



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

## **NUEVO BIOENSAYO RÁPIDO PARA DETECTAR RESISTENCIA DE *Tetranychus urticae* (ACARI: TETRANYCHIDAE) A ACARICIDAS EN FRAMBUESA (*Rubus idaeus*).**

FERNANDO MARTÍNEZ HUASANCHE

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Fernando Martínez Huasanche, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis NUEVO BIOENSAYO RÁPIDO PARA DETECTAR RESISTENCIA DE Tetranychus urticae (ACARI: TETRANYCHIDAE) A ACARICIDAS EN FRAMBUESA (Rubus idaeus)

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 14 de noviembre de 2019



Firma del  
Alumno (a)

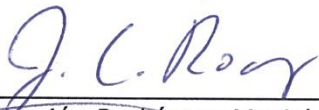
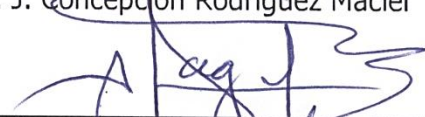

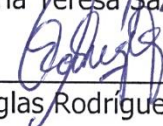


Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **"NUEVO BIOENSAYO RÁPIDO PARA DETECTAR RESISTENCIA DE *Tetranychus urticae* (ACARI: TETRANYCHIDAE) A ACARICIDAS EN FRAMBUESA (*Rubus idaeus*)"** realizada por el alumno: **Fernando Martínez Huasanche** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____
	Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel
ASESOR	 _____
	Dr. Ángel Lagunes Tejeda
ASESORA	 _____
	Dra. María Teresa Santillán Galicia
ASESOR	 _____
	Dr. Douglas Rodríguez Martínez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2019

# NUEVO BIOENSAYO RÁPIDO PARA DETECTAR RESISTENCIA DE *Tetranychus urticae* (ACARI: TETRANYCHIDAE) A ACARICIDAS EN FRAMBUESA (*Rubus idaeus*)

Fernando Martínez Huasanche, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2019

## RESUMEN

La detección temprana de resistencia a acaricidas de poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) es importante para la implementación de métodos de control eficientes. Las metodologías actuales para detectar la resistencia en laboratorio requieren de la exposición a acaricidas durante 24 a 72 h. Nuestro objetivo fue diseñar un método confiable más rápido que el actual. Modificamos el método existente del Comité de Acción de Resistencia a los Insecticidas (IRAC) para obtener resultados en menos de cuatro horas. Los experimentos se realizaron utilizando una población de laboratorio susceptible de *T. urticae* y una población de campo de frambuesa *Rubus idaeus* L., obtenida en Tlazazalca, estado de Michoacán, México. Se evaluó la susceptibilidad a los acaricidas abamectina, acequinocyl, fenpropatrin, monolaurato de propilenglicol y bifenazate. Se obtuvieron resultados confiables en menos de 30 minutos para todos los acaricidas, excepto bifenazate, para los cuales se obtuvieron resultados en 3.5 h. Para la abamectina, la resistencia relativa (RR) de la población de campo en comparación con la colonia susceptible alcanzó valores de 13,99 x (RR50) y 6,5 x (RR95). Para bifenazate, los valores RR50 y RR95 fueron 14.9 x y 12.9 x, respectivamente. Para todos los demás acaricidas, los valores de RR fueron inferiores a 10 x.

**Palabras clave:** araña roja, frambuesa, bioensayo rápido.

**NEW RAPID BIOASSAY TO DETECT RESISTANCE OF *Tetranychus urticae*  
(ACARI: TETRANYCHIDAE) TO ACARICIDES IN RASPBERRY (*Rubus idaeus*)**

**Fernando Martínez Huasanche, M C.  
Colegio de Postgraduados, 2019**

**ABSTRACT**

Early detection of resistance to acaricides in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) populations is important for the implementation of efficient control methods. Current methodologies to detect resistance in the laboratory require exposure to acaricides for 24 to 72h. Our objective was to design a reliable method faster than the current one. We modified the existing Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) method to obtain results in less than four hours. Experiments were done using a susceptible laboratory population of *T. urticae*, and a field population from raspberry *Rubus idaeus* L., obtained in Tlazazalca, Michoacán state, México. Susceptibility to the acaricides abamectin, acequinocyl, fenpropatrin, propylene glycol monolaurate and bifentazate was evaluated. Reliable results were obtained in less than 30 min for all acaricides except bifentazate, for which results were obtained in 3.5 h. For abamectin, relative resistance (RR) of the field population compared with the susceptible colony achieved values of 13.99x (RR<sub>50</sub>) and 6.5x (RR<sub>95</sub>). For bifentazate, RR<sub>50</sub> and RR<sub>95</sub> values were 14.9x and 12.9x, respectively. For all other acaricides, the RR values were below 10x.

**Key words:** spider mite, raspberry, fast bioassay

## DEDICATORIA

A mi madre: **Celina Huasanche Francisco**

Muchas gracias mamá por apoyarme a cumplir mis metas, por estar conmigo en cada momento de mi vida, por brindarme tu cariño incondicional y ayudarme a salir adelante. Gran parte de lo que me define como persona te lo debo a ti. Te amo, mamá.

A mi padre: † **Hipólito Edilberto Martínez López**

Papá me faltan las palabras para expresarte el agradecimiento que siento por ti, me ayudaste a desarrollarme y formar mi carácter, me aconsejaste para que fuera una mejor persona y nunca me dejaste solo hasta donde pudiste, fuiste un padre ejemplar que siempre se preocupó porque no nos faltara nada a mis hermanas y a mí. Hasta el último momento de tu vida demostraste gran responsabilidad y compromiso por nuestra familia. Tu partida ha sido el momento más doloroso que he tenido, te extraño mucho, y siempre seguiré tu ejemplo.

A mis hermanas: **Lizbeth, Nalleli y Gabriela**

Gracias por apoyarme durante este proceso y aunque sé que no siempre hemos tenido los mejores momentos, el apoyo incondicional existe. Las quiero mucho.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de Posgrado. A la empresa Driscoll's Operaciones S.A de C.V., por el financiamiento de esta investigación.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme las herramientas necesarias para desarrollarme académicamente y como investigador, dentro del posgrado en Fitosanidad – Entomología y Acarología.

Al Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel por el tiempo y dedicación invertido en mi formación como investigador, por brindarme su amistad y por el liderazgo para el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Ma. Teresa Santillán Galicia por su total apoyo, consejos, y gran aporte en el proceso de identificación de *T. urticae*, personalmente agradezco la amistad y su calidad como persona.

Al Dr. Douglas Rodríguez Martínez por brindarme su apoyo y confianza para desarrollar esta investigación, por permitirme trabajar en conjunto con su equipo de trabajo y su gran aportación a este trabajo.

Al Dr. Ariel W. Guzmán Franco por su valiosa participación y apoyo con la traducción del artículo científico y sus observaciones para mejorar la tesis.

Al M.C. Ricardo Alberto Toledo Hernández por su apoyo incondicional y disponibilidad para la revisión de la tesis y el apoyo durante mi formación como Maestro en Ciencias.

Al Dr. Gabriel Otero Colina por el apoyo durante el procesamiento de ácaros para microscopía electrónica de barrido y la toma de las micrografías de *T. urticae*.

Al equipo de protección de cultivos de Driscolls, Ma. de la Luz Rojas, Arturo, Francisco, Andrea, Alejandra, y Alejandro por el soporte técnico y la selección de uno de sus campos comerciales de frambuesa.

Al productor del rancho de frambuesa Reynaldo Cabrera Oropeza y a mi amigo el Ing. Gustavo Palestino Arellano por facilitarnos la colecta de la población TUFRR de *T. urticae*.

A mi familia por su apoyo absoluto: Celina (mi mamá) a Liz, Gabriela y Nalleli (mis hermanas) y a † Hipólito (mi papá que me acompañó durante casi todo este proceso y que nunca me cansaré de agradecerle por todo lo que me enseñó, descansa en paz), los amo y siempre están y estarán presentes en mi vida.

A mis compañeros y amigos del posgrado, Karen, Nanci, Mauricio, Víctor, Oscar, Abraham, Hugo Enrique, Raquel, Janeth, Reyna, Susana, Carmen, y Adriana, Filemón, Sandra, Brenda, Verónica y Maribel Rivero por apoyarme incondicionalmente en todo momento durante esta etapa de mi vida, tanto de manera personal como profesional.



## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LIST OF TABLES.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
Literatura citada .....	5
CHAPTER I: Rapid bioassay for reliable detection of acaricide resistance in <i>Tetranychus urticae</i> Koch.....	8
1.1 ABSTRACT.....	8
1.2 INTRODUCTION .....	9
1.3 MATERIAL AND METHODS .....	10
Populations .....	10
Acaricides.....	12
Bioassay.....	12
Data analyses.....	13
1.4 RESULTS .....	14
1.5 DISCUSSION .....	14
1.6 REFERENCES .....	17
Supplementary information.....	24
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL .....	25
Literatura citada .....	29

## LISTA DE FIGURAS

- Figure 1S.** Dendrogram inferred from Maximum likelihood analyses (1,000 replicates) of COI sequences from the two *T. urticae* populations (S-LAB and TURF). Two sequences from *Panonychus* species were used as outgroups. Only bootstrap values above 80 % are shown. The bar depicts the branch length corresponding to 2% ML distance..... 24
- Figura 1.** Hembra adulta de *Tetranychus urticae*. A) Vista lateral. B) Vista fronto dorsal. C) gonoporo y ano. D) Estrías dorsales opistosomales en un patrón en forma de diamante. E) Sedas dobles. F) Onicotriquiias y empodio dividido distalmente. .... 26
- Figura 2.** Dendrograma inferido de los análisis de máxima verosimilitud (1000 réplicas) de secuencias de COI de las dos poblaciones de *T. urticae* (S-LAB y TUFR). Se usaron dos secuencias de especies de *Panonychus* como grupos externos. Solo se muestran valores de arranque superiores al 80%. La barra representa la longitud de la rama correspondiente al 2% de distancia ML. .... 27

## LIST OF TABLES

<b>Table 1.</b> Acaricides used in bioassays against adult female of <i>Tetranychus urticae</i> Koch. ....	22
<b>Table 2.</b> Response of two populations of 3 to 5 days-old adult female <i>T. urticae</i> to acaricides. ....	23

## INTRODUCCIÓN GENERAL

México es uno de los principales países productores de berries, frutillas, frutas suaves, frutos rojos o bayas, donde se incluye la frambuesa (*Rubus idaeus* L.) (Rosales: Rosaceae). Este cultivo, al igual que el resto de las berries, es de gran importancia para México ya que genera una gran cantidad de divisas al comercializarse para exportación a otros países. El número de hectáreas cultivadas de frambuesa se incrementa año tras año en México, según estadísticas del Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera la superficie sembrada del 2017 al 2018 aumentó un 21.3% (SIAP, 2019).

Para finales de septiembre de 2019 se sembraron 7,304 hectáreas de frambuesa en México, de las cuales se obtuvo un volumen de producción de 75,678 toneladas de acuerdo a la superficie cosechada, con rendimientos de 10.7 ton/ha. Del total de la superficie sembrada, el estado de Jalisco tuvo el 70.6 %, seguido por Michoacán con 16.1 % y Baja California con 10.6 % (SIAP, 2019).

Sin embargo, las limitaciones por plagas y enfermedades son constantes. El ácaro de dos manchas (*Tetranychus urticae* Koch) (Acari: Tetranychidae) es una de las plagas que más afectan el rendimiento del cultivo de frambuesa. Donde el uso de acaricidas convencionales es el método de control más utilizado por los productores para su manejo (Villegas-Elizalde *et al.*, 2010; Romero Verdín *et al.*, 2012).

*T. urticae* es un artrópodo fitófago de distribución cosmopolita que ataca a más de 140 familias de plantas que se agrupan más de 1,100 especies (Grbić *et al.*, 2011; Migeon y Dorkeld, 2017), y muchas de ellas son de importancia económica como hortalizas, árboles frutales, frutillas, ornamentales, etc. (Grbić *et al.*, 2011). *T. urticae* tiene ciclo de vida corto (10 días aproximadamente de huevo a adulto), con una alta capacidad reproductiva (108 huevos por hembra en plantas de frijol) (Uddin *et al.*, 2015); y se reproduce por partenogénesis arrenotoca (Singh, 2010). Estas características biológicas, además del uso intensivo de acaricidas para su control, le confieren elevada capacidad para desarrollar resistencia a los acaricidas (Georghiou y Taylor, 1977).

De acuerdo a la Asociación Nacional de Exportadores de Berries (ANEVERRIES, 2019) se encuentran autorizados para su aplicación en el cultivo de frambuesa diferentes acaricidas para el control de *T. urticae* como abamectina, acequinocyl, bifenazate, fenpropatrin y monolaurato de propilenglicol, entre otros.

La abamectina (avermectina B1a y B1b) es un producto de fermentación natural de la bacteria del suelo *Streptomyces avermitilis* (Hayes y Laws, 1990) que tiene una fuerte actividad insecticida, nematocida y acaricida (Putter *et al.*, 1981; Çağatay *et al.*, 2018). La abamectina actúa sobre el ácido g - aminobutírico (GABA) y los canales de cloruro activados por glutamato, lo que lleva a la activación del canal de iones cloruro a concentraciones más altas y a la parálisis y muerte de los ácaros (Blomquist, 2001; IRAC, 2019).

El acequinocyl (AKD-2023; acetato de 3-dodecil-1,4-dihidro-1,4-dioxo-2-naftilo) (IUPAC, 2019) es actualmente el único acaricida comercial del grupo análogo de naftoquinona. El acequinocyl inhibe la respiración mitocondrial en el complejo III, presenta actividad acaricida y se utiliza para el control de muchos ácaros fitófagos, entre ellos *T. urticae* (Van Nieuwenhuysse *et al.*, 2009; IRAC, 2019).

El bifenazato [D2341; isopropil 3- (4-metoxibifenil-3-il) carbazate] (IUPAC, 2019) un acaricida derivado de hidracina (Dequeyser *et al.*, 1996). Interfiere con la producción de energía en las mitocondrias inhibiendo el transporte de electrones específicamente en el complejo III (IRAC, 2019). Detiene la producción de la energía necesaria para el normal desarrollo de los diferentes estados del ciclo de vida de los ácaros (Ochiai *et al.*, 2007).

El fenpropatrin [(RS) - $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencil-2,2,3,3-tetrametilciclopropanocarboxilato] (IUPAC, 2019). Es un piretroide cuyo mecanismo de acción está basado en el bloqueo de la transmisión de los impulsos nerviosos, al interactuar con los canales de sodio (moduladores del canal de sodio) en los axones de

los nervios del sistema nervioso central y periféricos de acuerdo al IRAC, (2019) particularmente activo contra los ácaros y se ha utilizado ampliamente para el control de *T. urticae* en diversos países del mundo ((Riedl y Shearer, 1991; Han, *et al.*, 2010).

El monolaurato de propilenglicol [Dodecanoic acid, monoester with 1,2-propanediol. Lauric acid, monoester with propane-1,2-diol] es un acaricida de modo de acción desconocido de acuerdo al IRAC (2019). Actúa bloqueando los espiráculos y el desparafinado de la cutícula de la plaga; lo que causa la muerte de los ácaros por asfixia y su desecación (Arysta, 2019).

Actualmente, en poblaciones de *T. urticae*, se han documentado 516 casos de resistencia a 96 ingredientes activos (acaricidas e insecticidas) en condiciones de campo a nivel mundial (Mota-Sanchez y Wise, 2019). Entre los que destacan la resistencia a abamectina (Çağatay *et al.*, 2018; Díaz-Arias *et al.*, 2019), acequinocyl (Van Pottelberg *et al.*, 2009; Ullah, *et al.*, 2011; Salman y Saritaş, 2014), bifenazate (Khajehali, *et al.*, 2011; Tirello, *et al.*, 2012), fenpropatrin (Riedl y Shearer, 1991; Han, *et al.*, 2010)

El conocimiento del desarrollo de resistencia a los acaricidas constituye una base importante, no solo para conocer la extensión de este fenómeno y su intensidad, sino también para evaluar la eficacia de las medidas que se utilicen para su manejo. Actualmente los bioensayos para estimar las líneas Log-Dosis Probit (LD-P) se realizan con individuos de la  $F_1$ , cuyas condiciones biológicas se estandarizan como instar, edad, sexo, etc., (Yorulmaz y Ay, 2008; IRAC, 2009; Salman y Saritaş, 2014; Díaz-Arias *et al.*, 2019). Los bioensayos con *Tetranychus* spp. generalmente se realizan en hembras de 2 a 3 días (Han *et al.*, 2010) o de 3 a 5 días de edad (Ullah y Gotoh, 2013) y el registro de la mortalidad se realiza a las 24 h de la exposición a los acaricidas (Han *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018), 48 h (Kumari, *et al.*, 2017; Díaz-Arias *et al.*, 2019) o 72 h (Tirello *et al.*, 2012; Ullah y Gotoh, 2013).

Consideramos que los tiempos de exposición de las poblaciones de *T. urticae* a los acaricidas son innecesariamente muy largos. Por tanto, el objetivo de la presente

investigación fue reducir el tiempo de exposición de hembras de *T. urticae* a los acaricidas abamectina, acequinocyl, bifenazate, fenpropatrin y monolaurato de propilenglicol.

## **Objetivo e hipótesis**

### *Objetivo general:*

Reducir significativamente el tiempo de exposición de hembras de *T. urticae* a acaricidas en bioensayos de laboratorio y estimar de manera robusta las líneas Log-Dosis Probit.

### *Objetivo específico:*

Estimar las líneas Log-Dosis Probit de los acaricidas abamectina, acequinocyl, bifenazate, fenpropatrin y monolaurato de propilenglicol en hembras de *T. urticae* con bioensayos rápidos de laboratorio.

### *Hipótesis:*

Mediante bioensayos rápidos de laboratorio se pueden estimar las líneas Log-Dosis Probit para *T. urticae* de los acaricidas abamectina, acequinocyl, bifenazate, fenpropatrin y monolaurato de propilenglicol, y sentar las bases para realizar bioensayos en condiciones de campo.

## Literatura citada

- Arysta LifeScience. 2019. Acaricidas-Acaritouch. Recuperado de <http://www.arysta.com.mx/> (Consultado el 21 de octubre de 2019).
- Asociación Nacional de Exportadores de Berries (ANEBERRIES). 2019. Lista-de-plaguicidas-autorizados-aneberries-2019. Recuperado de <http://www.aneberries.mx/lista-de-plaguicidas-autorizados-aneberries-2019>. (Consultado el 24 de julio de 2019).
- Bloomquist, J. R. 2001. GABA and glutamate receptors as biochemical sites for insecticide action, in “Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance” (I. Ishaaya, Ed.), pp. 17–41, Springer-Verlag, Berlin.
- Çağatay, N. S., Menault, P., Riga, M., Vontas, J., & Ay, R. 2018. Identification and characterization of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch populations from greenhouses in Turkey. *Crop Protection*, 112, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.05.016>
- Dekeyser, M.A., McDonald, P.T., Angle, G.W. Jr., & Moore, R.C. 1996. D2341 – a novel agent to control spidermites, in Proc Brighton Crop Prot Conf – Pests Dis, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp. 487–492.
- Díaz-Arias, K.V., Rodríguez-Maciél, J. C., Lagunes-Tejeda, A., Aguilar-Mendel, S., Tejeda-Reyes, M.A., & Silva-Aguayo, G. 2019. Resistance to abamectin in field population of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) associated with cut rose from state of Mexico, Mexico. *Florida Entomologist*, 102, 428-430. <https://doi.org/10.1653/024.102.0222>
- Georghiou, G.P., & Taylor, C. E. 1977. Operational Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. *Journal of Economic Entomology*, 70, 653-658. <https://doi.org/10.1093/jee/70.5.653>
- Grić, M., Van Leeuwen, T., Clark, R.M., Rombauts, S., Rouze, P., Grbic, V., & Van de Peer, Y. (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479, 487–492. <https://doi.org/10.1038/nature10640>
- Han, J., Choi, B.R., Lee, S.G., Kim, S. I., & Ahn, Y.J. 2010. Toxicity of Plant Essential Oils to Acaricide-Susceptible and –Resistant *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Economic Entomology*, 103, 1293-1298. <https://doi.org/10.1603/EC09222>
- Hayes, W.J., & Laws, E.R. 1990. Handbook of pesticide toxicology, classes of pesticides, vol. 3. Academic Press, Inc., NY.



- International Union of and Applied Chemistry (IUPAC). 2019. Compendium of Pesticides Common Names. Recuperado de [http://www.alanwood.net/pesticides/index\\_cn\\_frame.html](http://www.alanwood.net/pesticides/index_cn_frame.html) (Consultado el 21 de octubre de 2019).
- Khajehali, J., Van Nieuwenhuysse, P., Demaeght, P., Tirry, L., & Van Leeuwen, T. 2011. Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands. *Pest Management Science*, 67, 1424-1433. <https://doi.org/10.1002/ps.2191>
- Kumari, S., Chauhan, U., Kumari, A., & Nadda, G. 2017. Comparative toxicities of novel and conventional acaricides against different stages of *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16, 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.06.003>
- Migeon, A., & Dorkeld, F. 2017. Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Recuperado de <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb> (Consultado el 04 de agosto de 2019).
- Ochiai, N., Mizuno, M., Mimori, N., Miyake, T., Dekeyser, M., Canlas, J. L., & Takeda, M. 2007. Toxicity of bifentazate and its principal active metabolite, diazene, to *Tetranychus urticae* and *Panonychus citri* and their relative toxicity to the predaceous mites, *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. *Experimental and Applied Acarology*, 43, 181- 197.
- Putter, I., Connell, J. G. M., Preiser, F. A., Haidri, A. A., Ristich, S. S., & Dybas, R. A. 1981. Avermectins: novel insecticides, acaricides and nematocides from a soil microorganism. *Experientia*, 37(9), 963–964. doi:10.1007/bf01971780
- Riedl, H., & Shearer, P.W. 1991. Double-leaf-disk residue assay for assessing the toxicity of repellent acaricides to spider mites (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 11, 149-157. <https://doi.org/10.1007/BF01246087>
- Romero-Verdín, G., Cerna-Chávez, E., Mota-Sánchez, D., Landeros-Flores, J., & Sánchez-Valdés, V. M. 2012. Resistance of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch to fenbutatin oxide and bifentazate in berry crops.
- Salman, S.Y., & Sarıtaş, E. 2014. Acequinocyl resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): inheritance, synergists, cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *International Journal of Acarology*, 40, 428-435. <https://doi.org/10.1080/01647954.2014.944932>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. Avance de siembras y cosechas-Resumen nacional por cultivo. Recuperado de [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do) (Consultado el 21 de octubre de 2019).

- Uddin, M. N., Alam, M. Z., Miah, M. R. U., Miah, M. I. H., & Mustarin, K.E. 2015. Life table parameters of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on different bean varieties. *African Entomology*, 23, 418-426. <https://doi.org/10.4001/003.023.0231>
- Ullah, M. S., & Gotoh, T. 2013. Laboratory-based toxicity of some acaricides to *Tetranychus macfarlanei* and *Tetranychus truncatus* (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 39, 244-251. <https://doi.org/10.1080/01647954.2012.758655>
- Ullah, M. S., Moriya, D., Kongchuensin, M., Konvipasruang, P., & Gotoh, P, T. 2011. Comparative toxicity of acaricides to *Tetranychus merganser* Boudreaux and *Tetranychus kanzawai* Kishida (acari: tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 37, 535–543. <https://doi.org/10.1080/01647954.2010.525531>
- Van Nieuwenhuysse, P., Van Leeuwen, T., Khajehali, J., Vanholmeb, B., & Tirry, L. 2009. Mutations in the mitochondrial cytochrome b of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifenazate and acequinocyl. *Pest Management Science*, 65, 404–412. doi:10.1002/ps.1705.
- Van Pottelberg, S., Van Leeuwen, T., Khajehali, J., & Tirry L. 2009. Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spirodiclofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Pest Management Science*, 65, 358–366. DOI: 10.1002/ps.1698
- Villegas, E. S. E., Rodríguez, M. J.C., Anaya R. S., Sánchez, A. H., Hernandez, M. J., & Bujanos, M. R. 2010. Resistencia a acaricidas en *Tetranychus urticae* (Koch) asociada al cultivo de fresa en Zamora, Michoacán, México. *Agrociencia*, 44, 75-81.
- Xu, D., He, Y., Zhang, Y., Xie, W., Wu, Q., & Wang, S. 2018. Status of pesticide resistance and associated mutations in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 150, 89-96. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.07.008
- Yorulmaz, S., & Ay, R. 2008. Multiple resistance, detoxifying enzyme activity, and inheritance of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33, 393-402. DOI: 10.3906/tar-0809-15

## CHAPTER I: Rapid bioassay for reliable detection of acaricide resistance in

### *Tetranychus urticae* Koch

#### 1.1 ABSTRACT

Early detection of resistance to acaricides in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) populations is important for the implementation of efficient control methods. Current methodologies to detect resistance in the laboratory require exposure to acaricides for 24 to 72h. Our objective was to design a reliable method faster than the current one. We modified the existing Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) method to obtain results in less than four hours. Experiments were done using a susceptible laboratory population of *T. urticae*, and a field population from raspberry *Rubus idaeus* L., obtained in Tlazazalca, Michoacán state, México. Susceptibility to the acaricides abamectin, acequinocyl, fenpropatrin, propylene glycol monolaurate and bifentazate was evaluated. Reliable results were obtained in less than 30 min for all acaricides except bifentazate, for which results were obtained in 3.5 h. For abamectin, relative resistance (RR) of the field population compared with the susceptible colony achieved values of 13.99x (RR<sub>50</sub>) and 6.5x (RR<sub>95</sub>). For bifentazate, RR<sub>50</sub> and RR<sub>95</sub> values were 14.9x and 12.9x, respectively. For all other acaricides, the RR values were below 10x.

**Key words:** spider mite, raspberry, fast bioassay

Martínez-Huasanche, F., Rodríguez-Maciél, J.C., Santillán-Galicia, M.T., Lagunes-Tejeda, A., Rodríguez-Martínez, D., Toledo-Hernández, R.T., Guzmán-Franco, A.W., & Silva-Aguayo, G. Rapid bioassay for reliable detection of acaricide resistance in *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology* (Submitted).

## 1.2 INTRODUCTION

*Tetranychus urticae* Koch, (Acari: Tetranychidae) is a globally-distributed pest, affecting more than 1,100 plant species from 140 families (Grbić et al. 2011; Migeon and Dorkeld 2017). Many of these plant species are from economically-important crops such as vegetables, fruit trees, berries and ornamentals (Bolland et al. 1998; Grbić et al. 2011). *Tetranychus urticae* has a short life cycle (approximately 10 days from egg to adult) and a high reproductive capacity via arrhenotokous parthenogenesis (108 eggs per female on bean plants) (Singh 2010; Uddin et al. 2015). These biological attributes, combined with intensive acaricide use, has led to high levels of resistance (Georghiou and Taylor 1977). Currently, 516 cases of resistance to 96 active ingredients have been reported for *T. urticae*, worldwide (Mota-Sanchez and Wise 2019). These include resistance to abamectin (Tang et al. 2014; Çağatay et al. 2018; Díaz-Arias et al. 2019), acequinocyl (Van Pottelberg et al. 2009; Ullah et al. 2011; Salman and Saritaş, 2014), bifenazate (Lee et al. 2003; Khajehali, et al. 2011; Tirello et al. 2012) and fenpropatrin (Penman et al. 1986; Riedl and Shearer 1991; Han et al. 2010).

In Mexico, *T. urticae* is one the most economically important pests of raspberry, *Rubus idaeus* L. (Rosales: Rosaceae) (SIAP 2019). Conventional acaricides are the most common control method used (Villegas-Elizalde et al. 2010; Romero-Verdín et al. 2012).

Knowledge about the levels of resistance in a pest population is key to effective chemical control; not only does it indicate the extent and intensity of the problem, but also helps to identify the control method most likely to be effective. Bioassays to estimate the relationships between dose and mortality (Log-dose Probit lines [LDP]) are usually done with the  $F_1$  population and with individuals that have standardized biological attributes,

i.e. they are the same instar, age or sex (Yorulmaz and Ay 2008; IRAC 2009; Salman and Saritaş 2014; Díaz- Arias et al. 2019). Bioassays with *Tetranychus* spp. are typically done with adult females that are 2-3 days old (Han et al. 2010) or 3-5 days old (Ullah and Gotoh 2013); mortality is recorded 24 h (Han et al. 2010; Xu et al. 2018), 48 h (Kumari et al. 2017; Díaz-Arias et al. 2019) or 72 h after acaricide exposure (Tirello et al. 2012; Ullah and Gotoh 2013). As the concentration of the chemical increases, so the time to observe the response decreases (El Kady et al. 2007; Flores et al. 2007). In this way, it is possible to significantly reduce the exposure time without affecting the reliability of the results to detect resistance. This would open up the potential to carry out bioassays under field conditions. The aim of this study was to significantly reduce the acaricide exposure time required to estimate the LDP line for abamectin, acequinocyl, bifenazate, fepropatrin and propylene glycol monolaurate in *T. urticae*.

### **1.3 MATERIAL AND METHODS**

#### **Populations**

As a susceptible reference colony, we used the S-LAB population of *T. urticae*, which was collected between November and December 2017 from blackberry plants (*Rubus ulmifolius* Schott) at the Colegio de Postgraduados, Texcoco, Mexico. Mites in the S-LAB colony had been reared in the laboratory without any pesticide exposure for at least two years (approximately 48 generations) prior to experimentation. The field population of *T. urticae* (TUFR) was collected from commercial crops of raspberry (*R. idaeus* L.), located in the Municipality of Tlazazalca, Michoacan, Mexico (19°58'37.3" N 102°05'16.5" W,

1803 m.a.s.l.). Three hundred raspberry leaflets infested with *T. urticae* were collected in November 2018 and a second batch in December 2018. Each leaflet contained approximately 30 individuals. All leaflets were placed in paper bags and transported to the Toxicology Laboratory at the Colegio de Postgraduados.

Once the two colonies (S-LAB and TUFR) had established, 30 specimens from each colony were randomly selected and used to confirm identity. From the selected specimens, 20 (males and females) were used for morphological identification after mounting them in Hoyer medium (Krantz and Walter 2009) and identified using the taxonomic keys of Baker and Tuttle (1994) and Bolland et al. (1998). Morphological identification was further confirmed by sequencing a fragment of the Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) from 14 specimens (10 TUFR and 4 S-LAB) using the primers COIFHI and COIRHI (Hinomoto et al. 2001) and following the methods described by Márquez-Chavez et al. (2019). Both methods confirmed that the two colonies were indeed *T. urticae* (Fig 1S).

Both colonies were maintained on bean plants, *Phaseolus vulgaris* L., var. 'Flor de Mayo'. Initially, five plants (35-40 days since they were sown) were individually infested with 200 mites of mixed sex and maintained in entomological cages (70 x 70 x 50 cm), covered with anti-aphid mesh. New plants were introduced into the cages as required. For experiments, cohorts of adult mites were collected from the colonies and allowed to lay eggs for 24 h on clean plants; after that time all the adults were removed using a fine brush (size 000), leaving only eggs. Eggs were allowed to reach adult stage and used in experiments. All colonies were maintained under greenhouse conditions:  $27\pm 5$  °C;  $60\pm 10$  % RH; ambient light: dark regime.

## **Acaricides**

Five acaricides were used; all of them are approved for spider mite control in raspberry crops by the National Association of Berries Exporters (ANEBERRIES, 2019) in Mexico (Table 1). For all acaricide dilutions, we used distilled water and 0.25 mL L<sup>-1</sup> of adjuvant Inex-A® (Cosmocel S.A., División Agrícola, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México) (Díaz-Arias et al. 2019).

## **Bioassay**

Bioassays were done using the immersion technique proposed for *T. urticae* by the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) (2009), with some modifications. Leaf disk (4 cm diameter) from the middle stratum of 30 - 40 days - old “Flor de Mayo” bean plants supporting 20 - 25 *T. urticae* females (3 – 5 days-old) was submerged in the experimental acaricide solution for two seconds. Disks were allowed to dry under a fume extraction cabinet for 10 min and then placed upside down on a Petri dish (5 cm diameter) containing 12 mL of 2% water-agar (Bacto™ Agar, Becton, Dickinson and Company, México City, Mexico); then this Petri dish was covered and placed with the abaxial side uppermost, so the mites were in the normal position as happens in the field plants. The lid of the Petri dish had a 2.5 cm diameter orifice covered with anti-aphid mesh for ventilation. Any mites that were not moving after 30 min were discarded as they were assumed to have been physical damaged during manipulation. In order to retain the mites on the bean leaf disk in each dish, the space between the leaf disk and the water-agar surface was filled with distilled water (1 mL).

All experimental arenas were incubated at 26 °C and 50% RH prior to assessment. Firstly, the dose range causing 0 to 100% mortality within 30 minutes of exposure was determined for each acaricide (biological response window). Where 100% mortality could not be achieved in 30 min (i.e. when a high enough concentration could not be achieved due to solution saturation), we increased the exposure time. Then, 6-8 intermediate doses were included that were evenly distributed amongst the original range of doses tested. For the full bioassays, five replications were carried out on different days, and each replication included an untreated control. The untreated control was submerged in 0.025% aqueous Inex-A<sup>®</sup> solution. A mite was considered as dead if it did not move when touched with a fine brush, or, if it moved only a distance equivalent to its body size (Sato et al. 2005). Maximum mortality in control treatments was 15%; mortality in the treatments was adjusted accordingly using Abbot's formula (Abbot 1925).

### **Data analyses**

Data from the full bioassays were subjected to the Probit analysis (Finney 1971) using the PROC PROBIT procedure in the Statistical Analysis System Package (SAS, 2016). Slope, concentration to kill 50% (LC<sub>50</sub>) and 95% (LC<sub>95</sub>) of the tested individuals, were estimated with 95% confidence intervals and a test of the best fitting line. In addition, the relative response (RR) at the level of LC<sub>50</sub> (RR<sub>50</sub>) or LC<sub>95</sub> (RR<sub>95</sub>) was estimated by dividing the LC<sub>(50)95</sub> values of the TUF<sub>R</sub> by the LC<sub>(50)95</sub> values of the S-LAB population for each acaricide. The response of the two populations was considered significantly different at the same mortality level, when the 95% confidence intervals did not overlap (Robertson and Preisler 1992). The resistance level was classified according to the scale



proposed by Kim et al. (2004), where the  $RR_{50(95)}$  values were separated into four groups, <10 (low), 10-40 (moderate), 40-160 (high) and >160 (extremely high).

## **1.4 RESULTS**

For all acaricides, an exposure time of 30 mins for the concentrations used was sufficient to determine  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  values, except for bifenazate which required 3.5 h because it was not possible to prepare high concentrations due to problems associated to proper diluting problems. Significant differences in susceptibility to the different acaricides were observed for the TUF<sub>R</sub> population, as confirmed by the lack of overlap amongst the 95% confidence intervals for the  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  (Table 2). According to the  $RR_{50}$  values, the TUF<sub>R</sub> population was moderately resistant to abamectin (14x) compared with the S-LAB population, while at the  $LC_{95}$  level, the RR value was lower (6.6x). For bifenazate, the RR values were 15x and 12.9x at the  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  levels, respectively (Table 2). For all other acaricides, the TUF<sub>R</sub> population had RR values of 3.7x and 2.9x, 1.8x and 2.1x and 2.4x and 3.4x at the  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  levels for acequinocyl, fenpropratin and propylene glycol monolaurate, respectively based on Kim et al. (2004) methods. In all cases, a good dose mortality relationship was obtained (Table 2).

## **1.5 DISCUSSION**

We demonstrated that an exposure time of 30 min provided reliable results with acceptable dose-mortality relationships for abamectine, acequinocyl, fenpropratin and propylene glycol monolaurate. For bifenazate, 3.5 hours of acaricide exposure was

necessary because it was not possible to make solutions of a higher concentration than 5% (50,000 mg L<sup>-1</sup>), as was possible with the other acaricides. Problems observed when using high concentrations were the formation of precipitates, and difficulty with dipping the leaf disk into the concentrated acaricide.

The LC<sub>50</sub> values (88.4 - 3774 mg L<sup>-1</sup>) of the acaricides against the susceptible population (S-LAB) were greater than other values reported for *T. urticae*. Previously-reported values were: for fenpropatrin between 2.7 and 16.6 mg L<sup>-1</sup> (Cho et al. 1995; Han et al. 2010); for abamectine between 0.01 and 4.4 mg L<sup>-1</sup> (Sato et al. 2005; Ismail et al. 2007; Van Pottelberg et al., 2009; Han et al. 2010; Khajehali et al. 2011; Tirello et al. 2012; Xu et al. 2018; Díaz-Arias et al. 2019); for acequinocyl between 1.5 and 2.9 mg L<sup>-1</sup> (Ochiai et al. 2007; Khajehali et al. 2011; Salman and Saritaş 2014); and for bifenazate between 0.15 and 11.34 mg L<sup>-1</sup> (Ochiai et al. 2007; Van Pottelberg et al. 2009; Khajehali et al. 2011; Tirello et al. 2012; Salman and Saritaş 2014; Xu et al. 2018). Differences between these values and our results were as a consequence of the shorter exposure times to the higher doses we used in our experiments (El Kady et al. 2007).

The use of abamectin for control of *T. urticae* populations in Michoacán has increased in recent years (Villegas-Elizalde et al. 2010). Our results with the TUFR population, which was collected from a raspberry crop, showed RR<sub>50</sub> and RR<sub>95</sub> values of 14x and 6.6x, respectively in relation to the S-LAB population. These results are in line with what has been reported in China, where seven *T. urticae* populations had high resistance to abamectin (Xu et al., 2018), suggesting that a different acaricide should be used.

Similar high  $RR_{(50)95}$  values were reported by Diaz-Arias et al. (2019), for *T. urticae* populations after heavy use of abamectin in *Rose* sp. orchards. These authors used a 48 h-exposure time bioassay, estimating  $LC_{95}$  values of 16,439 mg L<sup>-1</sup> and 81,218 mg L<sup>-1</sup> for two populations (Coatepec Harinas and Ixtapan de la Sal), and  $RR_{95}$  values of 2,043,625 and 10,152,250, respectively.

The TUF<sub>R</sub> population responses to bifenthrin and acequinocyl were different to each other, with  $LC_{50}$  ( $RR_{50}$ ) and  $LC_{95}$  ( $RR_{95}$ ) values of 15 (12.9x) and 3.7 (2.9x) respectively. This suggests that the resistance mechanisms of the TUF<sub>R</sub> population against these acaricides was different, despite both having the same mode of action (electron transport inhibitors in the mitochondrial complex III) (IRAC 2019). Resistance in the TUF<sub>R</sub> population against propylene glycol monolaurate was low, with  $RR_{50}$  and  $RR_{95}$  values of 2.4x and 3.4x, respectively, suggesting this acaricide as a potential replacement for abamectin.

Bioassays with 30 min exposure times can provide reliable log-dose lines for *T. urticae* populations and the acaricides abamectin, acequinocyl, fenpropratin and propylene glycol monolaurate. However, in the case of bifenthrin a 3.5 h exposure time was necessary. Our results provide the basis for reliable field bioassays.

## **Acknowledgments**

FMH received a scholarship from CONACYT-México for his MSc. The authors are grateful to Maribel Rivero Borja, Guillermo Arellano Hernández and Edmundo Martínez Galán for their valuable help maintaining the *T. urticae* populations.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

## Author contribution

JCRM and FMH conceived the research. FMH did the experiments. MTSG, FMH and AWGF identified the *T. urticae* populations. JCRM and FMH analysed the data and did the statistical analyses. FMH, JCRM, MTSG, ALT, DRM, RATH, GSA and AWGF wrote the manuscript. All authors have approved the manuscript.

## Statement of data availability

All data are available upon request.

## 1.6 REFERENCES

- Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267.
- Asociación Nacional de Exportadores de Berries (ANEVERRIES), 2019. Lista-de-plaguicidas-autorizados-aneberries-2019. Retrieved from <http://www.aneberries.mx/lista-de-plaguicidas-autorizados-aneberries-2019>. [accessed July 2019]
- Baker EW, Tuttle DM, 1994. *A Guide to the Spider Mites (Tetranychidae) of the United States*. Indira Publishing House, West Bloomfield, Michigan, USA.
- Bolland HR, Gutiérrez J, Flechtmann CHW, 1998. *World Catalogue of the Spider Mite Family (Acari: Tetranychidae)*. Brill, Leiden, Boston.
- Çağatay NS, Menault P, Riga M, Vontas J, Ay R, 2018. Identification and characterization of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch populations from greenhouses in Turkey. *Crop Prot.* 112, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.05.016>

- Cho JR, Kim Y. J, Ahn YJ, Yoo JK, Lee JO, 1995. Monitoring of acaricide resistance in field-collected populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in Korea. Korean J. Appl. Entomol. 34, 40-45.
- Díaz-Arias KV, Rodríguez-Maciel JC, Lagunes-Tejeda A, Aguilar-Mendel S, Tejeda-Reyes MA, Silva-Aguayo GJC, 2019. Resistance to abamectin in field population of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) associated with cut rose from state of Mexico, Mexico. Fla. Entomol. 102, 428-430. <https://doi.org/10.1653/024.102.0222>
- El Kady GA, El Sharabasy HM, Mahmoud MF, Bahgat IM, 2007. Toxicity of two potential bio-insecticides against moveable stages of *Tetranychus urticae* Koch. J. Appl. Sci. Res. 3, 1315-1319.
- Finney DJ, 1971. Probit analysis, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Flores FA, Silva AG, Tapia VM, Casals BP, 2007. Susceptibilidad de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) colectada en *Primula obconica* Hance y *Convolvulus arvensis* L. a acaricidas. Agricultura Técnica. 67, 219-224.
- Georghiou GP, Taylor CE, 1977. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 70, 653-658. <https://doi.org/10.1093/jee/70.5.653>
- Grić M, Van Leeuwen T, Clark RM, Rombauts S, Rouzé P, Grić V, Osborne EJ, Dermauw W, Ngoc PCT, Ortego F, Hernández-Crespo P, (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. Nature. 479, 487–492. <https://doi.org/10.1038/nature10640>
- Han J, Choi BR, Lee SG, Kim SI, Ahn YJ, 2010. Toxicity of plant essential oils to acaricide-susceptible and -resistant *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). J. Econ. Entomol. 103, 1293-1298. <https://doi.org/10.1603/EC09222>
- Hinomoto N, Osakabe M, Gotoh T, Takafuji A, 2001. Phylogenetic analysis of green and red forms of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), in Japan, based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequences. Appl. Entomol. & Zool. 36, 459–464. <https://doi.org/10.1303/aez.2001.459>
- Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), 2009. Susceptibility Test Methods Series: Method No: 004 '*Tetranychus* spp. Retrieved from [http://www.irac-online.org/content/uploads/Method\\_004\\_v3\\_june09.pdf](http://www.irac-online.org/content/uploads/Method_004_v3_june09.pdf). [accessed August 2018]
- Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), 2019. Esquema de clasificación del modo de acción. Retrieved from <https://www.irac-online.org/modes-of-action/> [accessed August 2019]

- Ismail MSM, Soliman MFM, El Naggat MH, Ghallab MM, 2007. Acaricidal activity of spinosad and abamectin against two-spotted spider mites. *Exp. & Appl. Acarol.* 43, 129-135. <https://doi.org/10.1007/s10493-007-9108-8>
- Khajehali J, Van Nieuwenhuysse P, Demaeght P, Tirry L, Van Leeuwen T. 2011. Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands. *Pest Man. Sci.* 67, 1424-1433. <https://doi.org/10.1002/ps.2191>
- Kim YJ, Lee SH, Lee SW, Ahn YJ, 2004. Fenproximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Man. Sci.* 60, 1001-1006. <https://doi.org/10.1002/ps.909>
- Krantz GW, Walter DE, 2009. A manual of Acarology. Texas Tech University Press, Texas, USA.
- Kumari S, Chauhan U, Kumari A, Nadda G, 2017. Comparative toxicities of novel and conventional acaricides against different stages of *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 16, 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.06.003>
- Lee YS, Song MH, Ahn KS, Lee KY, Kim JW, Kim GH, 2003. Monitoring of acaricide resistance in two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) populations from rose greenhouses in Korea. *J. Asia-Pacific Entomol.* 6, 91-96. [https://doi.org/10.1016/S1226-8615\(08\)60173-9](https://doi.org/10.1016/S1226-8615(08)60173-9)
- Márquez-Chavez A, Guzmán-Franco AW, Santillán-Galicia T, Tamayo-Mejía F, Rodríguez-Maciel JC, 2019. Effect of host plant on the genetic diversity of *Tetranychus urticae* Koch populations and their susceptibility to fungal infection. *Biol. Contr.* 137, 104015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104015>
- Migeon A, Dorkeld F, 2017. Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Retrieved from <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb> [accessed August 2019]
- Mota-Sanchez D, Wise JC, 2019. The Arthropod Pesticide Resistance Database. Michigan State University. Retrieved from <http://www.pesticideresistance.org> [accessed August 2019]
- Ochiai N, Mizuno M, Mimori N, Miyake T, Dekeyser M, Canlasa LJ, Takeda M, 2007. Toxicity of bifenthrin and its principal active metabolite, diazene, to *Tetranychus urticae* and *Panonychus citri* and their relative toxicity to the predaceous mites, *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. *Exp. & Appl. Acarol.* 43, 181–197. <https://doi.org/10.1007/s10493-007-9115-9>

- Penman DR, Chapman RB, Bowie MH, 1986. Direct toxicity and repellent activity of pyrethroids against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 79, 1183-1187 (1986). <https://doi.org/10.1093/jee/79.5.1183>
- Riedl H, Shearer PW, 1991. Double-leaf-disk residue assay for assessing the toxicity of repellent acaricides to spider mites (Acari: Tetranychidae). Exp. & Appl. Acarol. 11, 149-157. <https://doi.org/10.1007/BF01246087>
- Robertson JL, Preisler HK, 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC, Boca Raton, USA, English.
- Romero-Verdín G, Cerna-Chávez E, Mota-Sánchez D, Landeros-Flores J, Sánchez-Valdés VM, 2012. Resistance of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch to fenbutatin oxide and bifentazate in berry crops. Resist. Pest Man. Newsletter. 22, 34-36.
- Salman SY, Sarıtaş E, 2014. Acequinocyl resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): inheritance, synergists, cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. Int. J. Acarol. 40, 428-435. <https://doi.org/10.1080/01647954.2014.944932>
- SAS, 2016. SAS User's Manual 9.4. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Sato ME, Da Silva MZ, Raga A, Souza-Filho MFD, 2005. Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. Neotrop. Entomol. 34, 991-998. <https://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600016>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). Avance de Siembras y Cosechas-Resumen nacional por cultivo. Retrieved from [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do) [accessed September 2019]
- Singh S, (2010). Resistance development in mites to plant protection chemicals: A review. J. Entomol. Res. 34, 117-123.
- Tang X, Zhang Y, Wu Q, Xie W, Wang S, 2014. Stage – specific expression of resistance to different acaricides in four field populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol 107, 1900-1907. DOI: 10.1603/EC14064
- Tirello P, Pozzebon A, Cassanelli S, Van Leeuwen T, Duso C, 2012. Resistance to acaricides in Italian strains of *Tetranychus urticae*: toxicological and enzymatic assays. Exp. & Appl. Acarol. 57, 53–64. DOI: 10.1007/s10493-012-9536-y

- Uddin MN, Alam MZ, Miah MRU, Miah MIH, Mustarin KE, 2015. Life table parameters of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on different bean varieties. African Entomol. 23, 418-426. <https://doi.org/10.4001/003.023.0231>
- Ullah MS, Gotoh T, 2013. Laboratory-based toxicity of some acaricides to *Tetranychus macfarlanei* and *Tetranychus truncatus* (Acari: Tetranychidae). Int. J. Acarol. 39, 244-251. <https://doi.org/10.1080/01647954.2012.758655>
- Ullah MS, Moriya, Kongchuensin M, Konvipasruang P, Gotoh PT, 2011. Comparative toxicity of acaricides to *Tetranychus merganser* Boudreaux and *Tetranychus kanzawai* Kishida (acari: tetranychidae). Int. J. Acarol. 37, 535–543. <https://doi.org/10.1080/01647954.2010.525531>
- Van Pottelberg S, Van Leeuwen T, Khajehali J, Tirry L, 2009. Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spirodiclofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Pest Man. Sci. 65, 358–366. DOI: 10.1002/ps.1698
- Villegas ESE, Rodríguez MJC, Anaya RS, Sánchez AH, Hernandez MJ, Bujanos MR, 2010. Resistencia a acaricidas en *Tetranychus urticae* (koch) asociada al cultivo de fresa en Zamora, Michoacán, México. Agrociencia. 44, 75-81.
- Xu D, He Y, Zhang Y, Xie W, Wu Q, Wang S, 2018. Status of pesticide resistance and associated mutations in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, in China. Pesticide Biochem. & Physiol. 150, 89-96. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.07.008
- Yorulmaz S, Ay R, 2008. Multiple resistance, detoxifying enzyme activity, and inheritance of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). Turkish J. Agric. & For. 33, 393-402. DOI: 10.3906/tar-0809-15



## Tables

**Table 1.** Acaricides used in bioassays against adult female of *Tetranychus urticae* Koch.

Commercial name	Active ingredient (a.i.)	Formulation and concentration (%) in weight	g of a.i L <sup>-1</sup> or Kg <sup>-1</sup>	Company	Chemical group	#Classification according to IRAC
Thor ® 3.6 E W	Abamectine	Emulsion in water (3.84)	36.0 g a.i. L <sup>-1</sup>	FMC Agroquímica de México	Avermectine	6
Kanemite ® 15 SC	Acequinocyl	Concentrated suspension (15.8)	164.32 g a.i. L <sup>-1</sup>	Arysta Life Science México,	Naftoquinona	20B
Acramite ® 50 WS	Bifenazate	Wettable powder (50)	500 g a.i. K <sup>-1</sup>	Chemtura Corporation México	Carboxylic acid ester	20D
Herald 375 CE	Fenpropatrin	Emulsified concentrate (38.50 p/v)	375 g a.i. L <sup>-1</sup>	Valent de México	Pyrethroids	3A
Acaritouch ®	Propylene glycol monolaurate	Emulsified concentrate (70.81)	656. g a.i. L <sup>-1</sup>	Arysta Life Science México	Fatty acid ester	NA

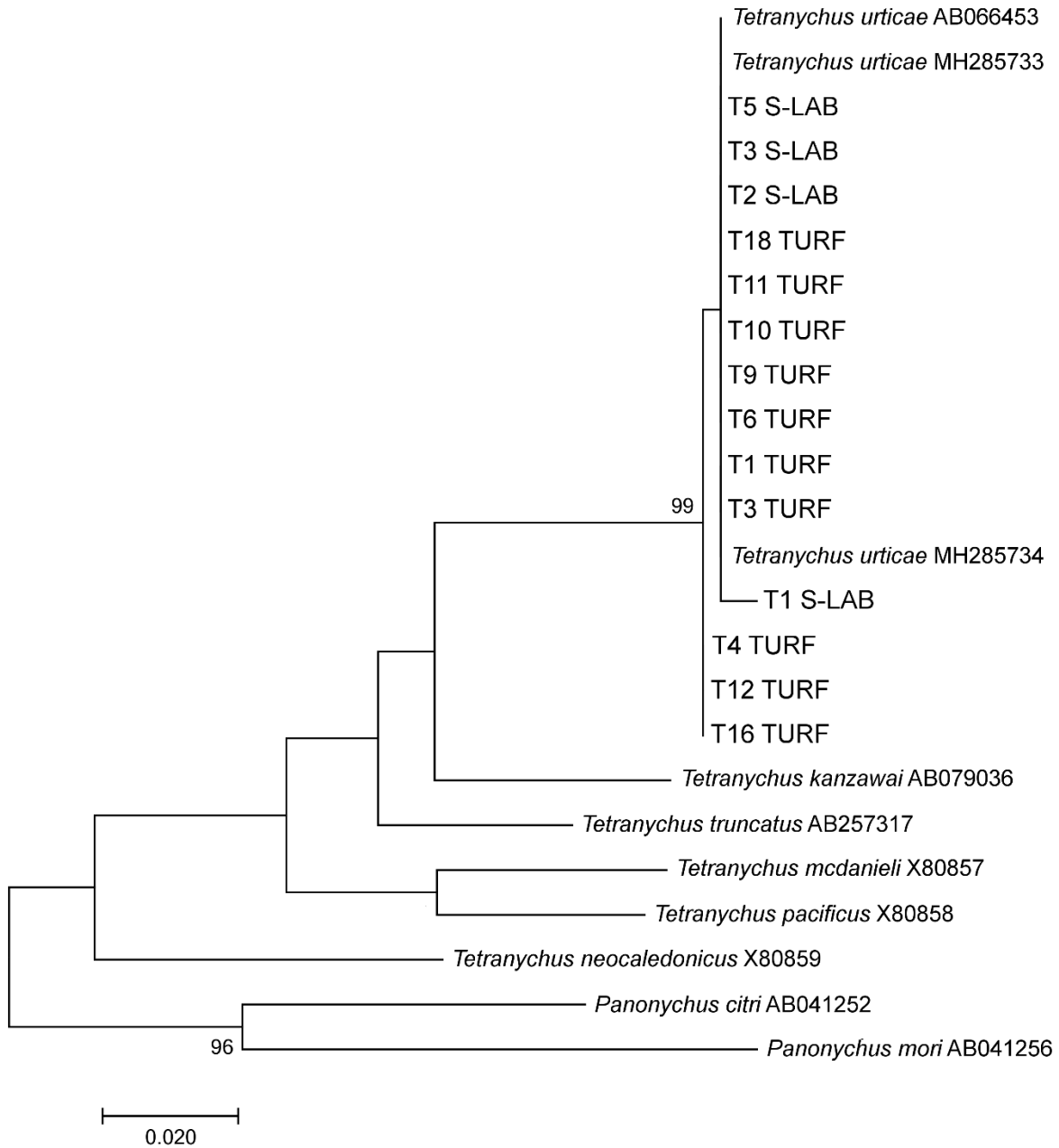
#Mode of action according to the IRAC (2019). 3: Sodium channel modulators. 6: Allosteric modulators of the glutamate-regulated chlorine channel. 20B and D: Inhibitors of electron transport in the mitochondrial complex III.

**Table 2.** Response of two populations of 3 to 5 days-old adult female *T. urticae* to acaricides.

Acaricide	Population	n*	df <sup>#</sup>	B ± EE <sup>€</sup>	LC <sub>50</sub> <sup>α</sup> (95% CI) mgL <sup>-1</sup>	RR <sub>50</sub>	LC <sub>95</sub> <sup>ζ</sup> (95% CI) mgL <sup>-1</sup>	RR <sub>95</sub>	Pr >χ <sub>i</sub> <sup>2</sup>
<b>30 minutes exposure</b>									
Abamectin	TUFR	1063	5	2.9 ± 0.2	1,237.0 (1,153-1,324)	14.0	4507.0 (3,933 – 5,312)	6.6	0.201
	S-LAB	1040	4	1.9 ± 0.1	88.4 (78.1 - 99.9)		683.0 (556.3 - 868.9)		0.124
Acequinocyl	TUFR	1027	5	2.7 ± 0.1	1989.0 (1,845 – 2,159)	3.7	7,942.0 (6751 - 9674)	2.9	0.135
	S-LAB	969	5	2.3 ± 0.1	543.2 (489.4 - 600.1)		2,756.0 (2,328 – 3,377)		0.415
Fenpropratin	TUFR	1042	5	3.2 ± 0.2	6609.0 (6,180 -7,091)	1.8	21,825.0 (18,824 – 26,167)	2.1	0.189
	S-LAB	1028	5	3.7 ± 0.2	3,774.0 (3,547 -4,009)		10,502.0 (9,477 – 11,857)		0.096
Propylene glycol monolaurate	TUFR	1039	5	1.7 ± 0.1	208.4 (167.8 - 261.6)	2.4	1,896 .0 (1,203 – 37,41)	3.4	0.064
	S-LAB	1317	7	2.0 ± 0.1	85.9 (78.2 - 94.2)		555.6 (464.3 - 686.2)		0.409
<b>3.5 hours exposure</b>									
Bifenazate	TUFR	1166	6	3.6 ± 0.2	41,045 (38,722 – 43,488)	15.0	115,580 (104,373 – 130,249)	12.9	0.163
	S-LAB	879	4	3.2 ± 0.3	2,742.0 (2,271 - 3,208)		8,964.0 (7,001 - 13,267)		0.075

\*Total number of mites treated, <sup>#</sup>Degrees of freedom, <sup>€</sup>Standard error of the slope, <sup>α</sup> Lethal concentration to kill 50 % of the population (95% confidence intervals), <sup>ζ</sup> Lethal concentration to kill 95 % of the population (95% confidence intervals), RR=Relative response (LC<sub>50</sub> or LC<sub>95</sub> of the field population (TUFR) divided by the LC<sub>50</sub> or LC<sub>95</sub> of the susceptible population (S-LAB), Pr > χ<sub>i</sub><sup>2</sup>= Adjusted values of the χ<sup>2</sup> model..

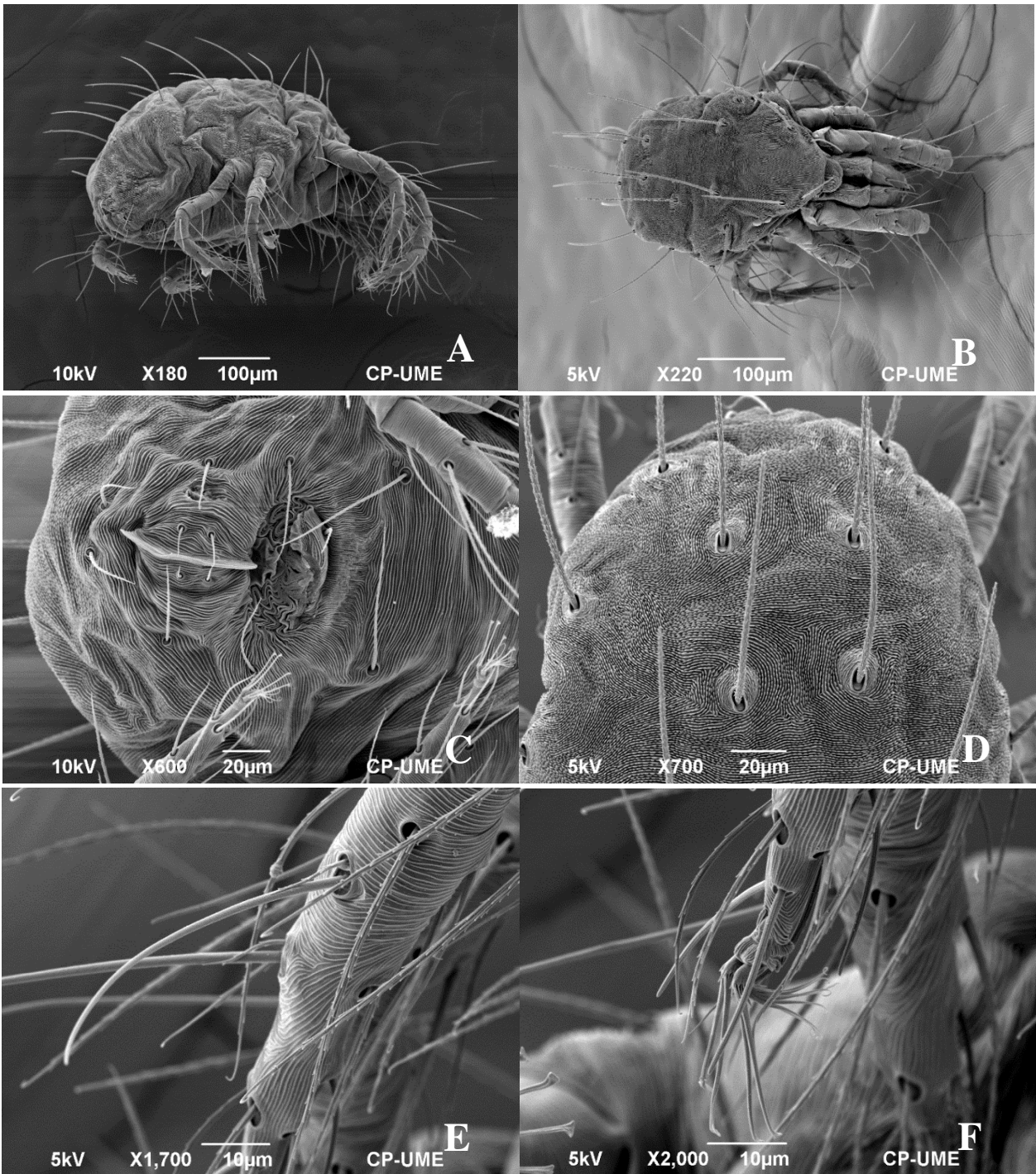
Supplementary information



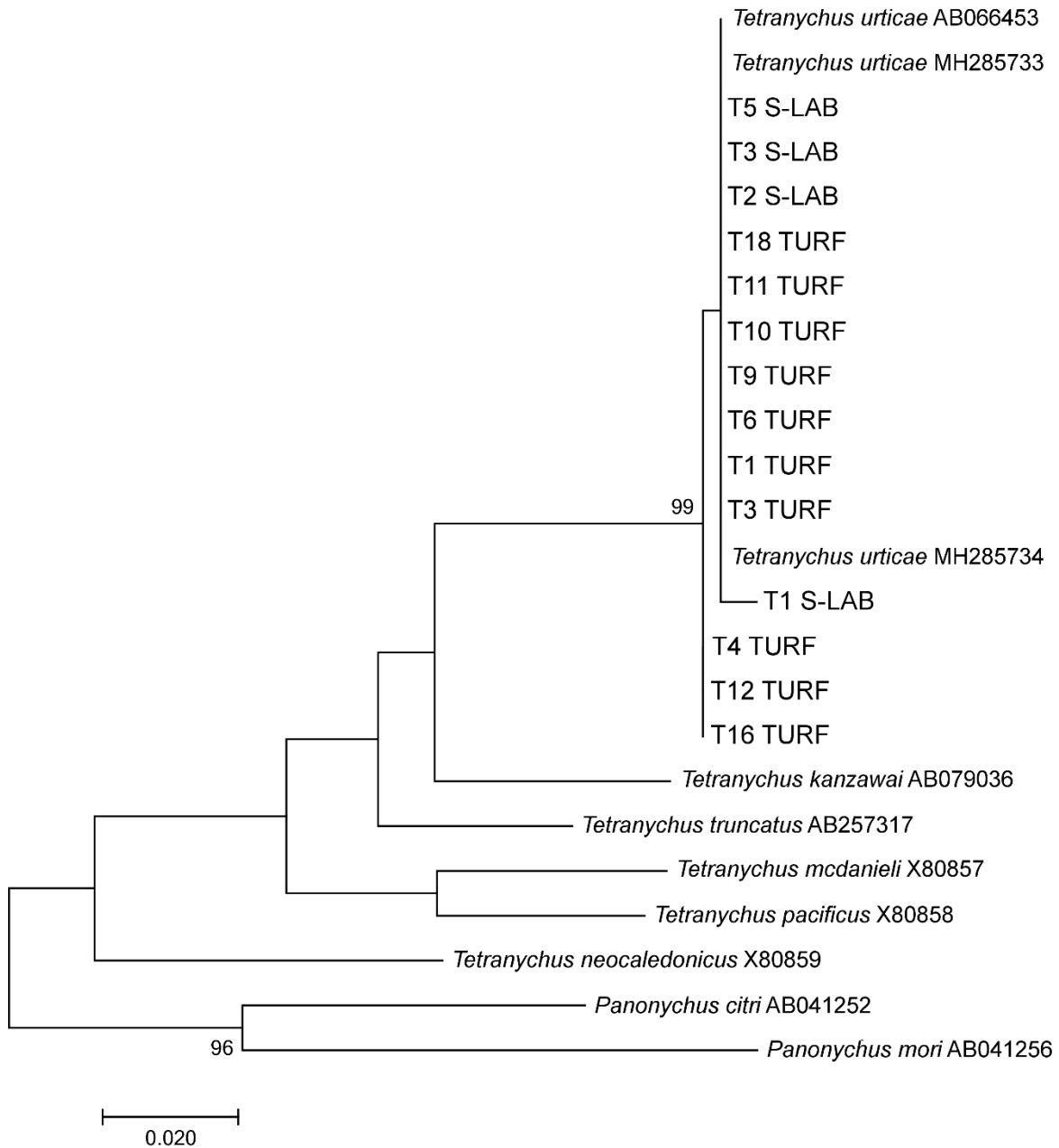
**Figure 1S.** Dendrogram inferred from Maximum likelihood analyses (1,000 replicates) of COI sequences from the two *T. urticae* populations (S-LAB and TURF). Two sequences from *Panonychus* species were used as outgroups. Only bootstrap values above 80 % are shown. The bar depicts the branch length corresponding to 2% ML distance.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL

La identificación morfológica (Figura 1) mostró que ambas poblaciones (S-LAB y TUFR) de ácaros de la familia Tetranychidae son de la especie *Tetranychus urticae*. Además, el análisis filogenético realizado con secuencias COI confirmó la identificación morfológica, donde los especímenes de ambas poblaciones se agruparon con las secuencias de *T. urticae* utilizadas como referencia con un valor bootstrap del 99% (Figura 2).



**Figura 1.** Hembra adulta de *Tetranychus urticae*. A) Vista lateral. B) Vista fronto dorsal. C) gonoporo y ano. D) Estrías dorsales opistosomales en un patrón en forma de diamante. E) Sedas dobles. F) Onicotriquias y empodio dividido distalmente.



**Figura 2.** Dendrograma inferido de los análisis de máxima verosimilitud (1000 réplicas) de secuencias de COI de las dos poblaciones de *T. urticae* (S-LAB y TUFR). Se usaron dos secuencias de especies de *Panonychus* como grupos externos. Solo se muestran valores de arranque superiores al 80%. La barra representa la longitud de la rama correspondiente al 2% de distancia ML.

## Bioensayos

En ambas poblaciones (S-LAB y TUFRR) el tiempo de exposición al acaricida se logró reducir a 30 minutos para abamectina, acequinocyl, fenpropatrin y monolaurato de propilenglicol, mientras que para bifenazate fue de 3.5 horas.

Se demostró que una exposición de 30 minutos para abamectina, acequinocyl, fenpropatrin, monolaurato de propilenglicol fue suficiente para estimar de manera robusta las líneas Log-Dosis Probit. Para el bifenazate, 3.5 horas fue el tiempo más corto de exposición que se pudo determinar sin afectar las condiciones apropiadas de un bioensayo. En todos los casos se observó que la respuesta a los acaricidas evaluados se ajustó a una línea recta, indicando linealidad; condición importante de cumplir en los bioensayos con poblaciones susceptibles.

Nuestros datos indican, que para los acaricidas evaluados, no es necesario tener exposiciones al acaricida de 24, 48 o 72 h como sostienen Tirello *et al.* (2012), Xu *et al.* (2018) y Díaz-Arias *et al.* (2019), entre otros.

Se detectó que la población de campo (TUFRR) tuvo una respuesta diferente a los acaricidas evaluados debido a que, en ninguno de los casos, los límites de confianza al 95% se trasladaron a nivel de  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ . Considerando los valores de  $RR_{50}$ , la población TUFRR presentó moderado nivel de resistencia a abamectina (14x), mientras que al 95 % de mortalidad la resistencia fue baja (6.6x). La resistencia a bifenazate fue moderada en ambos casos (15 y 12.9x) y para el resto de los acaricidas la población TUFRR presentó bajo nivel de resistencia; acequinocyl (3.7 y 2.9x), fenpropatrin (1.8 y 2.1x) y monolaurato de propilenglicol (2.4 y 3.4x), con radios relativos <10 de acuerdo a la clasificación propuesta por Kim *et al.* (2004).

Los valores de  $CL_{50}$  (88.4-3774 mg L<sup>-1</sup>) de los acaricidas evaluados en la población susceptible (S-LAB) son más elevados en comparación con los valores que otros autores han obtenido en *T. urticae*, y estas diferencias se atribuyen a que, para estimar las líneas Log-Dosis Probit, el tiempo de exposición de *T. urticae* a los acaricidas fue

significativamente menor que el reportado en la literatura (24, 48 y 74 h), lo que implica el uso de concentraciones más altas, como lo sugieren El kady *et al.* (2007).

Con base en los resultados obtenidos, se considera que es viable estimar las líneas Log-Dosis Probit en *T. urticae*, con 30 minutos de exposición a abamectina, acequinocyl, fenpropatrin y monolaurato de propilenglicol o 3.5 h con bifenazate.

## Literatura citada

- Díaz-Arias, K.V., Rodríguez-Maciél, J. C., Lagunes-Tejeda, A., Aguilar-Mendel, S., Tejeda-Reyes, M.A., & Silva-Aguayo, G. 2019. Resistance to abamectin in field population of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) associated with cut rose from state of Mexico, Mexico. *Florida Entomologist*, 102, 428-430. <https://doi.org/10.1653/024.102.0222>
- El kady, G.A., El Sharabasy. H. M., Mahmoud, M. F., & Bahgat, I.M. 2007. Toxicity of Two Potential Bio-insecticides Against Moveable Stages of *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Sciences Research*, 3, 1315-1319.
- Kim, Y. J., Lee, S.H., Lee, S. W., & Ahn, Y. J. 2004. Fenproximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Management Science*, 60, 1001-1006. <https://doi.org/10.1002/ps.909>
- Tirello, P., Pozzebon, A., Cassanelli, S., Van Leeuwen, T., & Duso, C. 2012. Resistance to acaricides in Italian strains of *Tetranychus urticae*: toxicological and enzymatic assays. *Experimental and Applied Acarology*, 57, 53–64. DOI: 10.1007/s10493-012-9536-y
- Xu, D., He, Y., Zhang, Y., Xie, W., Wu, Q., & Wang, S. 2018. Status of pesticide resistance and associated mutations in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 150, 89-96. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.07.008