

GIOVANA MAMANI HUAYHUA

**DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE ACASALAMENTO DE MACHOS DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) COLETADOS EM CULTIVOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima

Coorientador: Manuel Alejandro Ix Balam

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Mamani Huayhua, Giovana, 1994-

M263d Determinação do estado de acasalamento de machos de  
2022 *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): coletados em cultivos  
de tomate (*Solanum lycopersicum*) / Giovana Mamani Huayhua.  
– Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (44 f.): il.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Entomologia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 39-44.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.213>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Insetos - Reprodução. 2. Feromônios. 3. Espermatóforos.  
4. Insetos - Atração sexual. I. Lima, Eraldo Rodrigues de, 1960-  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.  
III. Título.

CDD 22. ed. 595.78

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

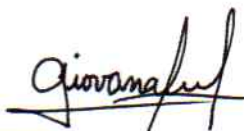
GIOVANA MAMANI HUAYHUA

**DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE ACASALAMENTO DE MACHOS DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) COLETADOS EM CULTIVOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

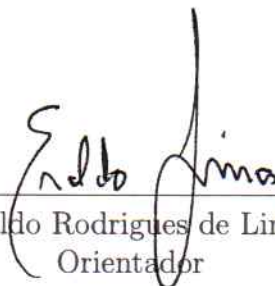
APROVADA: 12 de janeiro de 2022

Assentimento:



---

Giovana Mamani Huayhua  
Autora



---

Eraldo Rodrigues de Lima  
Orientador

*Dedico este trabalho ao meus pais que são o pilar fundamental em tudo o que sou, pelo amor, apoio incondicional e por sempre acreditar em mim. Aos meus irmãos pelo amor e apoio.*

## Agradecimentos

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) pela oportunidade de fazer o mestrado no Brasil.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Entomologia pela oportunidade de realização do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Ao professor Eraldo Rodrigues de Lima pela orientação, atenção, confiança, amizade e pelos ensinamentos.

Aos meus pais Lucia Huayhua Apaza y Arnaldo Mamani Añamuro e irmãos Yaneth, Einner, Julio César, Eduardo, Jean Carlos, Arnold pelo amor, apoio incondicional em todo momento e por sempre acreditar em mim.

A toda minha família pelo apoio em todo momento.

Aos professores do Departamento de Entomologia, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor José Lino Neto pelo fornecimento de materiais para a realização desse trabalho.

Ao professor Og Francisco Fonseca de Souza pela disponibilização de seu laboratório e equipamentos.

Ao meu coorientador Manuel Alejandro Ix Balam pela amizade e sugestões para a elaboração deste trabalho de pesquisa.

A Natália, pelo auxílio nas análises, ensinamentos e amizade.

Aos amigos e colegas do laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos: Carlos, Suelen, Kárenn, Anne pelo convívio, pela amizade e colaborações.

A todos meus amig@s pela amizade, pelo apoio incondicional, por me motivar a continuar e pelos conselhos.

Obrigada!

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.*

Albert Einstein

## Resumen

MAMANI, Giovana Huayhua, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, enero del 2022. **Determinación del estado de apareamiento de machos de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) colectados en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*)** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima. Coorientador: Manuel Alejandro Ix Balam.

El minador de hoja *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), es una especie poliándrica de importancia económica en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*). Este comportamiento sexual permite la presencia de múltiples espermatozoides dentro de la hembra y la posibilidad de que diferentes machos fertilicen su descendencia, lo que hace que el manejo de la plaga con insecticidas sea desafiante. El espermatozoides contiene espermatozoides y productos de glándulas accesorias que las hembras pueden utilizar para aumentar su desempeño reproductivo y longevidad. Estos eyaculados representan un investimento de los machos para su reproducción. Por ello, evaluamos los factores que podrían influenciar el tamaño del espermatozoides del macho con el fin de elegir una referencia que represente a los machos colectados en campo utilizando como referencia el tamaño del espermatozoides. Para ello se realizó comparaciones de tres poblaciones de *T. absoluta*: (I) individuos alimentados con hojas de tomate variedad Santa Clara, (II) individuos alimentados con hojas de tomate variedad Vivacy. El espermatozoides producido por individuos alimentados con hojas de tomate variedad Vivacy en laboratorio fue comparado con el espermatozoides producido por (III) individuos provenientes del campo de tomate de la misma variedad. Para ello, pupas de *T. absoluta* fueron colectadas en el campo de tomate de la variedad Vivacy-campo. Los machos colectados en Vivacy-campo mostraron un mayor peso y produjeron un espermatozoides de mayor tamaño en comparación con aquellos machos provenientes de laboratorio y alimentados con las variedades de tomate Santa Clara y Vivacy-laboratorio. El tamaño del espermatozoides fue afectado por el número de apareamientos de los machos en días consecutivos, la alimentación (variedades de tomate), ambiente donde se desarrollaron y el peso de los machos. A partir de los espermatozoides de machos colectados en campo se planteó dos métodos para determinar el estado de apareamiento del macho. El método 1 consistió en la media y la desviación estándar del tamaño del espermatozoides de la primera cópula y el método 2 consistió en la media y la desviación estándar del tamaño del espermatozoides de la primera y segunda cópula. Fue seleccionado el método 2 denominado Método de la Media de la Primera y Segunda Cópula (MMPSC) porque mostró una menor dispersión de los datos. A partir del método seleccionado probamos que los machos de *T. absoluta* con estados de apareamientos diferentes (virgen y apareado) presentan una respuesta de atracción diferente entre la feromona sexual producida por hembras vírgenes y atrayentes sintéticos. En el cultivo de tomate en campo se instalaron

tres trampas cebadas con feromona sexual de *T. absoluta* como puntos de colecta. Una trampa fue cebada con el componente principal de la feromona sexual (TDTA), otra cebada con TDTA + el componente minoritario de la feromona sexual (TDDA) y otra trampa cebada con feromona sexual producida por hembras vírgenes. Las colectas de los machos fueron realizada a partir de las seis de la mañana, horario de llamamiento de las hembras. Para determinar el estado de apareamiento de los machos colectados en campo fue medido el tamaño de los espermatozoides transferidos a hembras vírgenes en el laboratorio. Nuestros resultados muestran que la proporción de machos colectados con TDTA fueron en mayor proporción machos vírgenes, con TDTA + TDDA fueron colectados machos vírgenes y apareados en igual proporción y con hembras vírgenes fueron colectados en mayor proporción machos apareados que machos vírgenes. Los resultados están asociados a la naturaleza de los atrayentes utilizados en los experimentos y muestra que en campo existe una competencia entre los atrayentes sintéticos y las hembras. Esto podría ocasionar que los machos vírgenes lleguen a los atrayentes sintéticos mientras que los machos apareados estarían apareándose con las hembras en los cultivos de tomate en campo.

**Palabras-clave:** Colecta masal. Espermatozoides. Feromona Sexual. Feromona sintética. Reproducción de Insectos.

## Resumo

MAMANI, Giovana Huayhua, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2022. **Determinação do estado de acasalamento de machos de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) coletados em cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*)** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima. Coorientador: Manuel Alejandro Ix Balam.

O traça do tomateiro *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) é uma espécie poliândrica de importância econômica no cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Esse comportamento sexual permite a presença de múltiplos espermatozóides dentro da fêmea e a possibilidade de que machos diferentes fertilizem sua prole, tornando o manejo de pragas com inseticidas desafiador. O espermatozóide contém espermatozóides e produtos de glândulas acessórias que as fêmeas podem usar para aumentar seu desempenho reprodutivo e longevidade. Esses ejaculados representam um investimento dos machos para sua reprodução. Portanto, avaliamos os fatores que poderiam influenciar o tamanho do espermatozóide do macho para escolher uma referência que representasse os machos coletados em campo usando o tamanho do espermatozóide como referência. Para isso, foram feitas comparações de três populações de *T. absoluta*: (I) indivíduos alimentados com folhas de tomateiro da variedade Santa Clara, (II) indivíduos alimentados com folhas de tomateiro da variedade Vivacy. O espermatozóide produzido por indivíduos alimentados com folhas de tomateiro Vivacy em laboratório foi comparado com o espermatozóide produzido por indivíduos (III) do campo de tomateiro da mesma variedade. Para tanto, pupas de *T. absoluta* foram coletadas no campo de tomateiro da variedade Vivacy-campo. Os machos coletados no Vivacy-campo apresentaram maior peso e produziram um espermatozóide maior em comparação com os machos do laboratório e alimentados com as variedades de tomate Santa Clara e Vivacy-laboratório. O tamanho do espermatozóide foi afetado pelo número de acasalamentos dos machos em dias consecutivos, pela dieta (variedades de tomate), pelo ambiente onde se desenvolveram e pelo peso dos machos. A partir dos espermatozóides de machos coletados em campo, foram propostos dois métodos para determinar o status de acasalamento do macho. O método 1 consistiu na média e desvio padrão do tamanho do espermatozóide da primeira cópula e o método 2 consistiu na média e desvio padrão do tamanho do espermatozóide da primeira e segunda cópula. O método 2, denominado Método da Média da Primeira e Segunda Cópula (MMPSC), foi selecionado por apresentar menor dispersão dos dados. Usando o método selecionado, provamos que machos de *T. absoluta* com diferentes estados de acasalamento (virgens e acasalados) apresentam uma resposta de atração diferente entre o feromônio sexual produzido pelas fêmeas virgens e os atraentes sintéticos. No campo de tomateiro, três armadilhas iscadas com feromônio sexual de *T. absoluta* foram instaladas como pontos de coleta. Uma armadilha foi iscada

com o componente principal do feromônio sexual (TDTA), outra iscada com TDTA + o componente minoritário do feromônio sexual (TDDA) e outra iscada com feromônio sexual produzido por fêmeas virgens. As coletas dos machos foram realizadas a partir das seis da manhã, que é o ponto de chamada das fêmeas. Para determinar o status de acasalamento dos machos coletados em campo, foi medido o tamanho dos espermatóforos transferidos para as fêmeas virgens em laboratório. Nossos resultados mostram que a proporção de machos coletados com TDTA foram machos virgens em maior proporção, com TDTA + TDDA machos virgens e acasalados foram coletados em igual proporção e com fêmeas virgens machos acasalados foram coletados em maior proporção que machos virgens. Os resultados estão associados à natureza dos atraentes utilizados nos experimentos e mostram que em campo há competição entre os atraentes sintéticos e fêmeas. Isso pode fazer com que machos virgens alcancem os atraentes sintéticos, enquanto machos acasalados estariam acasalando com fêmeas em plantações de tomate.

**Palavras-chave:** Coleta Massal. Espermatóforo. Feromônio Sexual. Feromônio Sintético. Reprodução de Insetos.

# Abstract

MAMANI, Giovana Huayhua, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January 2022. **Determination of the mating status of males of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) collected in tomato (*Solanum lycopersicum*) crops.** Adviser: Eraldo Rodrigues de Lima. Co-adviser: Manuel Alejandro Ix Balam.

The leaf miner *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) is a polyandrous species of economic importance in tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivation. This sexual behavior allows for the presence of multiple spermatophores within the female and the potential for different males to fertilize their offspring, making pest management with insecticides challenging. The spermatophore contains sperm and accessory gland products that females can use to increase their reproductive performance and longevity. These ejaculates represent an investment of the males for their reproduction. Therefore, we evaluated the factors that could influence the size of the male spermatophore in order to choose a reference that represents the males collected in the field using the size of the spermatophore as a reference. For this, comparisons were made of three populations of *T. absoluta*: (I) individuals fed with Santa Clara variety tomato leaves, (II) individuals fed with Vivacy variety tomato leaves. The spermatophore produced by individuals fed Vivacy tomato leaves in the laboratory was compared with the spermatophore produced by (III) individuals from the tomato field of the same variety. To do this, pupae of *T. absoluta* were collected in the tomato field of the Vivacy-field variety. The males collected in Vivacy-field showed a higher weight and produced a larger spermatophore compared to those males from the laboratory and fed with the Santa Clara and Vivacy-laboratory tomato varieties. The size of the spermatophore was affected by the number of matings of the males on consecutive days, the diet (tomato varieties), the environment where they developed, and the weight of the males. From the spermatophores of males collected in the field, two methods were proposed to determine the mating status of the male. Method 1 consisted of the mean and standard deviation of the spermatophore size of the first copulation and method 2 consisted of the mean and standard deviation of the spermatophore size of the first and second copulation. Method 2, called the Mean First and Second Copula Method, was selected because it showed less data dispersion. From the selected method we prove that the males of *T. absoluta* with different mating states (virgin and mated) present a different attraction response between the sexual pheromone produced by virgin females and synthetic attractants. In the tomato crop in the field, three traps baited with the sexual pheromone of *T. absoluta* as collection points. One trap was baited with the main component of the sexual pheromone (TDTA), another baited with TDTA + the minor component of the sexual pheromone (TDDA) and another trap baited with sexual pheromone produced

by virgin females. The collections of the males were carried out from six in the morning, when the females are called. To determine the mating status of males collected in the field, the size of spermatophores transferred to virgin females in the laboratory was measured. Our results show that the proportion of males collected with TDTA were virgin males in greater proportion, with TDTA + TDDA virgin and mated males were collected in equal proportion and with virgin females mated males were collected in greater proportion than virgin males. The results are associated with the nature of the attractants used in the experiments and show that in the field there is competition between synthetic attractants and females. This could lead to virgin males reaching synthetic lures while mated males would be mating with females in field tomato crops.

**Keywords:** Insect Reproduction. Mass Trapping. Sex Pheromone. Spermatophore. Synthetic Pheromone.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>14</b>
<b>2. Materiales y Métodos</b>	<b>16</b>
2.1. Cría de <i>T. absoluta</i> . . . . .	16
2.2. Material vegetal . . . . .	16
2.3. Sexado de pupas hembras de <i>T. absoluta</i> . . . . .	16
2.4. Colecta de machos de <i>T. absoluta</i> en cultivos de tomate en campo . . . . .	17
2.4.1. Localización de los cultivos de tomate en campo . . . . .	17
2.4.2. Instalación de trampas con feromona sexual . . . . .	17
2.4.3. Colecta de machos de <i>T. absoluta</i> . . . . .	18
2.4.4. Formación de parejas . . . . .	18
2.4.5. Extracción de espermatozoides . . . . .	19
2.4.6. Determinación del tamaño del espermatozoides . . . . .	19
2.5. Métodos para determinar el estado de apareamiento de machos de <i>T. absoluta</i> colectados en campo de tomate . . . . .	19
2.6. Determinación del estado de apareamiento de machos colectados utilizando atrayentes sintéticos y hembras vírgenes . . . . .	20
2.7. Factores que influyen en el tamaño del espermatozoides del macho de <i>T. absoluta</i> . . . . .	20
2.7.1. Colecta de pupas en plantaciones de tomate en campo y cría de adultos . . . . .	21
2.7.2. Obtención de semillas y plantas de tomate variedad Vivacy y Santa Clara . . . . .	21
2.7.3. Sexado de pupas . . . . .	21
2.7.4. Formación de parejas y extracción del espermatozoides . . . . .	21
2.7.5. Competición larval . . . . .	22
<b>3. Análisis Estadístico</b>	<b>22</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>24</b>
4.1. Métodos para determinar el estado de apareamiento de machos de <i>T. absoluta</i>	24
4.2. Factores que influyen en el tamaño del espermatozoides del macho de <i>T. absoluta</i> . . . . .	27
4.2.1. Peso de pupa macho . . . . .	27
4.2.2. Tamaño del espermatozoides y cópulas consecutivas de los machos . . . . .	28
4.2.3. Efecto del peso de la pupa en el tamaño del espermatozoides del macho	29

4.2.4. Competición larval . . . . .	30
4.3. Competición entre feromonas sexuales sintéticas y feromonas provenientes de hembras vírgenes . . . . .	31
<b>5. Discusión</b>	<b>33</b>
5.1. Métodos para determinar el estado de apareamiento de machos de <i>Tuta absoluta</i> (Lepidoptera: Gelechiidae) colectados en cultivos de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) . . . . .	33
5.2. Competición entre feromonas sexuales sintéticas y hembras en la colecta de machos de <i>T. absoluta</i> en campos de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) . .	34
5.3. Factores que influyen en el tamaño del espermátóforo del macho de <i>T. absoluta</i> . . . . .	36

## 1. Introducción

*Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), conocido como minador de hojas del tomate, es un microlepidóptero multivoltino con alto potencial reproductivo y considerado una plaga invasiva (Coelho and França, 1987; Barrientos et al., 1998; Michereff-Filho and Vilela, 2001; Pereyra and Sánchez, 2006). *Tuta absoluta* es una de las principales plagas del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) a nivel mundial y está presente en más de 50 países (Desneux et al., 2010; Guedes and Siqueira, 2012; Biondi et al., 2019; Santana et al., 2019). Las larvas de *T. absoluta* penetran las hojas de tomate y se alimentan del mesófilo, afectando la capacidad fotosintética de la planta y la producción de frutos, ocasionando pérdidas económicas al productor (Coelho and França, 1987; Uchôa et al., 1995; Pereyra and Sánchez, 2006).

Los insecticidas son el principal método de control de *T. absoluta*, sin embargo, el uso intensivo de plaguicidas ha ocasionado resistencia en la plaga (Guedes and Siqueira, 2012). Las feromonas sexuales son un método alternativo viable para el control de *T. absoluta*. La feromona sexual sintética de *T. absoluta* es una mezcla proporcional 90:10 de acetato de (3E, 8Z, 11Z)-3,8,11-tetradecatrienilo (o TDTA) y acetato de (3E, 8Z)-3,8-tetradecadienilo (o TDDA), respectivamente (Attygalle et al., 1995, 1996; Svatoš et al., 1996). El uso de TDTA o TDDA, individualmente o en combinación, muestran resultados contradictorios. En experimentos de túnel de viento la mezcla TDTA + TDDA fue más atractiva para los machos de *T. absoluta* que apenas utilizando el componente TDTA (Svatoš et al., 1996). Sin embargo, otros trabajos muestran que la utilización del componente TDTA es suficiente para la atracción de los machos de *T. absoluta* (Michereff Filho et al., 2000).

Experimentos en campo muestran una alta tasa de captura de machos de *T. absoluta*, sin embargo, las pérdidas en la producción permanecen arriba del nivel del daño económico (Lôbo, 2005). Así mismo, experimentos en invernadero muestran que diferentes concentraciones de la feromona sexual no son eficaces en la reducción de los daños en hojas y frutos del tomate cuando utilizado la técnica de captura masiva de machos con trampas de feromona sexual sintética (Cocco et al., 2012). Lo anterior sugiere fallas en la captura de machos de *T. absoluta* utilizando la feromona sexual sintética.

Las fallas en la captura de machos de *T. absoluta* estarían asociada a la biología reproductiva de la plaga, ya que los machos son poligínicos (Silva, 2008) y las hembras poliándricas (Lee et al., 2014). Así mismo, machos de *T. absoluta* apareados, después de ser expuesta previamente al compuesto mayoritario TDTA, presentan mayor sensibilidad al TDTA en comparación con machos vírgenes (Domínguez et al., 2019). Lo anterior su-

giere que el estado de apareamiento del macho de *T. absoluta* afecta su atracción a los atrayentes sintéticos y feromona sexual natural (hembras vírgenes). Sin embargo, esta hipótesis nunca fue evaluada experimentalmente.

En Lepidópteros, durante la cópula los machos forman una estructura proteica llamado espermatóforo que contiene espermatozoides y productos de glándulas accesorias que la hembra puede utilizar para aumentar su desempeño reproductivo y longevidad (Man, 1984). El espermatóforo representa un investimento de los machos para su reproducción (Bissoondath and Wiklund, 1996). El tamaño del espermatóforo depende de factores como: peso del macho, edad del primer apareamiento, nutrición durante la fase de larva o del adulto, número de apareamientos, entre otros factores (Lederhouse et al., 1990; Delisle and Bouchard, 1995; Torres-Vila and Jennions, 2005; Tigreros, 2013).

El apareamiento múltiple de los machos en *T. absoluta* ocasiona la disminución del tamaño del espermatóforo (Silveira, 2020) como se muestra en otras especies de Lepidoptera (Muller et al., 2015, 2016). Esta disminución resulta más evidente de la primera (que se consideraría como macho virgen) a la segunda cópula (que se consideraría como macho apareado) (Lôbo, 2005; Silveira, 2020). Por tanto, el tamaño del espermatóforo puede ser utilizado como un indicativo para determinar el estado de apareamiento de machos de *T. absoluta*.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el estado de apareamiento de machos de *T. absoluta* colectados en plantaciones de tomate utilizando el tamaño del espermatóforo como referencia. También se analizaron los factores que influyen en el tamaño del espermatóforo del macho. Los machos fueron colectados en campo utilizando feromona sexual sintética (TDTA + TDDA y TDDA) y natural (hembras vírgenes).

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Cría de *T. absoluta*

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Semioquímicos e Comportamiento de Insetos de la Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil. Huevos de *T. absoluta* ovipositados en hojas de tomate fueron colocados en jaulas de madera (30x20x30 cm) cubiertas con tela organza para permitir el flujo de aire. Las larvas eclosionadas fueron alimentadas con hojas frescas de tomate (*S. lycopersicum*), colocadas en botellas de vidrio que contenían agua para evitar la pérdida de turgencia. Después de la fase larval, las pupas fueron retiradas de forma manual de las hojas, colectadas con ayuda de un pincel y colocadas en placas Petri (90x15mm). Las placas Petri fueron introducidas en jaulas de acrílico (30x30x30 cm) para la eclosión de los adultos. Los adultos fueron alimentados *ad libitum* con una solución azucarada al 10 % embebida en algodón. Para la oviposición fueron colocadas hojas de tomate dentro de las jaulas, los cuales fueron cambiadas diariamente. Las condiciones de la sala de cría fueron de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , fotofase de 12 h y humedad relativa (H.R.) de  $70\pm 5\%$ .

### 2.2. Material vegetal

Las larvas de *T. absoluta* fueron alimentadas con hojas de tomate variedad Santa Clara. Las plantas de tomate fueron obtenidas de semillas colocadas en una bandeja plástica que contenía sustrato para hortalizas y seguidamente la bandeja fue colocada en una cámara de germinación (TE-4000/1). Las plántulas, con dos pares de hojas verdaderas, fueron trasplantadas en macetas de plástico de 3L que contenía condicionador de suelo MecPlant®. Macronutrientes NPK (10:10:10) fueron aplicados cada 7 días para la fertilización de las plantas, las cuales fueron cultivadas en un invernadero a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  y  $70\pm 5\%$  de H.R.

### 2.3. Sexado de pupas hembras de *T. absoluta*

Las pupas de *T. absoluta* fueron colectadas de hojas de tomate y separadas por sexo según el poro genital (Genc, 2016), utilizando un microscopio estereoscopio (Leica EZ4). Cada pupa hembra fue seleccionada de forma aleatoria y colocada en un frasco de 70 mL hasta su eclosión. Las pupas fueron mantenidas en una sala de cría con temperatura, fotofase y H.R. como descritos en la sección 2.1.

## **2.4. Colecta de machos de *T. absoluta* en cultivos de tomate en campo**

### **2.4.1. Localización de los cultivos de tomate en campo**

Los machos de *T. absoluta* fueron colectados en cultivos de tomate (*S. lycopersicum* variedad Vivacy) en el Municipio de Cajuri, Estado de Minas Gerais, Brasil. Antes de las colectas en campo, la presencia de *T. absoluta* en el cultivo de tomate fue evaluado instalando trampas tipo Delta cebadas con feromona sexual sintética.

### **2.4.2. Instalación de trampas con feromona sexual**

Machos de *T. absoluta* fueron colectados utilizando septums comerciales cebados con los atrayentes: (I) TDTA (compuesto sintético mayoritario o de un componente), (II) TDTA + TDDA (compuesto sintético mayoritario + compuesto sintético minoritario o de dos componentes) y (III) feromona sexual natural (hembras vírgenes). La trampa con hembras vírgenes consistió en una jaula esférica de 10 cm de diámetro cubierta con tela organza para permitir el flujo de aire en la jaula (Figura 1). Nueve hembras vírgenes de 1 ó 2 días de edad (Ferrara et al., 2001) fueron colocadas en la jaula 12 h antes de la coleta de machos en campo, para permitir la aclimatación de las hembras. Las trampas fueron colocadas cerca de 1 m de altura del suelo y la distancia entre trampas fue de cerca de 10 m formando un triángulo imaginario en el centro del cultivo de tomate.



**Figura 1:** Trampa instalada en un cultivo de tomate en campo en el Municipio de Cajuri, Estado de Minas Gerais, Brasil, con hembras vírgenes de *Tuta absoluta* liberando feromona sexual.

#### 2.4.3. Colecta de machos de *T. absoluta*

Los machos de *T. absoluta* fueron colectados durante el inicio de la fotofase, correspondiendo al periodo en el cual las hembras realizan el comportamiento de llamado de los machos (Silva, 2008). Los machos fueron capturados con un aspirador de succión bucal y posteriormente llevados al Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos de la UFV. Cada macho fue colocado en un frasco de 70 mL cubierto con tela organza en un extremo para posibilitar el flujo de aire. Los machos fueron mantenidos en una sala de cría con temperatura, fotofase y H.R. como descritos en la sección 2.1.

#### 2.4.4. Formación de parejas

Los machos colectados en campo fueron apareados con una hembra virgen que tenía 1 o 2 días de edad y que provenía de la cría de laboratorio. 24 h después del primer

apareamiento, el mismo macho fue nuevamente apareado con una nueva hembra virgen. De esta forma, cada macho fue apareado 2 veces en un intervalo de 24 h, obteniéndose espermatozoides de primera y segunda cópula de un mismo macho.

#### **2.4.5. Extracción de espermatozoides**

Concluida la cópula, la hembra fue crio anestesiada a  $-5^{\circ}\text{C}$  por 10 min y seguidamente colocada en forma ventral, con ayuda de alfileres entomológicos, en una placa Petri que contenía parafina. Un corte fue realizado en el penúltimo segmento abdominal de la hembra con ayuda de alfileres entomológicos y utilizando un microscopio estereoscopio (Leica EZ4). El espermatozoides fue extraído con ayuda de alfileres entomológicos y un pincel (N°. 0). El espermatozoides fue extraído en una solución PBS ( $\text{pH} = 7,2$ ) para evitar la desecación y desnaturalización de las estructuras. El espermatozoides fue colocado en un tubo Eppendorf (0,6 mL) que contenía 0,2 mL de fijador Karnovsky y almacenado a  $-5^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

#### **2.4.6. Determinación del tamaño del espermatozoides**

El espermatozoides fue fotografiado en un estereoscopio Leica M205A acoplado a una cámara multifocal Leica MC170 HD. La posición del espermatozoides y la escala de las imágenes fueron estandarizadas. El área de cada espermatozoides fue medido utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, U.S.A.) La medida del área del espermatozoides fue utilizada como equivalente al tamaño del mismo.

### **2.5. Métodos para determinar el estado de apareamiento de machos de *T. absoluta* colectados en campo de tomate**

El estado de apareamiento del macho se identificó a partir de espermatozoides producidos por individuos colectados en campo de tomate donde se obtuvieron espermatozoides de primera a cuarta cópula, para ello se utilizaron dos métodos para diferenciar macho virgen o apareado:

Método 1: La media y la desviación estándar fue calculado a partir del tamaño del espermatozoides de la primera cópula ( $0,1232 \pm 0,0196$ )  $\text{mm}^2$ . Este método fue denominado como el Método de la Media de la Primera Cópula (MMPC).

Para catalogar el estado de apareamiento de los machos colectados con la feromona sexual natural (hembras vírgenes) se utilizó el tamaño del espermátforo de la primera cópula. A partir de ello se comparó con la desviación estándar con respecto a su media ( $0,1232 \pm 0,0196 \text{ mm}^2$ ). Fueron considerados como machos apareados aquellos machos que producían un espermátforo que estaba por debajo de la desviación estándar respecto a la media y machos que producían un espermátforo por encima de la desviación estándar respecto a la media fueron considerados como machos vírgenes.

Método 2 : La media y la desviación estándar fue calculado a partir del tamaño del espermátforo de la primera y de la segunda cópula fue sumado y dividido entre dos ( $0,1082 \pm 0,0158 \text{ mm}^2$ ) y se le denominó como el Método de la Media de la Primera y Segunda Cópula (MMPSC).

Para catalogar el estado de apareamiento de los machos colectados con la feromona sexual natural (hembras vírgenes) se realizó una suma del tamaño del espermátforo de la primera y segunda cópula y dividido entre dos. A partir de ello se comparó con la desviación estándar con respecto a su media ( $0,1082 \pm 0,0158 \text{ mm}^2$ ). Fueron considerados como machos apareados aquellos machos que producían un espermátforo que estaba por debajo de la desviación estándar respecto a la media y machos que producían un espermátforo por encima de la desviación estándar respecto a la media fueron considerados como machos vírgenes.

## **2.6. Determinación del estado de apareamiento de machos colectados utilizando atrayentes sintéticos y hembras vírgenes**

El estado de apareamiento de los machos colectados con los atrayentes sintéticos y hembras se determinó utilizando los espermátforos extraídos y medidos y a partir de ello se determinó el estado de apareamiento utilizando el Método de la Media de la Primera y Segunda cópula (MMPSC) .

## **2.7. Factores que influyen en el tamaño del espermátforo del macho de *T. absoluta***

Para determinar el efecto de la variedad de tomate en el tamaño del espermátforo, fueron establecidas poblaciones de *T. absoluta* en laboratorio bajo las siguientes condiciones: (I) individuos alimentados con hojas de tomate variedad Santa Clara, (II) individuos alimentados con hojas de tomate variedad Vivacy. El espermátforo producido por indi-

viduos alimentados con hojas de tomate variedad Vivacy en laboratorio fue comparado con el espermátforo producido por (III) individuos colectados en tomate cultivado en campo y de la misma variedad (Vivacy-campo). Para ello, pupas de *T. absoluta* fueron colectadas en el campo de tomate de la variedad Vivacy.

### **2.7.1. Colecta de pupas en plantaciones de tomate en campo y cría de adultos**

Hojas de tomate infestadas con *T. absoluta* fueron colectadas en plantaciones de tomate (variedad Vivacy) en el Municipio de Cajuri, MG, Brasil. Las plantaciones estaban en fase final de cosecha sin aplicación de insecticidas. Las hojas fueron llevadas al Laboratorio de Semioquímicos e Comportamiento de Insetos de la UFV donde pupas y larvas de ultimo instar fueron colectadas y mantenidas hasta completar la fase de pupa. Los adultos obtenidos fueron mantenidos en una sala de cría con temperatura, fotofase y H.R. como descritos en la sección 2.1. La población de *T. absoluta* alimentada con la variedad Vivacy fue mantenida en una sala de cría separada de la población de *T. absoluta* alimentada con la variedad Santa Clara.

### **2.7.2. Obtención de semillas y plantas de tomate variedad Vivacy y Santa Clara**

Frutos maduros de tomate variedad Vivacy fueron colectados en un cultivo de tomate en campo en el Municipio de Cajuri, MG, Brasil. Los frutos fueron cortados de forma longitudinal y las semillas colectadas utilizando pinzas. Las plantas de tomate variedad Vivacy y Santa Clara fueron obtenidas utilizando la metodología descrita en la sección 2.2.

### **2.7.3. Sexado de pupas**

Las pupas fueron sexadas utilizando la metodología descrita en la sección 2.3, y cada pupa fue pesada en una balanza analítica (SHIMADZU AUW220D). Cada pupa fue colocada en un frasco de 70 mL hasta la eclosión de los adultos. Las pupas de ambos sexos fueron mantenidas en una sala de cría a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotofase de 12 h y H.R. de  $70\pm \%$ .

### **2.7.4. Formación de parejas y extracción del espermátforo**

Después de la eclosión de adultos, parejas fueron formadas seleccionando de forma aleatoria machos y hembras. Los machos tenían 24 h de edad en la primera cópula y las hembras eran vírgenes con 1 o 2 días de edad. Las parejas fueron colocadas en frascos de 70 mL y cada macho fue apareado en intervalos de 24 h, obteniéndose espermátforos de

primera, segunda, tercera y cuarta cópula de un mismo macho. Los espermatozoides provenientes de machos con cuatro cópulas consecutivas fueron obtenidos para machos criados con la variedad Vivacy, Santa Clara y machos colectados en campo en plantaciones de tomate variedad Vivacy. En cada apareamiento fue utilizado una nueva hembra virgen. Después de cada apareamiento, el espermatozoides fue extraído, fotografiado y su tamaño fue medido utilizando la metodología descrita en la sección 2.4.6 .

### 2.7.5. Competición larval

La competencia larval de *T. absoluta* fue evaluada en hojas de tomate variedad Santa Clara. Las hojas de tomate fueron colectadas de plantas que tenían cerca de 50 días de edad y cultivadas en invernadero, fueron seleccionadas hojas sanas de tamaños similares. Tres tratamientos fueron establecidos, en cada tratamiento se utilizaron hojas de tomate donde fueron colocadas 5, 10 y 15 larvas de primer instar. En cada repetición fue utilizada una hoja de tomate colocada en una botella de vidrio que contenía agua para evitar la pérdida de turgencia. Siempre que necesario se aumentaba el volumen de agua en la botella. El número de repeticiones fue de 15,14,15 para los tratamientos con 5, 10 y 15 larvas, respectivamente. Cada tratamiento fue evaluado en jaulas de madera de 30x20x30 cm cubiertas con tela de organza para permitir el flujo de aire. Después de la fase larval, las pupas fueron colectadas, separadas por sexo (Genc, 2016) y pesadas en una balanza analítica (SHIMADZU AUW220D). El experimento fue realizado en una sala de cría con temperatura, fotofase y H.R. como descrito anteriormente.

## 3. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en R (v. 4.0.0; R Development Core Team, 2020) utilizando Análisis de Desviación (ANODEV; un equivalente de máxima verosimilitud del ANOVA), seguido de un análisis residual para verificar la idoneidad de las distribuciones de los modelos probados. Modelos Lineales Generalizados (GLM) con distribución Binomial fueron utilizados para verificar la proporción de machos capturados en trampas cebadas con 1 componente (compuesto sintético mayoritario), 2 componentes (compuesto sintético mayoritario + compuesto sintético minoritario) y hembras vírgenes. Modelos Lineales Generalizados (GLM) con distribución Gaussiana fueron utilizados para verificar las diferencias en el peso de las pupas de machos alimentados con diferentes variedades de plantas de tomate, de machos colectados en campo y de la densidad larval. Modelos Lineales Generalizados (GLM) con distribución Binomial fueron utilizados para verificar la proporción de machos colectados con densidades de 5, 10 y 15 larvas. Un modelo lineal

de efectos mixtos (lme) fue utilizado para verificar el tamaño del espermátforo, ya que contenía efectos fijos (identidad masculina) y aleatorios (secuencia de apareamiento de los machos). Las medias de mínimos cuadrados (LSMeans) fue utilizado para comparar diferencias significativas entre tratamientos.

## 4. Resultados

### 4.1. Métodos para determinar el estado de apareamiento de machos de *T. absoluta*

La proporción de machos de *T. absoluta* que llegaron a la fuente de feromona sexual emitidas por hembras vírgenes fue afectada por el estado de apareamiento del macho (apareado y virgen) ( $\chi^2 = 146,29; p = 0,013$ ) utilizando el Método de la Media de la Primera Cópula (MMPC) (Figura 2) y ( $\chi^2 = 139,09; p = 0,00025$ ) utilizando el Método de la Media de la Primera y Segunda Cópula (MMPSC) (Figura 3).

La fórmula utilizada en el Método de la Media de la Primera Cópula indica que 62% de los machos colectados en campo eran machos apareados, mientras que 38% de los machos eran vírgenes (Figura 2). El Método de la Media de la Primera y Segunda Cópula, indica que 67% de los machos colectados eran apareados, mientras que el 33% de los machos eran vírgenes (Figura 3).

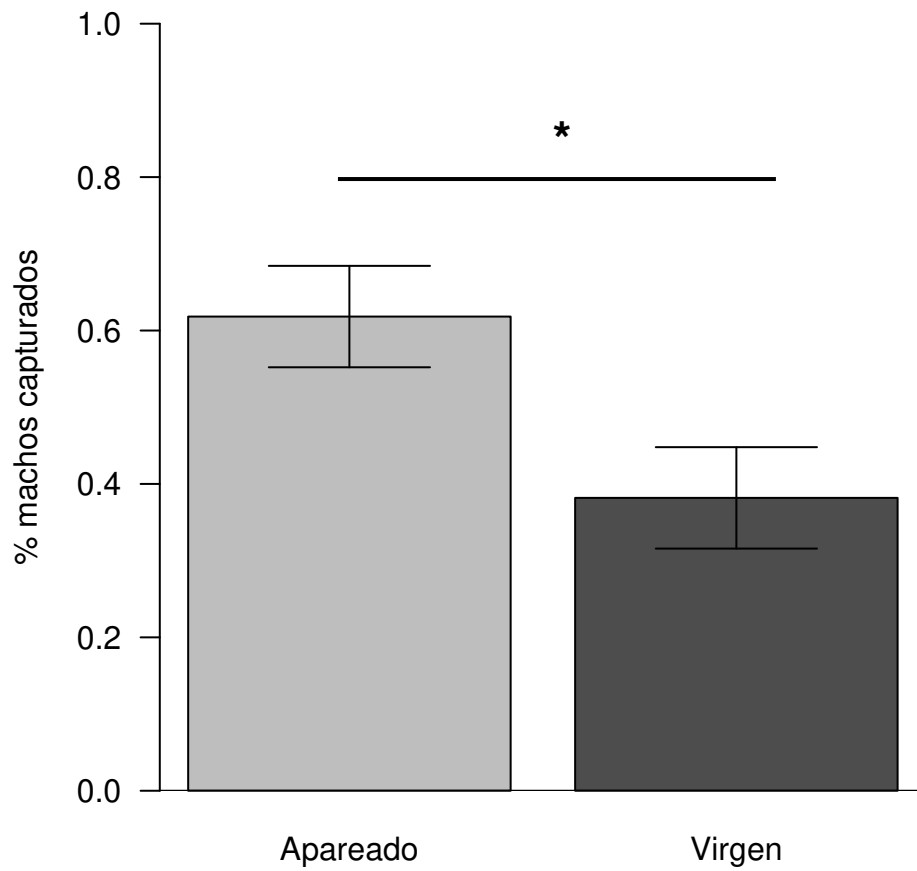


Figura 2. Proporción de machos vírgenes y apareados colectados en campos de tomate según el Método de la Media de la Primera Cópula (MMPC) propuesto para determinar el estado de apareamiento de machos de *Tuta absoluta*. Hembras vírgenes liberando feromona sexual fueron utilizadas para atraer a los machos. \* indica diferencia entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

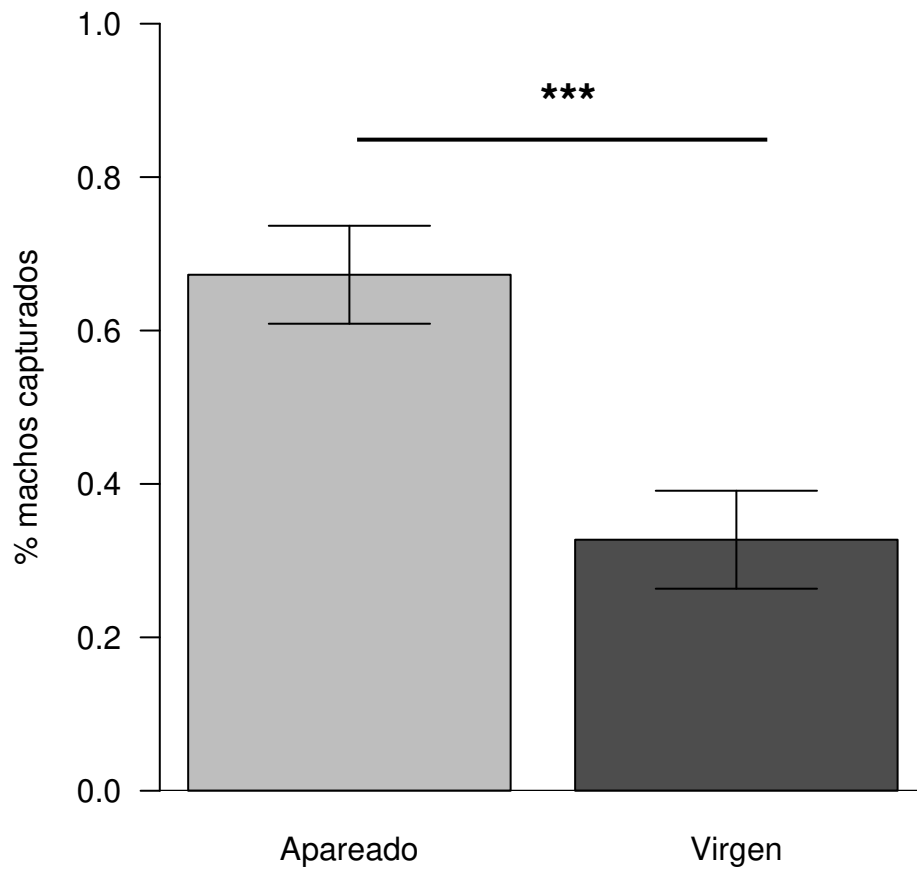


Figura 3: Proporción de machos vírgenes y apareados colectados en campos de tomate según el Método de la Media de la Primera y Segunda Cópula (MMPSC) propuesto para determinar el estado de apareamiento de machos de *Tuta absoluta*. Hembras vírgenes liberando feromona sexual fueron utilizadas para atraer a los machos. \* indica diferencia entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. Factores que influyen en el tamaño del espermátforo del macho de *T. absoluta*

### 4.2.1. Peso de pupa macho

El peso de las pupas machos fue afectado por el ambiente donde fueron colectadas las pupas (laboratorio y campo de tomate) y la fuente de alimentación (variedades de tomate: Santa Clara, Vivacy-laboratorio y Vivacy-campo) ( $F_{(2;58)} = 7,112; p = 0,002$ ). Las pupas de machos colectados en campo (Vivacy-campo) fueron más pesadas que las pupas colectadas en laboratorio de la variedad Santa Clara y Vivacy (Figura 4).

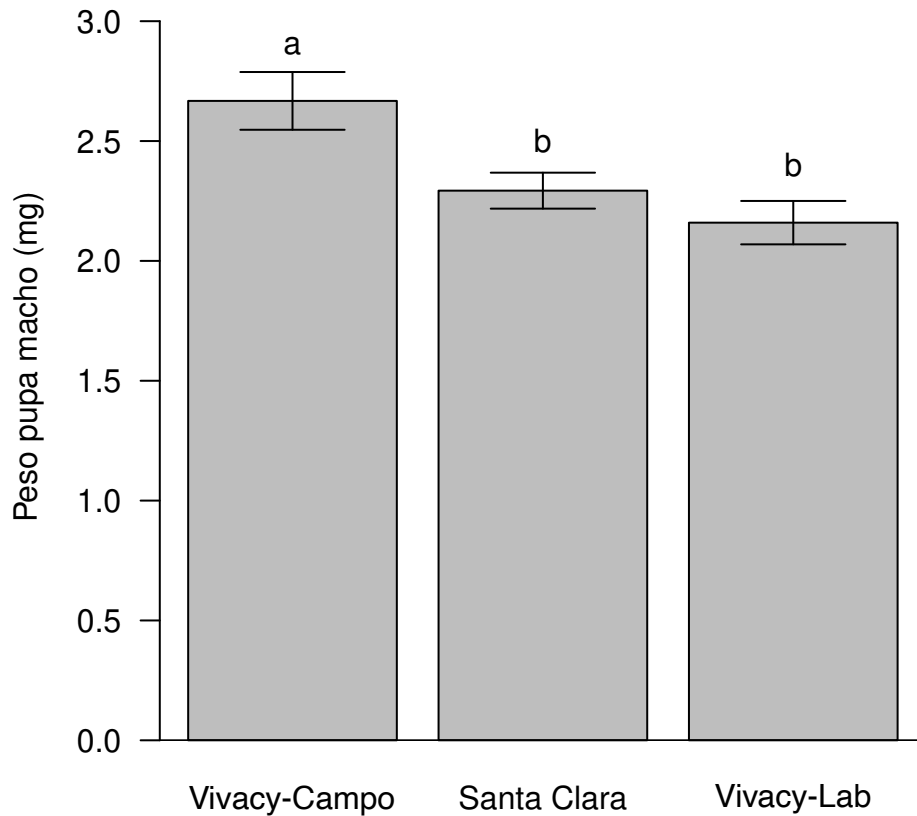


Figura 4: Peso de pupas machos de *Tuta absoluta* obtenidos de larvas alimentadas con variedades de tomate Santa Clara y Vivacy obtenidas en laboratorio (Vivacy-Lab) y colectadas en campo (Vivacy-Campo). Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Tamaño del espermatozoido y cópulas consecutivas de los machos

El tamaño del espermatozoido formado durante la cópula en cada apareamiento (del primero al cuarto apareamiento) fue afectado por el historial de apareamiento del macho ( $F= 326,17$ ;  $p < 0,0001$ ), y la alimentación que recibieron ( $F= 25,36$ ;  $p < 0,0001$ ). Los machos colectados en campo (Vivacy-campo) produjeron espermatozoides más grandes que aquellos machos alimentados con las variedades Santa Clara y Vivacy obtenidas del laboratorio (Figura 5).

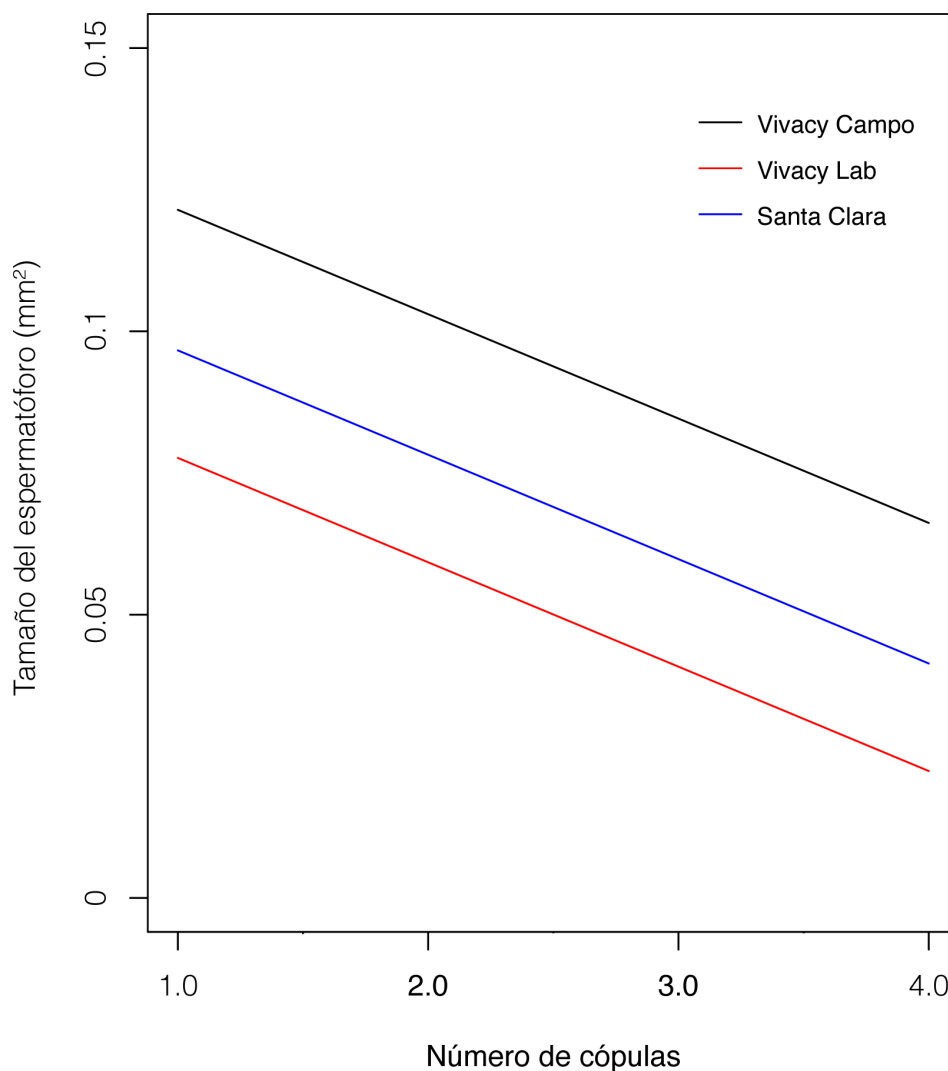


Figura 5: Relación entre el tamaño de los espermatozoides producidos por machos de *Tuta absoluta* alimentados con distintas variedades de tomate (Santa Clara, Vivacy-Laboratório y Vivacy-Campo), provenientes de la primera, segunda, tercera y cuarta cópula representadas por tres rectas distintas. El tamaño del espermatozoido corresponde al valor del área del espermatozoido en  $mm^2$ .

#### 4.2.3. Efecto del peso de la pupa en el tamaño del espermatozoido del macho

El peso de la pupa macho influyo en el tamaño del espermatozoido formado durante la cópula, independientemente de la alimentación que recibieron las larvas ( $F= 5,01$ ;  $p= 0,03$ ). Los machos colectados en campo (Vivacy-campo) y con mayor peso pupal transfirieron a las hembras espermatozoidos de mayor tamaño en comparación a aquellos machos que fueron obtenidos en laboratorio y alimentados con las variedades de tomate Santa Clara ( $p < 0,001$ ) y Vivacy ( $p= 0,0036$ ) (Figura 6).

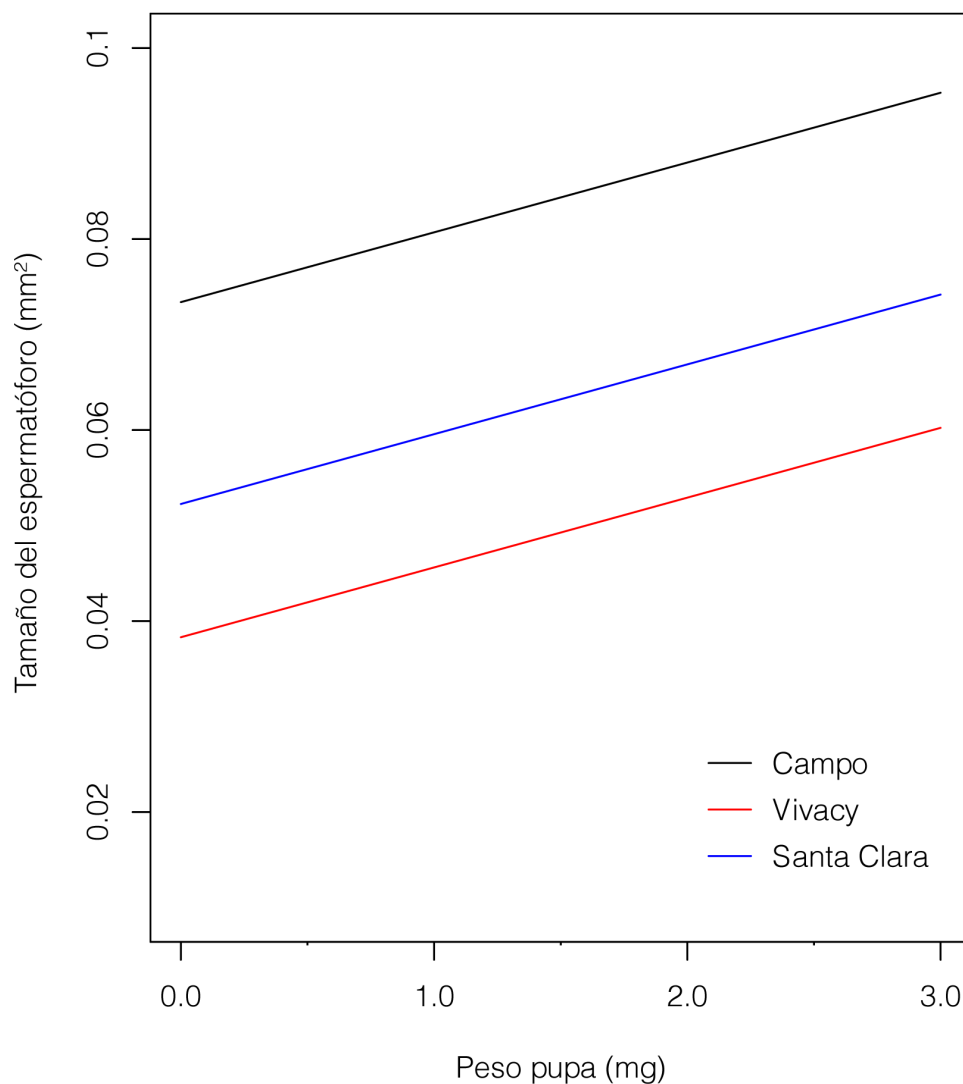


Figura 6: Efecto del peso de la pupa macho (mg) de *Tuta absoluta* en el tamaño del espermatozoido. El tamaño del espermatozoido corresponde al valor del área del espermatozoido en  $mm^2$ .

#### 4.2.4. Competición larval

La densidad larval no influyo en el peso de la pupa macho (mg) ( $F_{(2;91)}; p = 0,43$ ) (Figura 7). La proporción de pupas colectadas muestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $\chi^2 = 44,61; p = 0,03$ ). Sin embargo, la proporción de pupas colectadas en los tratamientos con 15 y 5 larvas muestran diferencias significativas (Figura 8).

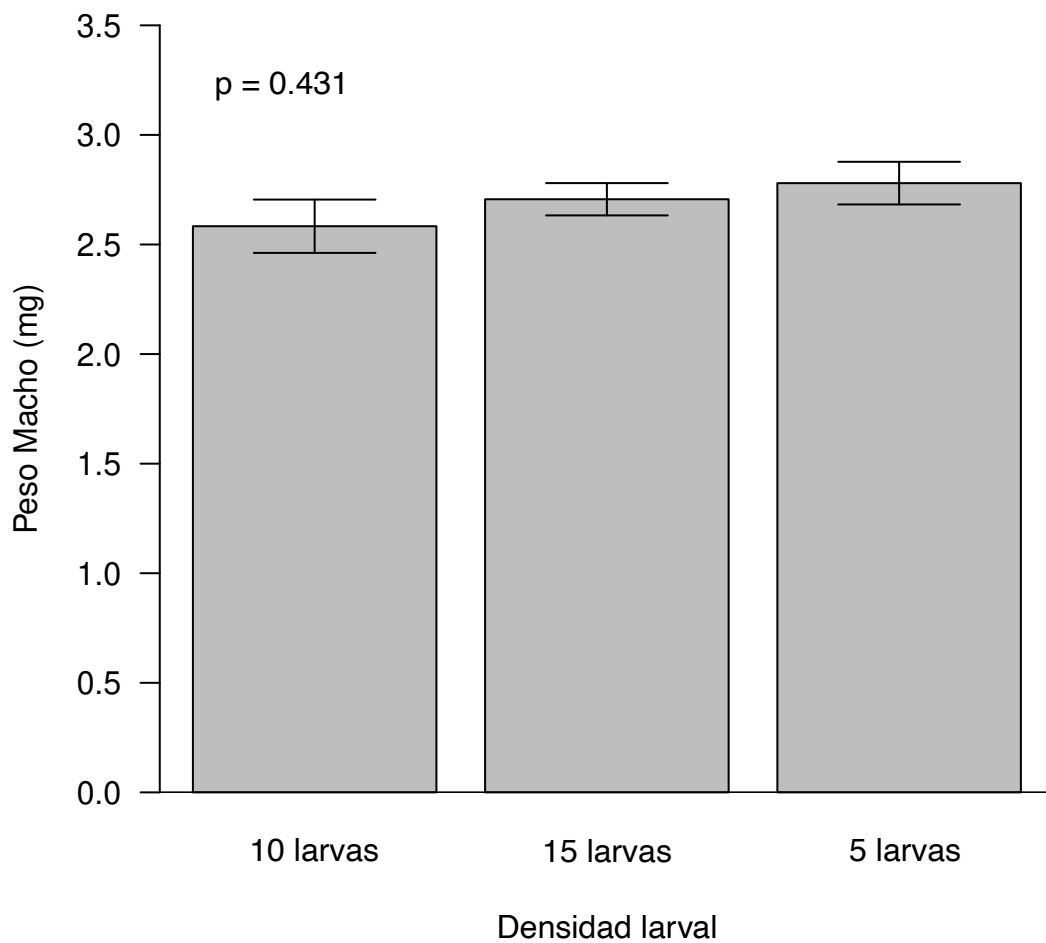


Figura 7: Peso de pupas machos (mg) de *T. absoluta* cuando criadas en densidades de 5, 10 y 15 larvas/folículo.

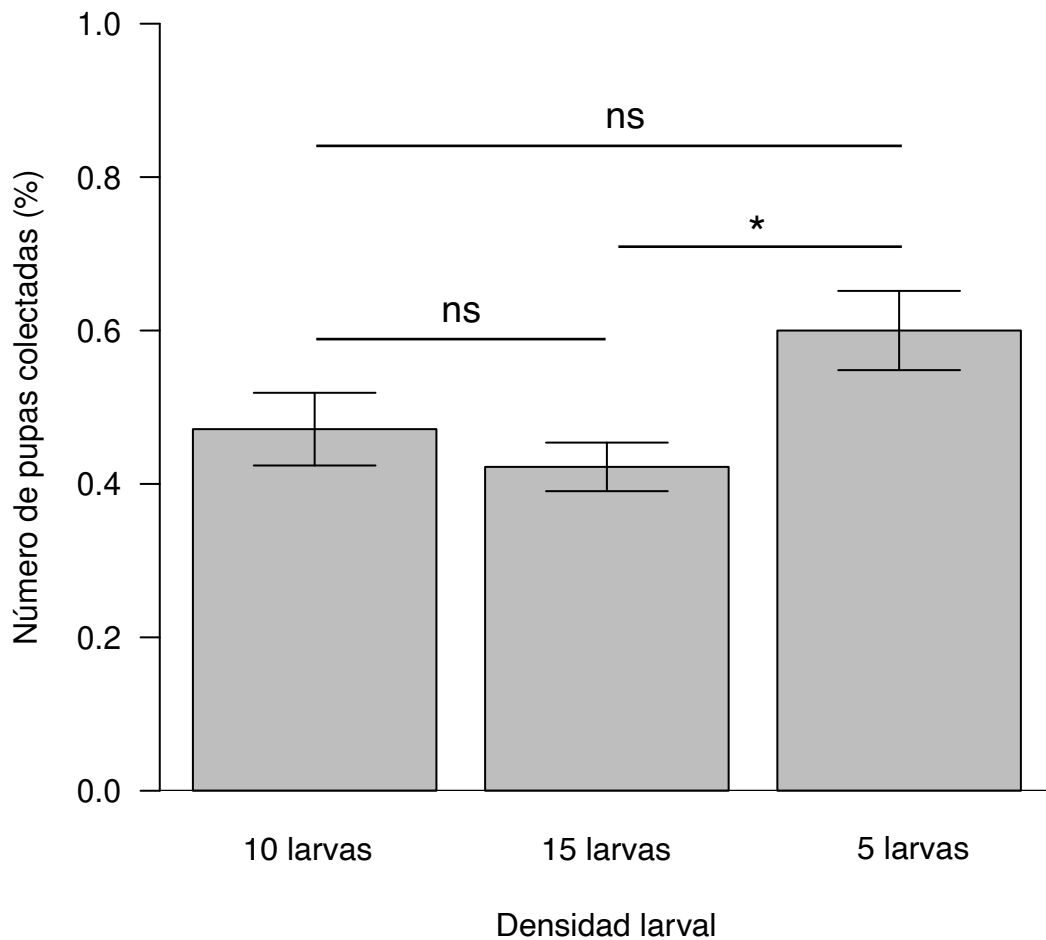


Figura 8: Número de pupas colectadas en densidades de 5,10,15 larvas de *T. absoluta*. \* indica diferencia entre los tratamientos, n. s.= no significativo.

#### 4.3. Competición entre feromonas sexuales sintéticas y feromonas provenientes de hembras vírgenes

La proporción de machos vírgenes y apareados colectados en campo fue influenciado por la feromona sexual de 1 componente (compuesto sintético mayoritario o TDTA), 2 componentes (compuesto sintético mayoritario + compuesto sintético minoritario o TDDA) y feromona sexual natural producidas por hembras vírgenes ( $\chi^2 = 436,41; p = 0,0001$ ). La proporción de machos colectados en campo de tomate con trampas cebadas con feromona sexual de 1 componente muestra que el 68% de los individuos colectados eran machos apareados y el 32% machos vírgenes. Trampas cebadas con 2 componentes (TDTA + TDDA) muestran que el 48% de los individuos colectados eran machos vírgenes

y 52% machos apareados, mientras que trampas de feromona sexual emitidas por hembras vírgenes muestra que el 33% de los individuos colectados eran machos eran vírgenes y el 67% de los machos de *T. absoluta* eran apareados (Figura 9). El Método de la Media de la Primera y Segunda Cópula (MMPSC) fue utilizado para determinar el estado de apareamiento de los machos.

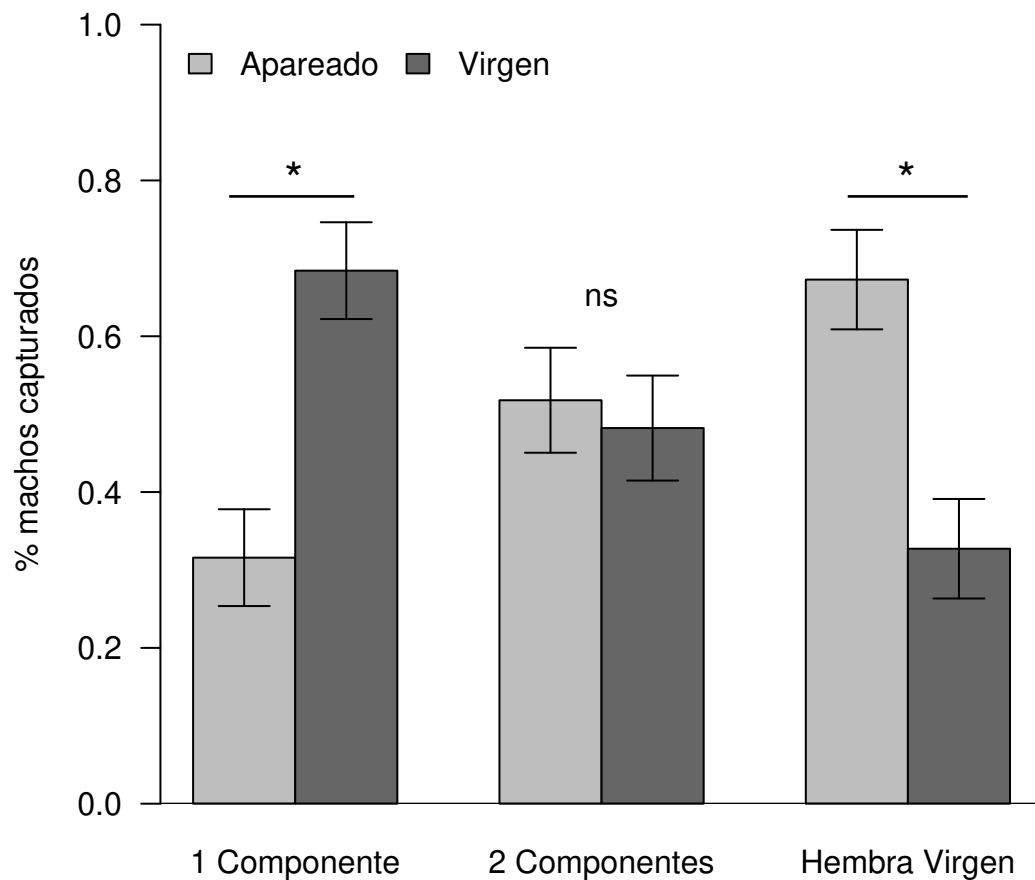


Figura 9: Proporción de machos vírgenes y apareados colectados en campo de tomate utilizando septums comerciales cebados con los atrayentes: TDTA (compuesto sintético mayoritario o de 1 componente), TDTA + TDDA (compuesto sintético mayoritario + compuesto sintético minoritario o de 2 componentes) y feromona sexual natural (hembras vírgenes). El Método de la Media de la Primera y Segunda Cópula (MMPSC) fue utilizado para determinar el estado de apareamiento de los machos. \* indica diferencia entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ), n. s. = no significativo.

## 5. Discusión

En Lepidoptera los machos forman un espermatóforo durante la cópula, el cual contiene espermatozoides, hormonas y nutrientes; así mismo, el espermatóforo puede contribuir a la producción de huevos y al mantenimiento somático (Boogs and Gilbert, 1979; Man, 1984). Esto sugiere que el tamaño del espermatóforo es un determinante clave en la reproducción (Muller et al., 2015). Por otra parte, los nutrientes adquiridos durante las etapas larvarias pueden pasar directamente al espermatóforo, afectando su masa, tamaño y contenido (Lederhouse et al., 1990; Muller et al., 2015). Los espermatóforos, parecen haber evolucionado a través de la selección sexual que actúa sobre los machos para retrasar la reproducción de las hembras para aumentar la tasa de puesta de huevos (Torres-Vila and Jennions, 2005).

### 5.1. Métodos para determinar el estado de apareamiento de machos de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) colectados en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*)

El establecimiento de un método para determinar el estado de apareamiento del macho de *T. absoluta* es una herramienta útil para entender las fallas del monitoreo y la colecta masiva de esta plaga. El tamaño de espermatóforo es un buen indicador para determinar el estado de apareamiento de machos de *T. absoluta*, como lo demuestran los resultados obtenidos en este trabajo. Así mismo, experimentos con esta misma especie también demuestran una reducción significativa del tamaño del espermatóforo de primera a segunda cópula (Lôbo, 2005; Silveira, 2020). Otras especies de Lepidoptera también muestran este mismo patrón en el tamaño del espermatóforo (Watanabe and Hirota, 1999; Lewis and Wedell, 2007; Blanco et al., 2009; Tigreros, 2013). Por tanto, podemos considerar el espermatóforo de la primera cópula como proveniente de un macho virgen y el espermatóforo de segunda cópula como proveniente de un macho apareado.

En *T. absoluta* la única fuente de acumular reservas de energía es en la fase de larva (Silva, 2008; Lôbo, 2005), lo que mostraría que los adultos dependen principalmente de las reservas acumuladas durante la alimentación en estado de larva y en su fase adulta su único objetivo sería buscar una pareja para la reproducción. Esto hace más confiable en utilizar el tamaño del espermatóforo para determinar el estado de apareamiento de los machos de *T. absoluta* en campo.

Nuestros resultados muestran claramente una diferencia significativa en la proporción de machos vírgenes y apareados que son atraídos por la trampa que contiene hembras vír-

genes. Los métodos que se utilizaron para identificar el estado de apareamiento del macho son dos que se expusieron en la metodología. Estos métodos hicieron posible diferenciar la proporción de machos vírgenes y apareados utilizando como referencia el tamaño de espermátforo de primera a cuarta cópula producidos por individuos colectados en campo.

El Método de la Media de la Primera y Segunda Cópula (MMPSC) mostró ser el más indicado para ser utilizado en futuros experimentos para diferenciar machos vírgenes y apareados colectados en campo. Este método fue seleccionado observando la dispersión de los datos en comparación con el Método de la Media de la Primera Cópula (MMPC). El MMPSC muestra una menor dispersión de datos por consecuencia la desviación estándar es menor que en el MMPC lo que se traduce en un menor error estándar. El MMPSC muestra alta significancia entre los estados de apareamiento de virgen y apareado que a comparación del MMPC que muestran una menor significancia.

## **5.2. Competición entre feromonas sexuales sintéticas y hembras en la colecta de machos de *T. absoluta* en campos de tomate (*Solanum lycopersicum*)**

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo se relacionan con el trabajo de Lôbo (2005), quien colectó en campo una mayor proporción de machos vírgenes en trampas cebadas con el atrayente sintético mayoritario. Trampas cebadas con el atrayente sintético de dos componentes y extracto de glándula capturaron proporciones próximas de machos vírgenes y apareados en campo. Sin embargo, debemos considerar que para diferenciar los estados de apareamiento de los machos colectados en campo, Lôbo (2005) utilizó una metodología distinta a la del presente trabajo. Nuestros resultados también se asemejan a los de Speridião (2020), quien demuestra, en experimentos en túnel de viento, que los machos viejos llegan más rápido al extracto de la glándula y los machos jóvenes llegan en mayor proporción a los atrayentes sintéticos.

Lôbo (2005); Speridião (2020) utilizaron en sus experimentos el extracto de la glándula de la hembra como feromona natural. En cambio, en este trabajo utilizamos hembras vivas que fueron introducidas en jaulas y llevadas a campo para realizar la colecta de los machos. Por este hecho se podría suponerse que las hembras vírgenes, jóvenes (Silva, 2008; Domínguez et al., 2019) y en presencia de la planta huésped (contacto físico y olfato de los volátiles de la planta) (Domínguez et al., 2019) produjeron una mayor cantidad de cada componente de la feromona sexual. Esto podría explicar porque en nuestros experimentos la feromona natural (hembras vírgenes) atrajo en mayor proporción machos

apareados que machos vírgenes.

El Método de la Media de la Primera y Segunda Cópula (MMPSC) hace posible identificar que una mayor proporción de machos apareados de *T. absoluta* consiguen llegar a la fuente de la feromona sexual producida por hembras vírgenes. Este resultado podría estar asociado a la experiencia sexual de los machos apareados en comparación a los machos vírgenes (Milonas et al., 2011; Perez-Staples et al., 2008), lo que sugiere que los machos adquieren una experiencia sexual importante para su futura conducta de cortejo, entonces la experiencia previa de apareamiento podría indicar que estos machos ya han sido compañeros exitosos y es más probable que vuelvan a aparearse (Dukas, 2005; Milonas et al., 2011). Nuestros resultados también se confirman en ensayos con *T. absoluta* que muestran que los machos apareados después de ser expuestos previamente al compuesto mayoritario TDTA presentan mayor sensibilidad al TDTA en comparación con machos vírgenes (Domínguez et al., 2019).

En *T. absoluta* las hembras son poliándricas (Lee et al., 2014), a través de la polian-dria las hembras obtienen beneficios de recursos como más espermatozoides, nutrientes (Meade et al., 2017; King, 2018), beneficios genéticos como la diversidad genética de la descendencia y buenos genes para aumentar la aptitud de la descendencia (Torres-Vila, 2013; Li et al., 2014; Rafter et al., 2018). La preexposición previa a la feromona generalmente resulta en una reducción de la atracción masculina por la feromona (Judd et al., 2005) lo que ocasionaría una mayor competencia con el atrayente sintético y así con una experiencia previa los machos conseguirían diferenciar los atrayentes sintéticos de las feromonas sexuales producida por las hembras.

Los resultados muestran que el atrayente sintético de 1 componente atrajo en mayor proporción machos vírgenes que machos apareados, lo que indicaría que machos de *T. absoluta* son promiscuos y poligínicos (Silva, 2008) lo cual a fin de encontrar una pareja y sin experiencia previa serían atraídos fácilmente por el atrayente sintético de 1 componente. En cambio, con el atrayente sintético de 2 componentes fueron colectados una proporción similar de machos vírgenes y apareados. Esto sugiere, que el atrayente sintético de 2 componentes es más atractivo para los machos de *T. absoluta* en comparación con el atrayente de 1 componente (componente mayoritario) (Svatoš et al., 1996). La adición de los compuestos secundarios generalmente sinergizan/modulan la respuesta del componente principal (Domínguez et al., 2019) y en consecuencia se incrementaría la proporción de captura de machos en diferentes estados de apareamiento (Lôbo, 2005).

Los resultados obtenidos muestran diferencias en la proporción de machos colectados utilizando los atrayentes sintéticos y feromona sexual natural (hembras vírgenes). Esto

sugiere una competencia entre los atrayentes sintético y la hembra, indicando que machos vírgenes serían atraídos por los compuestos sintéticos y los machos apareados estarían apareándose con las hembras en el campo de tomate en presencia de los atrayentes sintéticos. Es decir, machos de *T. absoluta* expuestos previamente a la feromona sexual podrían diferenciar entre los atrayentes sintéticos y las feromonas sexuales provenientes de una hembra.

### 5.3. Factores que influyen en el tamaño del espermátforo del macho de *T. absoluta*

Nuestros resultados proporcionan evidencia de que la alimentación larval de *T. absoluta* en diferentes variedades de tomate (Santa Clara, Vivacy-laboratorio y Vivacy-campo) influyó en el tamaño del espermátforo. Esto estaría relacionado con el peso de las pupas del macho, lo cual mostraría que la alimentación que recibieron (variedades de tomate Santa Clara y Vivacy) y el ambiente de donde fueron colectadas (campo de tomate y laboratorio) influyó en el peso de los machos y en consecuencia en el tamaño del espermátforo.

El tamaño del espermátforo producido por los machos de *T. absoluta* disminuyó con el número de cópulas, independiente de la variedad de tomate utilizada durante la alimentación larval (Santa Clara, Vivacy-laboratorio y Vivacy-campo), lo que confirma que la producción del espermátforo por el macho es costosa (Vahed, 1998). Esto supone que el apareamiento múltiple del macho puede resultar en el agotamiento de componentes específicos de la eyaculación (Perez-Staples et al., 2008). Este patrón se ha demostrado en varias otras especies de Lepidoptera como *Papilio machaon* (Papilionidae), *Choristoneura rosaceana* (Tortricidae), *Pieris rapae* (Pieridae), *Heliothis virescens* (Noctuidae) y *Bicyclus anynana* (Nymphalidae) (Svärd and Wiklund, 1986; Delisle and Bouchard, 1995; Lewis and Wedell, 2007; Blanco et al., 2009; Tigreros, 2013).

Los machos colectados en campo (Vivacy-campo) de tomate produjeron espermátforos de mayor tamaño en comparación con los machos alimentados con la variedad Vivacy y Santa Clara establecidas en laboratorio. Esto muestra que el tamaño del espermátforo está relacionado con la nutrición de las larvas, lo que resulta en una relación positiva entre el tamaño del espermátforo y el peso del macho (Watanabe and Hirota, 1999; Lewis and Wedell, 2007; Moreau et al., 2007; French-Wade and Hammack, 2012; Tigreros, 2013; Silveira, 2020). Este mismo hecho se mostró en *T. absoluta* donde machos más pesados transfirieron espermátforos de mayor tamaño que aquellos de menor peso (Silveira, 2020).

El peso del macho estaría relacionado en que los machos de menor peso tienen menos reservas de energía que los machos más grandes (Muller et al., 2016). Este mismo patrón

fue observado en este estudio, donde los machos más pesados produjeron espermatozoides más grandes teniendo en cuenta la alimentación que recibieron durante la etapa larval y el ambiente donde crecieron (campo de tomate, laboratorio).

El tamaño del espermatozoides producido por los machos colectados en campo (Vivacy-campo) de tomate muestra diferencias notorias respecto a aquellos alimentados con la variedad Santa Clara y Vivacy establecidas en laboratorio. Esto se debe a que las pupas macho que se colectaron en campo tuvieron mayor peso que aquellas pupas que se obtuvieron de larvas alimentadas con la variedad Santa Clara y Vivacy-laboratorio. Los factores que pudieron afectar el peso de las pupas macho estarían relacionados con la calidad del alimento que recibieron durante la fase de larva (Delisle and Bouchard, 1995; Delisle and Hardy, 1997), la variedad del cultivo (Muller et al., 2015, 2016; Awmack and Leather, 2002), las variaciones ambientales ( como fluctuaciones de temperatura en campo) (Petersen et al., 2000; Awmack and Leather, 2002; Rodrigues and Moreira, 2004; Clissold and Simpson, 2015), la aplicación de insecticidas (Biddinger et al., 2006; Aynalem, 2018), entre otros.

El lugar o ambiente donde se colectaron las pupas son un factor a considerar , las poblaciones de *T. absoluta* alimentadas con las variedades Santa Clara y Vivacy fueron establecidas en laboratorio con humedad y temperatura controladas. Las variedades de tomate también fueron establecidas en un invernadero con humedad y temperatura controladas. En cambio, las pupas y larvas de ultimo instar colectadas en campo de tomate la situación en donde se desarrollaron las plantas de tomates y la plaga es diferente, porque las condiciones agroclimáticas no se pueden controlar. Las condiciones en campo como la disponibilidad de nutrientes, condiciones ambientales (Ponlawat and Harrington, 2007) podrían haber influenciado en el peso de los machos y en consecuencia en el tamaño del espermatozoides.

En nuestros resultados mostramos que la competencia interespecífica no influyó en el peso de las pupas del macho. Esto puede deberse a la mortalidad de las larvas durante los experimentos. Estos resultados se confirman en experimentos no publicados que mediante colectas realizadas en campo de tomate muestra que no hubo diferencia en el tamaño de las alas de los machos, este método es un buen método para observar el tamaño de un adulto en lepidópteros (Miller, 1977).

Las variedades de tomate también son un factor a considerar en el peso del macho. La variedad Santa Clara favorece el desarrollo de *T. absoluta* (Bogorni and Carvalho, 2006), pero nuestros resultados muestran que las plantas de tomate Santa Clara provenientes de invernadero influyeron en la calidad de la planta y, en consecuencia, en el desarrollo

de los machos. Esto fue reflejado en el menor peso pupal de los machos en comparación de aquellas pupas colectados en campo de tomate y el cual también fue reflejado en el tamaño del espermatozoido. Por tanto, el tamaño del espermatozoido depende fundamentalmente de la acumulación de recursos durante la etapa larvaria. La cantidad y la calidad de los alimentos ingeridos por la larva (Delisle and Bouchard, 1995) influyen fuertemente en el almacenamiento de recursos que se asignan a la reproducción (Awmack and Leather, 2002). Este conjunto de factores afecta en el peso de las pupas del macho y en consecuencia en el tamaño del espermatozoido del macho en *T. absoluta* como lo demuestran los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Nuestros resultados muestran que el tamaño del espermatozoido de los machos de *T. absoluta* estuvo influenciado por la alimentación (variedades del tomate Santa Clara, Vivacy), el ambiente donde se desarrollaron las l (laboratorio, campo de tomate), número de cópulas y peso del macho. Los machos colectados en campo es probable que tengan más reservas para invertir en su reproducción debido a su mayor peso, en comparación con machos cuyas larvas fueron alimentadas con la variedad Santa Clara y Vivacy provenientes de laboratorio. Por tanto, los resultados sugieren que los individuos de poblaciones de *T. absoluta* provenientes de campos de tomate no son iguales en peso a aquellos individuos provenientes de poblaciones establecidas en laboratorio. Los resultados demuestran que el tamaño del espermatozoido puede ser utilizado para determinar el estado reproductivo de los machos de *T. absoluta* colectados en campo.

## Referencias

- Attygalle, A. B., Jham, G. N., Svatoš, A., Frighetto, R. T., Ferrara, F. A., Vilela, E. F., Uchôa-Fernandes, M. A., and Meinwald, J. (1996). (3E, 8Z, 11Z)-3, 8, 11-Tetradecatrienyl acetate, major sex pheromone component of the tomato pest *Scrobipalpuloides absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4(3):305–314.
- Attygalle, A. B., Jham, G. N., Svatoš, A., Frighetto, R. T., Meinwald, J., Vilela, E. F., Ferrara, F. A., and Uchôa-Fernandes, M. A. (1995). Microscale, random reduction: application to the characterization of (3e, 8z, 11z)-3, 8, 11-tetradecatrienyl acetate, a new lepidopteran sex pheromone. *Tetrahedron Letters*, 36(31):5471–5474.
- Awmack, C. S. and Leather, S. R. (2002). Host Plant Quality and Fecundity in Herbivorous Insects. *Annual Review of Entomology*, 47:817–844.
- Aynalem, B. (2018). Tomato leafminer [(*Tuta absoluta* Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)] and its current ecofriendly management strategies: A review. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 10:11–24.
- Barrientos, Z., H.J., A., Norero, S., and Estay, P. (1998). Threshold temperature and thermal constant for development of the South American tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ciencia e Investigacion Agraria*, 25:133–137.
- Biddinger, D., Hull, L., Huang, H., Mcpheron, B., and Loyer, M. (2006). Sublethal Effects of Chronic Exposure to Tebufenozide on the Development, Survival, and Reproduction of the Tufted Apple Bud Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 99:834–842.
- Biondi, A., Guedes, R. N. C., Wan, F.-H., and Desneux, N. (2019). 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.
- Bissoondath, C. J. and Wiklund, C. (1996). Effect of male mating history and body size on ejaculate size and quality in two polyandrous butterflies, *Pieris napi* and *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Functional Ecology*, 10:457–464.
- Blanco, C. A., Rojas, M. G., Groot, A. T., Morales-Ramos, J., and Abel, C. A. (2009). Size and Chemical Composition of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) Spermatophores. *Annals of the Entomological Society of America*, 102:629–637.
- Bogorni, P. and Carvalho, G. (2006). Biology of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in different *Lycopersicon esculentum* Mill cultivars. *Bioikos*, 20:49–61.

- Boogs, C. and Gilbert, L. (1979). Male contribution to egg production in butterflies: evidence for transfer of nutrients at mating. *Science*, 206:83–84.
- Clissold, F. J. and Simpson, S. J. (2015). Temperature, food quality and life history traits of herbivorous insects. *Current Opinion in Insect Science*, 11:63–70.
- Cocco, A., Deliperi, S., Delrio, G., et al. (2012). Potential of mass trapping for *Tuta absoluta* management in greenhouse tomato crops using light and pheromone traps. *Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate IOBC-WPRS Bulletin*, 80:319–324.
- Coelho, M. d. C. and França, F. H. (1987). Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 22:129–135.
- Delisle, J. and Bouchard, A. (1995). Male larval nutrition in *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae): an important factor in reproductive success. *Oecologia*, 104(4):508–517.
- Delisle, J. and Hardy, M. (1997). Male larval nutrition influences the reproductive success of both sexes of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Functional Ecology*, 11:451–463.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K. A. G., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C. A., González-Cabrera, J., Ruescas, D. C., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T., and Urbaneja, A. (2010). Biological invasión of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal Pest Science*, 83:197–215.
- Domínguez, A., López, S., Bernabé, A., Guerrero, Á., and Quero, C. (2019). Influence of age, host plant and mating status in pheromone production and new insights on perception plasticity in *Tuta Absoluta*. *Insects*, 10(8):256.
- Dukas, R. (2005). Experience improves courtship in male fruit flies. *Animal Behaviour*, 69:1203–1209.
- Ferrara, F. A., Vilela, E. F., Jham, G. N., Eiras, Á. E., Picanço, M. C., Attygalle, A. B., Svatos, A., Frighetto, R. T., and Meinwald, J. (2001). Evaluation of the synthetic major component of the sex pheromone of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Chemical Ecology*, 27(5):907–917.
- French-Wade, B. F. and Hammack, L. (2012). Spermatophore Size in Relation to Body Size and Pairing Duration in Northern Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 105(3):506—511.

- Genc, H. (2016). The tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae): Pupal key characters for sexing individuals. *Journal of Zoology*, 40:801–805.
- Guedes, R. N. C. and Siqueira, H. A. A. (2012). The tomato borer *Tuta absoluta*: insecticide resistance and control failure. *Plant Sciences Reviews*, 7:1–7.
- Judd, G. J., Gardiner, M. G., DeLury, N. C., and Karg, G. (2005). Reduced antennal sensitivity, behavioural response, and attraction of male codling moths, *Cydia pomonella*, to their pheromone (E,E)-8,10-dodecadien-1-ol following various pre-exposure regimes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114:65–78.
- King, B. H. (2018). Benefit of polyandry in a highly monandrous species when females mate with already mated males. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 72.
- Lederhouse, R. C., Ayres, M. P., and Scriber, J. M. (1990). Adult Nutrition Affects Male Virility in *Papilio glaucus* L. *Functional Ecology*, 4:743–751.
- Lee, M. S., Albajes, R., and Eizaguirre, M. (2014). Mating behaviour of female *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): polyandry increases reproductive output. *Journal of Pest Science*, 87:429–439.
- Lewis, Z. and Wedell, N. (2007). Effect of adult feeding on male mating behaviour in the butterfly, *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Insect Behavior*, 20:201–213.
- Li, Y.-Y., Yu, J.-F., Lu, Q., Xu, J., and Ye, H. (2014). Female and male moths display different reproductive behavior when facing new versus previous mates. *PLoS One*, 2014(10).
- Lôbo, A. P. (2005). *Interfêrencia de componentes do feromônio sexual, densidades de armadilhas e do estado reprodutivo de machos de Tuta absoluta (Meyrick, 1917) na coleta massal*. PhD thesis, Universidade Federal de Lavras (Brasil).
- Man, T. (1984). *Spermatophores: development, structure, biochemical attributes and role in the transfer of spermatozoa*.
- Meade, L., Harley, E., Cotton, A., Howie, J. M., Pomiankowski, A., and Fowler, K. (2017). Variation in the benefits of multiple mating on female fertility in wild stalk-eyed flies. *Ecology and Evolution*, 7:10103–10115.
- Michereff-Filho, M. and Vilela, E. (2001). *Traça do tomateiro, Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae*. Ribeirão Preto, Holos.

- Michereff Filho, M., Vilela, E. F., Jham, G. N., Attygalle, A., Svatos, A., and Meinwald, J. (2000). Initial studies of mating disruption of the tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) using synthetic sex pheromone. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11(6):621–628.
- Miller, W. E. (1977). Wing Measure as a Size Index in Lepidoptera: the Family Olethreutidae. *Annals of the Entomological Society of America*, 70:253–256.
- Milonas, P. G., Farrell, S. L., and Andow, D. A. (2011). Experienced males have higher mating success than virgin males despite fitness costs to females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65(6):1249–1256.
- Moreau, J., Thiery, D., Troussard, J. P., and Benrey, B. (2007). Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecological Entomology*, 32:747–753.
- Muller, K., Thiery, D., Moret, Y., and Moreau, J. (2015). Male larval nutrition affects adult reproductive success in wild european grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69:39–47.
- Muller, K., Thiéry, D., Motreuil, S., and Moreau, J. (2016). What makes a good mate? factors influencing male and female reproductive success in a polyphagous moth. *Animal Behaviour*, 120:31–39.
- Pereyra, P. C. and Sánchez, N. E. (2006). Effect of two solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*(Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, 35:671–676.
- Perez-Staples, D., Aluja, M., Macías-Ordóñez, R., and Sivinski, J. (2008). Reproductive trade-offs from mating with a successful male: the case of the tephritid fly *Anastrepha obliqua*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(8):1333–1340.
- Petersen, C., Woods, H. A., and Kingsolver, J. G. (2000). Stage-specific effects of temperature and dietary protein on growth and survival of *Manduca sexta* caterpillars. *Physiological Entomology*, 25:35–40.
- Ponlawat, A. and Harrington, L. C. (2007). Age and Body Size Influence Male Sperm Capacity of the Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44:422–426.
- Rafter, M. A., McCulloch, G. A., Daghli, G. J., Gurdasani, K., and Walter, G. H. (2018). Polyandry, genetic diversity and fecundity of emigrating beetles: Understanding new foci of infestation and selection. *Journal of Pest Science*, 91:287–298.

- Rodrigues, D. and Moreira, G. R. P. (2004). Seasonal variation in larval host plants and consequences for *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) adult body size. *Austral Ecology*, 29:437–445.
- Santana, P., Kumar, L., Da Silva, R., and Picanço, M. (2019). Global geographic distribution of *Tuta absoluta* as affected by climate change. *Journal of Pest Science*, 92:1373–1385.
- Silva, S. S. (2008). Fatores da biologia reprodutiva que influenciam o manejo comportamental de *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae). Master's thesis, Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil).
- Silveira, P. I. (2020). Avaliação do estado de acasalamento em machos de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) em função do tamanho do espermatóforo. Master's thesis, Universidade Federal de Viçosa (Brasil).
- Speridião, S. V. E. (2020). Efeito da qualidade do macho na resposta ao feromônio sexual em *Tuta absoluta*. Master's thesis, Universidade Federal de Viçosa (Brasil).
- Svatoš, A., Attygalle, A. B., Jham, G. N., Frighetto, R. T., Vilela, E. F., Šaman, D., and Meinwald, J. (1996). Sex pheromone of tomato pest *Scrobipalpuloides absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Chemical Ecology*, 22(4):787–800.
- Svärd, L. and Wiklund, C. (1986). Different ejaculate delivery strategies in first versus subsequent matings in the swallowtail butterfly *Papilio machaon* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 18:325–330.
- Tigreros, N. (2013). Linking nutrition and sexual selection across life stages in a model butterfly system. *Functional Ecology*, 27:145–154.
- Torres-Vila, L. (2013). Polyandry-fecundity relationship in insects: Methodological and conceptual problems. *Journal of Evolutionary Biology*, 26:325–334.
- Torres-Vila, L. M. and Jennions, M. (2005). Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57:318–326.
- Uchôa, M. A., Della Lucia, T., and Vilela, E. (1995). Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyr.) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, 24(1):159–164.
- Vahed, K. (1998). The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. *Biological Reviews*, 73(1):43–78.

Watanabe, M. and Hirota, M. (1999). Effects of Sucrose Intake on Spermatophore Mass Produced by Male Swallowtail Butterfly *Papilio xuthus* L. *Zoological Science*, (16):55–61.