBC-Global.org, Wageningen, The Netherlands. Acceso: diciembre 2018)

van Lenteren J.C. y Manzaroli G. (1999) Evaluation and use of predators and parasitoids for biological control of pests in greenhouses. In: R. Albajes,

M.L. Gullino, J.C. van Lenteren y Y. Elad (Eds.). Integrated Pest and Disease Management in Greenhouses Crops. Pp 183-201. Kluwer. Dordrecht. The Netherlands.

van Lenteren J.C., Bale J., Bigler F., Hokkanen H.M.T., Loomans A.J.M. (2006) Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annual Review of Entomology*, 51:609-643

Van Lenteren J.C, Bolckmans K., Kohl J., Ravensberg W., Urbaneja A. (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 63:39–59

Van Lenteren J.C., Bueno V.H.P., Colmenarez Y., Luna M.G. (Eds.) (2019). *Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future*

van Lenteren J.C., Hemerik L., Lins J., Bueno V.H.P. (2016) Functional responses of three neotropical mirid predators to eggs of *Tuta absoluta* on Tomato. *Insects*, 7(3):34

Vargas H.C. (1970) Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Idesia*, 1:75 -110

Vera M.S., Lagomarsino L., Sylvester M., Pérez G.L., Rodríguez P., Mugni H., Sinistro R., Ferraro M., Bonetto C., Zagarese H., Pizarro H. (2010) New evidences of Roundup_ (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19:710–721

Vitieri M.L., Ghezán G., Iglesias D. (2013) Tomate y Lechuga: producción, comercialización y consumo. Proyecto Específico AEES 302421: Economía de las Cadenas Agroalimentarias y Agroindustriales Estudios Socioeconómicos de los Sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales N°

- Vorsino A.E., Wieczorek A.M., Wright M.G., Messing R.H.** (2012) An analysis of heterosis and outbreeding depression among lab-reared populations of the parasitoid *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae); potential implications for augmentative releases. *Biological Control*, 61:26–31
- Waage J. y Cherry A.** (1990) Quantifying the impact of parasitoids on diamondback moth. *Proceedings of the Second International Workshop*, 10-14 December, 1990, Tainan, Taiwan, 245-253 pp
- Wajnberg E.** (2004) Measuring genetic variation in natural enemies used for biological control: Why and how? En: *Genetics, Evolution and Biological Control*, Ehler L., R. Sforza & Th. Maitelle (eds.). CAB International, 19-37
- Wajnberg E., Bernstein C., van Alphen J.J.M.** (eds) (2008) *Behavioral Ecology of Insect Parasitoids: From Theoretical Approaches to Field Applications.* Blackwell Publishing Ltd. Online ISBN:9780470696200; DOI:10.1002/9780470696200
- Wajnberg E.** (2010) Genetics of the behavioral ecology of egg parasitoids. En: *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*. Cônsoli F.L., J.R.P. Parra & R.A. Zucchi (eds.), Springer, 149-165
- Wang B. y Ferro D.N.** (1998) Functional responses of *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory and field conditions. *Environmental Entomology*, 27:752–758
- Wanumen Riaño A.C.** (2012) Evaluación de diferentes densidades de liberación de *Apanteles gelechiidivoris* Marsh (Hymenoptera: Braconidae) para el control de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) en

condiciones comerciales. Trabajo de Máster en Biología Aplicada. Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Colombia, D.C.

WeatherSpark <https://es.weatherspark.com> (acceso: junio 2015)

Werren J.H., Baldo L, Clark M.E. (2008) *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 741-751

Werren J.H. y Windsor D.M. (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London* 267:1277-1285

Wezel A., Bellon, Doré T., Francis C., Vallod D., David C. (2009) Agroecology as a science, a movement, and a practice". *Agronomy for Sustainable Development*, 29(4):503-515

Wezel A., Casagrande M., Celette F., Vian J.F., Ferrer A., Peigné J. (2014) Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34:1–20

Wharton R.A., Marsh P.M., Sharkey M.J. (eds.) (1997) *Manual of the New World Genera of the Family Braconidae (Hymenoptera)*. Washington, D. C. International Society Hymenoptera, 447 pp

Whitfield J. B. 1997. Subfamily Microgastrinae. pp. 333-350 in Wharton, R. A., Marsh, P. M. & Sharkey, M. J. (eds). *Manual of the new world genera of the family Braconidae (Hymenoptera)*. Washington, D.C.: The International Society of Hymenopterists, 439 pp

Whitten M.J y Hoy M.J. (1999) Genetic improvement and other genetic considerations for improving the efficacy and success rate of biological control. En: Bellows TS, Fisher TW (eds.). *Handbook in biological control*. Academic Press

- Wickham H., François R., Henry L., Müller K.** (2018) dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 0.7.6. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- Worsham M.L.L.D., Julius E.P., Nice C.C., Diaz P.H., Huffman D.G.** (2017) Geographic isolation facilitates the evolution of reproductive isolation and morphological divergence. *Ecology and Evolution*, 7:10278-10888
- Xu H.Y., Yang N.H, Duan M., Wan F.H.** (2016) Functional response, host stage preference and interference of two whitefly parasitoids. *Insect Science*, 23:134–144
- Yang N.W., Ji L.L. Lovei G.L., Wan, F.H.** (2012) Shifting preference between oviposition vs. host-feeding under changing host densities in two Aphelinid parasitoids. *PLoS ONE*, 7: e41189. doi: 10.1371/journal.pone.0041189
- Yu D.S., Kokko E.G., Barron J.R., Schaalje G.B. Gowen B.E.** (1992) Identification of ichneumonid wasps using image analysis of wings. *Systematic Entomology*, 17:389-395
- Zamani A.A., Talebi A.A., Fathipour Y., Baniameri V.** (2006) Temperature-dependent functional response of two aphid parasitoids, *Aphidius colemani* and *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Aphidiidae), on the cotton aphid. *Journal of Pest Science* 79(4):183-188
- Zhanga L., Ranaa I. , Shafferb R.M., Taiolic E., Sheppard L.** (2019) Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and supporting evidence. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 781:186-206
- Zikic V., Tomanovic E., Ivanovic A., Kavallieratos N.G., Stary P., Stanisavljevic L.S, Rakhshani E.** (2009) Morphological Characterization of *Ephedrus persicae* Biotypes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in the Palaearctic. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(1): 1-11