UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

Departamento de Producción Agraria

Compatibilidad de *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) y *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), importantes enemigos naturales de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) en cultivos hortícolas, con nuevas barreras físicas selectivas y modernos plaguicidas.

TESIS DOCTORAL

María del Mar Fernández Gallego

Ingeniera Agrónoma

2016

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

Departamento de Producción Agraria

Compatibilidad de *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) y *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), importantes enemigos naturales de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) en cultivos hortícolas, con nuevas barreras físicas selectivas y modernos plaguicidas.

TESIS DOCTORAL

María del Mar Fernández Gallego

Ingeniera Agrónoma

Directores: Elisa Viñuela Sandoval

Catedrática y Dra. Ingeniera Agrónoma

Guy Smagghe

Professor Dr. ir.

Tribunal nombrado por el Magfco. Y Excmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, el día   de   de 2016.

Presidente D./D.^a

Vocal D./D.^a

Vocal D./D.^a

Vocal D./D.^a

Secretario D./D.^a

Suplente D./D.^a

Suplente D./D.^a

Realizada la lectura y defensa de la tesis el día   de   de 2016 en Madrid, en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.

EL PRESIDENTE

EL SECRETARIO

Fdo.:

Fdo.:

LOS VOCALES

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

**A mis padres, a mi hermano
y a José Ángel**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad por otorgarme una beca FPI (BES-2011-044245) que ha hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral y a los proyectos del Plan Nacional de I+D+I AGL2010-22196-C02-02 y AGL2013-47603-C2-1-R que han financiado este trabajo.

Quiero dar las gracias a Elisa, mi tutora, por darme la oportunidad de realizar el trabajo fin de carrera, el trabajo fin de máster y la tesis bajo su tutela, por contagiarme su pasión por la investigación, por su confianza a lo largo de estos años y por escucharme cuando lo he necesitado. Mil gracias.

To Guy, my promoter in Belgium, thank you for receiving me in your lab, for his help and his personal motivation.

A Ángeles, Flor, Pedro y Pilar, por todas sus enseñanzas, su ayuda constante, su apoyo y por promover los “viernes del amor” y días similares, que hacen que nos sintamos como parte de una gran familia.

A todo el personal del CSIC, Alberto Fereres, Arantxa Moreno, Beatriz Dáder, Saioa Legarrea, María Plaza, Elisa Garzo y Michele Sousa, por su ayuda en los ensayos de campo.

A Luis, Yara y Nacho por su colaboración inestimable en todos los ensayos, por tantas vueltas a casa en su compañía y sobre todo, por su amistad.

A mis compañeros, Javi, Cherre, Edu, Geraldo, Jader, Sara, Guille, Edu, Juan, Raquel, Essen, Antonio, Mario, Jelena, Clifford, Luis Hiernaux, Lara, Rubén, Gonzalo, Ana Murcia, Sergio, Thiago, Antonio “Narco” y Napoleón, con los que he compartido buenos y malos momentos, horas y horas de trabajo y muchas risas. Y en especial con los que he compartido más momentos de fatigas y alegrías: A Paloma, Fermín y Rosa, con quienes coincidí desde el principio, por su ayuda y amistad. A Agustín, buen amigo, con quien compartí largos ratos de escritura. A Andrea, con quien he compartido infinidad de buenos momentos, por las risas histéricas en momentos de estrés, por las palmeras de chocolate compartidas y por los bailes nocturnos antes de apagar el

ordenador. A Celeste, Miriam y Ana Moreno, por su alegría contagiosa, por su ayuda constante, por ser unas excelentes compañeras y amigas.

To Annelies and Ivan, thanks for your help and your friendship.

A mis amig@s, que siempre están ahí cuando los necesito, en especial a Moisés, por la asistencia informática 24 horas al día.

A mis padres, Honorato y M^a Luisa, mi ejemplo a seguir, por su cariño, su apoyo incondicional y por darme fuerzas para seguir adelante.

A mi hermano y amigo, Daniel, por su ayuda y apoyo constante, su cariño y sus risas, por la unión tan fuerte que tenemos y por todo lo que no puedo expresar con palabras.

A mi novio, José Ángel, por alegrarme hasta el más tristes de mis días y por hacerme inmensamente feliz.

A mi abuelo Juan, por su amor incondicional. A mi abuelita Antonia, porque su presencia y amor me acompañan siempre.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xxiii
RESUMEN/SUMMARY	xxix
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Gestión Integrada de Plagas (GIP).....	1
1.1.1. Control biológico de plagas	2
1.1.2. Control físico de plagas	3
1.1.3. Control químico de plagas	4
1.2. Los cultivos hortícolas	5
1.2.1. Importancia, distribución y producción mundial	5
1.2.2. Importancia, distribución y producción nacional	6
1.2.3. Plagas principales de los cultivos hortícolas españoles	10
1.3. <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius).....	11
1.3.1. Sistemática	11
1.3.2. Origen, distribución e importancia	11
1.3.3. Ciclo de vida y descripción de los estados de desarrollo.....	13
1.3.4. Métodos de control de <i>B. tabaci</i> en cultivos hortícolas	18

1.3.4.1. Control biológico de <i>B. tabaci</i> en cultivos hortícolas	18
1.3.4.2. Métodos físicos de control de <i>B. tabaci</i> en cultivos hortícolas	20
1.4. <i>Eretmocerus mundus</i> Mercet	21
1.4.1. Sistemática	21
1.4.2. Origen, distribución e importancia	21
1.4.3. Ciclo de vida y descripción de los estados de desarrollo.....	23
1.5. <i>Amblyseius swirskii</i> Athias-Henriot.....	27
1.5.1. Sistemática	27
1.5.2. Origen, distribución e importancia	28
1.5.3. Ciclo de vida y descripción de los estados de desarrollo.....	29
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	35
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	37
3.1. Descripción de los lugares de estudio y condiciones ambientales en ensayos y en la cría de insectos	37
3.1.1. Ensayos de laboratorio y cría de insectos	37
3.1.1.1. Insectario	38
3.1.1.2. Cámara climática SANYO MLR-350	38
3.1.2. Ensayos en los Campos de Prácticas de la E.T.S.I. Agrónomos	39
3.2. Cría y manejo de insectos plaga y enemigos naturales.....	40
3.2.1. <i>Bemisia tabaci</i>	40

3.2.2. <i>Eretmocerus mundus</i>	41
3.2.3. <i>Amblyseius swirskii</i>	42
3.3. Material vegetal	43
3.4. Análisis estadísticos.....	44
3.4.1. ANOVA.....	44
3.4.2. t-Student.....	45
3.4.3. Modelo de efectos mixtos lineales (LMM).....	45
CAPÍTULO 4: COMPATIBILIDAD DE MODERNOS INSECTICIDAS CON <i>ERETMOCERUS MUNDUS Y AMBLYSEIUS SWIRSKII</i>	47
4.1. Introducción	47
4.2. Objetivos	48
4.3. Materiales y Métodos.....	50
4.3.1. Insecticidas evaluados.....	50
4.3.1.1. Abamectina.....	52
4.3.1.2. Deltametrina	52
4.3.1.3. Enamectina	53
4.3.1.4. Flonicamida	53
4.3.1.5. Flubendiamida	54
4.3.1.6. Metaflumizona.....	54
4.3.1.7. Metoxifenocida.....	55

4.3.1.8. Spinosad	55
4.3.1.9. Spiromesifen	56
4.3.1.10. Spirotetramat	57
4.3.1.11. Sulfoxaflor	57
4.3.2. Ensayos de laboratorio	58
4.3.2.1. Aplicación de insecticidas	58
4.3.2.2. Tratamiento directo de los estados más protegidos de los enemigos naturales.....	60
4.3.2.2.1. <i>Eretmocerus mundus</i>	60
4.3.2.2.2. <i>Amblyseius swirskii</i>	62
4.3.2.3. Tratamiento por contacto residual sobre placas de cristal del estado adulto de ambos enemigos naturales	64
4.3.3. Ensayos de persistencia	67
4.3.4. Clasificación de los insecticidas	70
4.4. Resultados	70
4.4.1. <i>Eretmocerus mundus</i>	70
4.4.1.1. Tratamiento directo de pupas	70
4.4.1.2. Contacto residual sobre placas de cristal con el estado adulto	73
4.4.1.3. Persistencia	76
4.4.2. <i>Amblyseius swirskii</i>	78
4.4.2.1. Tratamiento directo de huevos	78

4.4.2.2. Contacto residual sobre placas de cristal con el estado adulto	81
4.4.2.3. Persistencia	85
4.5. Discusión	87
4.5.1. <i>Eretmocerus mundus</i>	87
4.5.2. <i>Amblyseius swirskii</i>	93
CAPÍTULO 5: COMPATIBILIDAD DE BARRERAS FOTOSELECTIVAS CON <i>ERETMOCERUS MUNDUS</i>	101
5.1. Introducción	101
5.2. Objetivos	103
5.3. Materiales y Métodos.....	104
5.3.1. Efecto directo de ambientes pobres en luz UV y con una alta difusión de luz visible, sobre <i>E. mundus</i>	104
5.3.1.1. Tipos de barreras fotoselectivas	104
5.3.1.2. Metodología.....	105
5.3.1.3. Condiciones ambientales	108
5.3.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre <i>E. mundus</i>	110
5.3.2.1. Tipos de barreras fotoselectivas	110
5.3.2.2. Metodología.....	110
5.3.2.2.1. Unidades experimentales	111
5.3.2.2.2. Suministro de radiación UV	111

5.3.2.2.3. Material vegetal.....	112
5.3.2.2.4. Infección de las plantas con TYLCV	113
5.3.2.2.5. Diseño experimental.....	114
5.3.2.2.6. Altura, peso fresco y seco de las plantas	117
5.3.2.2.7. Contenido en carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre de las plantas	117
5.3.2.2.8. Análisis de las cutículas y las paredes celulares de la epidermis foliar	118
5.3.2.3. Condiciones ambientales	119
5.4. Resultados	123
5.4.1. Efecto directo de ambientes pobres en luz UV y con una alta difusión de luz visible, sobre <i>E. mundus</i>	123
5.4.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre <i>E. mundus</i>	124
5.4.2.1. Ensayo con plantas de tomate sanas	124
5.4.2.1.1. Efecto directo de los ambientes pobres en luz UV sobre las plantas de tomate	124
5.4.2.1.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, sobre <i>E. mundus</i>	126
5.4.2.2. Ensayo con plantas de tomate infectadas con el virus TYLCV	128
5.4.2.2.1. Efecto directo de los ambientes pobres en luz UV sobre las plantas de tomate	128

5.4.2.2.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, sobre <i>E. mundus</i>	130
5.5. Discusión	133
5.5.1. Efecto directo de ambientes pobres en luz UV y con una alta difusión de luz visible, sobre <i>E. mundus</i>	133
5.5.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre <i>E. mundus</i>	134
CAPÍTULO 6: COMPATIBILIDAD DE MALLAS TRATADAS CON BIFENTRIN CON <i>ERETMOCERUS MUNDUS</i> Y <i>AMBLYSEIUS SWIRSKII</i>	139
6.1. Introducción	139
6.2. Objetivos	140
6.3. Materiales y Métodos.....	142
6.3.1. Características de las mallas utilizadas	142
6.3.2. Bifentrin	142
6.3.3. Evaluación de la toxicidad en laboratorio.....	143
6.3.3.1. Toxicidad por contacto	143
6.3.3.2. Ensayos de preferencia	144
6.3.4. Evaluación de la toxicidad sobre <i>E. mundus</i> en invernadero (semicampo)	147
6.3.5. Evaluación de la toxicidad sobre <i>A. swirskii</i> en campo	149
6.4. Resultados	153

6.4.1. Evaluación de la toxicidad en laboratorio.....	153
6.4.1.1. Toxicidad por contacto	153
6.4.1.2. Ensayos de preferencia	153
6.4.2. Evaluación de la toxicidad sobre <i>E. mundus</i> en invernadero (semicampo)	155
6.4.3. Evaluación de la toxicidad sobre <i>A. swirskii</i> en campo	157
6.5. Discusión	159
6.5.1. Evaluación de la toxicidad en laboratorio.....	159
6.5.1.1. Toxicidad por contacto	159
6.5.1.2. Ensayos de preferencia	160
6.5.2. Evaluación de la toxicidad sobre <i>E. mundus</i> en invernadero (semicampo)	162
6.5.3. Evaluación de la toxicidad sobre <i>A. swirskii</i> en campo	162
 CHAPTER 7: DEEP SEQUENCING OF THE BACTERIAL COMMUNITY IN PARASITIC WASPS AND ITS IMPACT ON EXPOSURE TO ABAMECTIN INSECTICIDE	
7.1. Introduction.....	165
7.2. Objectives	166
7.3. Materials and Methods.....	166
7.3.1. Insects	166
7.3.2. DNA Extraction	167

7.3.3. Next G sequencing: Illumina sequencing and taxonomic identification	167
7.3.4. Next 16S rDNA Nested PCR, cloning and sequencing of <i>Arthrobacter</i>	168
7.3.5. Bacterial protein extraction and esterase activity	169
7.3.6. Pesticide (residual contact test) and antibiotic assay	171
7.4. Results.....	172
7.4.1. Next G sequencing.....	172
7.4.2. <i>Arthrobacter</i> species in the parasitic wasps and bacterial esterases assay	175
7.4.3. Pesticide and antibiotic assay.....	176
7.5. Discussion.....	178
7.5.1. Next G sequencing.....	178
7.5.1.1. Gut bacteria.....	178
7.5.1.2. Bacteria present in pollen, nectar and honey	180
7.5.1.3. Bacteria present in whiteflies	181
7.5.1.4. Bacteria involved in insect reproduction	181
7.5.1.5. Bacteria involved in detoxification of pesticides	182
7.5.2. Influence of <i>Arthrobacter</i> species in the susceptibility of parasitic wasps to pesticides.....	183
CHAPTER 8: CONCLUSIONS	185
CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA	189

ABREVIATURAS

- **a.i.:** Active ingredient.
- **α -NPA:** α -naphthyl acetate.
- **ANOVA:** Análisis de varianza.
- **BOE:** Boletín Oficial del Estado.
- **CAI:** Centro de Asistencia a la Investigación.
- **CEE:** Comunidad Económica Europea.
- **CNME:** Centro Nacional de Microscopía Electrónica.
- **CSIC:** Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- **DDT:** Días después del tratamiento.
- **DMC:** Dosis Máxima en Campo.
- **DNA:** Deoxyribonucleic acid.
- **dsDNA:** Double-stranded deoxyribonucleic acid.
- **E.T.S.I.A.:** Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.
- **EC:** Concentrado emulsionable.
- **F:** F de Fisher.
- **g.l.:** Grados de libertad.
- **GABA:** Ácido gamma-aminobutírico.
- **GIP:** Gestión Integrada de Plagas.

- **ha**: Hectárea.
- **HR**: Humedad relativa.
- **i.a.**: Ingrediente activo.
- **ICA**: Instituto de Ciencias Agrarias.
- **IIC**: Intelligent Insect Control
- **IPM**: Integrated pest management programs.
- **IRAC**: Insecticide Resistance Action Committee.
- **K**: K de Krushall-Wallis.
- **LB**: Lysogeny broth.
- **LLINs**: Mallas insecticidas de larga duración (*Long Lasting Insecticidal Nets*).
- **LMM**: Modelo de efectos mixtos lineales.
- **MAGRAMA**: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- **MET**: Microscopio electrónico de transmisión.
- **MFRC**: Maximum field recommended concentration.
- **nAChR**: receptor de la acetilcolina.
- **NMDS**: Non-metric multidimensional scaling.
- **OD**: Dispersión oleosa.
- **OILB**: Organización Internacional de Lucha Biológica.
- **OJEU**: Oficial Journal of the European Union.
- **OMS**: Organización Mundial de la Salud.

- **OTU**: Operational taxonomic unit.
- **p.c.**: Producto comercial.
- **P**: Valor p de probabilidad.
- **PAR**: Radiación fotosintéticamente activa.
- **PCR**: Polymerase chain reaction.
- **PIEC**: Concentración ambiental predecible inicial (*Predicted inicial environmental concentration*).
- **ppm**: parts per million.
- **RNA**: Ribonucleic acid.
- **rpm**: Revolutions per minute.
- **rRNA**: Ribosomal ribonucleic acid.
- **SC**: Suspensión concentrada.
- **SG**: Gránulos solubles en agua.
- **SP**: Polvo soluble en agua.
- **SP**: Sodium phosphate.
- **SRA**: Sequence read archive.
- **t**: t de Student.
- **t**: Tonelada.
- **TYLCV**: Virus del rizado amarillo del tomate o de la cuchara (*Tomato yellow leaf curl virus*).
- **UV**: Ultravioleta.

- **UV-A:** Ultravioleta A (400-315 nm).
- **UV-B:** Ultravioleta B (315-280 nm).
- **UV-C:** Ultravioleta C (280-100 nm).
- **W:** W de Wilcoxon.
- **WG:** Granulado dispersable en agua.
- **WHO:** World Health Organisation.

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
Figura 1: Mapa de distribución mundial de <i>B. tabaci</i>	13
Figura 2: Ciclo de vida de <i>B. tabaci</i>	14
Figura 3: Huevo de <i>B. tabaci</i>	14
Figura 4: Ninfa de <i>B. tabaci</i> . Detalle de los micetomas	15
Figuras 5 y 6: Pupa y exuvia de <i>B. tabaci</i>	15
Figura 7: Adulto de <i>B. tabaci</i>	16
Figura 8: Distribución geográfica de <i>E. mundus</i> en Europa	22
Figura 9: Ninfa N2 de <i>B. tabaci</i> despegada de la hoja, bajo ella un huevo de <i>E. mundus</i>	23
Figura 10: Ninfa de <i>B. tabaci</i> parasitada por <i>E. mundus</i> (micetomas desplazados)	24
Figura 11: Pupa de <i>E. mundus</i> al comienzo de dicho estado.....	24
Figura 12: Pupa de <i>E. mundus</i> al final de dicho estado	25
Figura 13: Exuvia de <i>E. mundus</i>	25
Figura 14: Adulto de <i>E. mundus</i>	25
Figura 15: Detalle de las antenas de <i>E. mundus</i> en ambos sexos. Foto al microscopio óptico	26
Figura 16: Ciclo de vida de <i>A. swirskii</i>	29

Figura 17: Huevos de <i>A. swirskii</i>	29
Figura 18: Larva de <i>A. swirskii</i>	30
Figura 19: Adultos de <i>A. swirskii</i>	30
Figura 20: Detalle de las espermatecas de una hembra de <i>A. swirskii</i> y de la placa ventroanal, al microscopio óptico	31
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	37
Figura 21: Disposición de las jaulas de cría en el interior de la cámara climática SANYO	41
Figura 22: Detalle de las unidades de cría de <i>A. swirskii</i>	42
CAPÍTULO 4: COMPATIBILIDAD DE MODERNOS INSECTICIDAS CON <i>ERETMOCERUS MUNDUS</i> Y <i>AMBLyseius swirskii</i>	47
Figura 23: Detalle de los cristales donde se colocaban las pupas de <i>E. mundus</i> para el tratamiento insecticida	60
Figura 24: Detalle de una caja de metacrilato con las pupas tratadas de <i>E. mundus</i> y distribución de las mismas en el interior del insectario	61
Figura 25: Detalle de las cajas empleadas para la evaluación de la parasitación en <i>E. mundus</i>	62
Figura 26: Detalle de las placas Petri® tratadas con los huevos de <i>A. swirskii</i>	62
Figura 27: Detalle de las unidades de ensayo empleadas en el tratamiento de huevos de <i>A. swirskii</i>	63
Figura 28: Detalle de las cajas empleadas para la evaluación de la fecundidad de <i>A. swirskii</i>	64

Figura 29: Detalle de los vasos empleados para la evaluación de la fertilidad de <i>A. swirskii</i>	64
Figura 30: Detalle de las placas de cristal tratadas	65
Figura 31: Detalle de las unidades de ensayo para <i>E. mundus</i>	65
Figura 32: Detalle de las unidades de ensayo para <i>A. swirskii</i>	66
Figura 33: Detalle de las unidades de ensayo conectadas al circuito de ventilación forzada	66
Figura 34: Detalle de las plantas de tomate y pimiento usadas en los distintos ensayos de persistencia.....	68
Figura 35: Detalle de las hojas de pimiento tratadas e introducidas en tubos eppendorf con agar en el ensayo de persistencia con <i>A. swirski</i>	69
Figura 36: Detalle de las unidades experimentales en los ensayos de persistencia	69
Figura 37: Reducción media de la emergencia (%) de los adultos de <i>E. mundus</i> tras el tratamiento directo de las pupas con los insecticidas evaluados	71
Figura 38: Incremento de la mortalidad (%) de los adultos de <i>E. mundus</i> tras el contacto residual con los insecticidas evaluados durante 72 horas.....	74
Figura 39: Reducción (%) de la parasitación de los adultos de <i>E. mundus</i> (número de ninfas de <i>B. tabaci</i> parasitadas por hembra de <i>E. mundus</i> y día) tras el contacto residual con los insecticidas evaluados durante 72 horas	75
Figura 40: Reducción de la eclosión (%) de los huevos de <i>A. swirskii</i> tras la pulverización de los mismos con los insecticidas evaluados.....	79

Figura 41: Incremento de la mortalidad (%) durante los estadios ninfales de <i>A. swirskii</i> tras el tratamiento directo de los huevos con los insecticidas evaluados	79
Figura 42: Incremento de la mortalidad (%) de los adultos de <i>A. swirskii</i> cuando los ácaros fueron expuestos durante 72 horas a los residuos frescos de los insecticidas evaluados	82
Figura 43: Incremento de la mortalidad de los adultos de <i>A. swirskii</i> a los 7 días del fin de la exposición a los residuos frescos insecticidas	84
CAPÍTULO 5: COMPATIBILIDAD DE BARRERAS FOTOSELECTIVAS CON <i>ERETMOCERUS MUNDUS</i>	101
Figura 44: Radiación transmitida (%) bajo cada tipo de barrera fotoselectiva estudiada (Malla T: control negativo; Plástico térmico antiviral: control positivo)	105
Figura 45: Detalle de los jaulones empleados en el ensayo y disposición de los mismos en la senda botánica.....	106
Figura 46: Detalle de la distribución de las distintas barreras fotoselectivas estudiadas a lo largo de la senda botánica, durante el ensayo	106
Figura 47: Detalle del atrayente alimenticio y de la disposición de las trampas en el interior de los jaulones	107
Figura 48: Detalle de la plataforma de vuelo donde fueron liberados los insectos	107
Figura 49: Detalle de los <i>E. mundus</i> [izquierda: ♂ (antena de coloración negra), derecha: ♀ (antena de coloración clara)] pegados en las trampas amarillas	108

Figura 50: Evolución de la temperatura y la humedad relativa durante las 24 horas de duración del ensayo (Madrid, Mayo 2012).....	109
Figura 51: Detalle de las unidades experimentales.....	111
Figura 52: Distribución panorámica de las jaulas bajo los focos de luz UV, a lo largo del invernadero	112
Figura 53: Detalle de la jaula usada para la adquisición del TYLCV por parte de las moscas blancas.....	113
Figura 54: Detalle de los síntomas de infección por TYLCV mostrados por las plantas de tomate	114
Figura 55: Detalle de los recipientes de liberación de <i>E. mundus</i> y su disposición en el interior de las jaulas	115
Figura 56: Detalle de la disposición del alimento de <i>E. mundus</i> en la planta	115
Figura 57: Cronograma de las tareas realizadas a lo largo de los ensayos de combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre <i>E. mundus</i>	116
Figura 58: Detalle de las muestras vegetales incluidas en la resina	119
Figura 59: Fotografías al microscopio electrónico de transmisión de las cutículas (imagen izquierda) y paredes celulares (imagen derecha) de la epidermis foliar	119
Figura 60: Evolución de la temperatura y la humedad relativa durante los ensayos	120
Figura 61: Combinación de efectos directos y mediados por planta de ambientes pobres en luz UV sobre <i>E. mundus</i> (Ensayo sin virus).....	127

Figura 62: Combinación de efectos directos y mediados por planta de ambientes pobres en luz UV sobre <i>E. mundus</i> (Ensayo con virus).....	132

CAPÍTULO 6: COMPATIBILIDAD DE MALLAS TRATADAS CON BIFENTRIN CON <i>ERETMOCERUS MUNDUS</i> Y <i>AMBLYSEIUS SWIRSKII</i>	139

Figura 63: Detalle de las unidades de ensayo	143

Figura 64: Detalle de las unidades experimentales conectadas al circuito de ventilación forzada en el ensayo de toxicidad por contacto	144

Figura 65: Detalle de las estructuras de metacrilato	145

Figura 66: Detalle del atrayente alimenticio (huevos y larvas de <i>C. lactis</i>) usado con el ácaro depredador <i>A. swirskii</i>	145

Figura 67: Detalle del atrayente alimenticio (hojas de tomate infestadas con ninfas N2 de <i>B. tabaci</i> y miel) usado con el parasitoide <i>E. mundus</i>	146

Figura 68: Orientación de las unidades de ensayo en el insectario. B: Malla tratada con bifentrin. C: Malla control	147

Figura 69: Detalle de las jaulas empleadas en el ensayo. Vista de los distintos laterales de las mismas.....	148

Figura 70: Disposición de las unidades experimentales en el invernadero	148

Figura 71: Detalle de la disposición de las mallas a lo largo de las paredes de los invernaderos en Almería.....	150

Figura 72: Esquema de las líneas de muestreo en cada banda a lo largo de los invernaderos.....	152

Figura 73: Mortalidad media (%) de los adultos de <i>A. swirskii</i> y <i>E. mundus</i> tras el contacto durante 72 horas con las mallas control y tratada con bifentrin.....	153
Figura 74: Porcentaje medio de adultos de <i>A. swirskii</i> y <i>E. mundus</i> que escogieron cada tipo de malla. A. Valor referido al total de adultos que atravesaron cada malla. B. Valor referido al total de adultos introducidos en cada estructura en Y	154
Figura 75: Mortalidad media de <i>A. swirskii</i> y <i>E. mundus</i> 72 horas después de atravesar cada tipo de malla.....	155
Figura 76: Ninfas de <i>B. tabaci</i> parasitadas por <i>E. mundus</i> , muertas y vivas según el tratamiento en los ensayos en invernadero (semicampo)	156
Figura 77: Número medio de individuos por hoja según el tipo de malla durante el ensayo de campo realizado en Almería	158
Figura 78: Número medio de individuos por hoja según la distancia a la malla durante el ensayo de campo realizado en Almería	159
CHAPTER 7: DEEP SEQUENCING OF THE BACTERIAL COMMUNITY IN PARASITIC WASPS AND ITS IMPACT ON EXPOSURE TO ABAMECTIN INSECTICIDE	165
Figure 79: Recombinant clones on a carbencilin-containing LB agar plate.....	169
Figure 80: Coomassie (Bradford) protein assay	170
Figure 81: Esterase activity assay	171
Figure 82: Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot.....	174
Figure 83: Percentage mortality of <i>E. mundus</i> adults pretreated or not with tetracycline (100 ppm), at 72 h after exposure to fresh residues of abamectin (ABA) and water (C)	177

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
Tabla 1: Situación mundial de los cultivos hortícolas	5
Tabla 2: Producción de hortícolas (t) de los principales países productores	6
Tabla 3: Área cosechada y producción nacional de hortícolas	6
Tabla 4: Superficies dedicadas a cultivos hortícolas por Comunidad Autónoma en el año 2012.....	7
Tabla 5: Superficies y producciones por cultivo hortícola	9
Tabla 6: Tiempo de desarrollo (días) de los biotipos B y Q de <i>B. tabaci</i> sobre tomate a distintas temperaturas [fotoperiodo 16:8 h (L:O)]	17
Tabla 7: Tiempo de desarrollo (días) de <i>B. tabaci</i> biotipo B sobre distintos huéspedes y a 25°C.....	18
Tabla 8: Tiempo de desarrollo (días) de los estados inmaduros de <i>E. mundus</i> en tomate y pimiento a 25 °C.....	27
Tabla 9: Longevidad, parámetros reproductivos y <i>host feeding</i> de <i>E. mundus</i> en tomate y pimiento infestados con ninfas N2 de <i>B. tabaci</i>	27
Tabla 10: Tiempo de desarrollo (días) de huevo a adulto del ácaro depredador <i>A. swirskii</i> en función de su alimentación	33
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	37
Tabla 11: Tiempo de desarrollo (días) de los estados inmaduros de <i>A. swirskii</i> bajo las condiciones de cría de la Unidad de Protección de Cultivos [25°C, 75-85% HR, 16:8 h (L:O)]	43

**CAPÍTULO 4: COMPATIBILIDAD DE MODERNOS INSECTICIDAS CON
ERETMOCERUS MUNDUS Y *AMBLYSEIUS SWIRSKII*..... 47**

Tabla 12: Resumen de los ensayos llevados a cabo en *E. mundus* y *A. swirskii* con los productos fitosanitarios y parámetros evaluados para determinar sus efectos nocivos 49

Tabla 13: Características principales de los insecticidas evaluados 51

Tabla 14: Concentración ambiental predecible inicial (PIEC) 59

Tabla 15: Valores del PIEC y de las dosis máximas de campo de los insecticidas evaluados 59

Tabla 16: Condiciones ambientales reinantes en el interior del invernadero durante los ensayos de persistencia 68

Tabla 17: Incremento de la mortalidad a las 72 horas de la emergencia y reducción de la parasitación de los adultos de *E. mundus* emergidos de pupas tratadas directamente con los distintos insecticidas 72

Tabla 18: Clasificación OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado tras el tratamiento directo de las pupas de *E. mundus* y clasificación final de los mismos 73

Tabla 19: Clasificación OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado tras la exposición de los adultos de *E. mundus* a residuos frescos de los plaguicidas y clasificación final de los mismos 75

Tabla 20: Mortalidad media de los adultos de *E. mundus* tras ser expuestos durante 72 horas a los residuos insecticidas de 0, 4, 10, 21 y 31 días de edad sobre hojas de tomate y capacidad de parasitación media de los supervivientes 77

Tabla 21: Reducción de la fecundidad y fertilidad (%) en las hembras de *A. swirskii* procedentes de huevos tratados por pulverización directa con los insecticidas evaluados 80

Tabla 22: Clasificación OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado y clasificación final, tras el tratamiento directo de los huevos de <i>A. swirskii</i> con los mismos	81
Tabla 23: Reducción de la fecundidad y fertilidad (%) de las hembras de <i>A. swirskii</i> cuando fueron expuestas durante 72 horas a los insecticidas evaluados por contacto residual	83
Tabla 24: Clasificación OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado tras la exposición de los adultos de <i>A. swirskii</i> a residuos frescos de los insecticidas y clasificación final de los mismos	84
Tabla 25: Mortalidad media de los adultos de <i>A. swirskii</i> tras ser expuestos durante 72 horas a los residuos insecticidas de 0, 4 y 10 días de edad sobre hojas de pimiento y fecundidad y fertilidad de las hembras supervivientes	86
CAPÍTULO 5: COMPATIBILIDAD DE BARRERAS FOTOSELECTIVAS CON <i>ERETMOCERUS MUNDUS</i>	101
Tabla 26: Características físicas de las barreras fotoselectivas estudiadas.....	104
Tabla 27: Condiciones ambientales registradas durante el ensayo (Madrid, Mayo 2012)	108
Tabla 28: Radiaciones PAR y UV registradas durante el ensayo (Madrid, Mayo 2012)	109
Tabla 29: Características físicas de las barreras fotoselectivas estudiadas.....	110
Tabla 30: Condiciones ambientales registradas durante los ensayos	120
Tabla 31: Radiaciones PAR y UV registradas durante los ensayos de combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre <i>E. mundus</i>	122

Tabla 32: Efecto directo de cubiertas fotoselectivas sobre la emergencia y la capacidad de visión, orientación y vuelo de <i>E. mundus</i>	123
Tabla 33: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el crecimiento y la biomasa de las plantas de tomate sanas	124
Tabla 34: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el contenido C, H, N y S de las plantas de tomate sanas	125
Tabla 35: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el espesor de las cutículas y paredes celulares de la epidermis de las plantas de tomate sanas	125
Tabla 36: Combinación de efectos directos y mediados por planta de ambientes pobres en luz UV sobre <i>B. tabaci</i>	126
Tabla 37: Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga de ambientes pobres en luz UV sobre la emergencia y la mortalidad de <i>E. mundus</i> durante los estados inmaduros o durante la emergencia.....	128
Tabla 38: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el crecimiento y la biomasa de las plantas de tomate infectadas con el TYLCV	129
Tabla 39: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el contenido C, H, N y S de las plantas de tomate infectadas con el TYLCV	129
Tabla 40: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el espesor de las cutículas y paredes celulares de la epidermis de las plantas de tomate infectadas con el TYLCV	130
Tabla 41: Combinación de efectos directos y mediados por planta infectada con el TYLCV de ambientes pobres en luz UV sobre <i>B. tabaci</i>	131
Tabla 42: Combinación de efectos directos y mediados por planta infectada con el TYLCV y plaga de ambientes pobres en luz UV sobre la emergencia y la mortalidad de <i>E. mundus</i> durante los estados inmaduros o durante la emergencia	132

CAPÍTULO 6: COMPATIBILIDAD DE MALLAS TRATADAS CON BIFENTRIN CON <i>ERETMOCERUS MUNDUS</i> Y <i>AMBLYSEIUS SWIRSKII</i>	139

Tabla 43: Resumen de los ensayos llevados a cabo con las mallas tratadas con bifentrin y los parámetros evaluados en cada uno de ellos	141

Tabla 44: Cronograma de las tareas realizadas a lo largo del ensayo de campo en Almería	149

Tabla 45: Características principales de los productos insecticidas utilizados en el ensayo de campo en Almería, destinados a la eliminación de moscas blancas, trips y pulgones que pudiesen estar establecidos en el cultivo previamente a la colocación de las mallas	151

Tabla 46: Número medio de ninfas de <i>B. tabaci</i> introducidas en cada tipo de jaula en los ensayos de invernadero (semicampo)	156

Tabla 47: Número de adultos emergidos y muertos de <i>E. mundus</i> según el tratamiento en los ensayos de invernadero (semicampo)	157

Tabla 48: Significación de las variables fijadas y de la interacción de las mismas a lo largo del ensayo de campo en Almería, según el modelo de efectos mixtos lineales (LLM)	158

CHAPTER 7: DEEP SEQUENCING OF THE BACTERIAL COMMUNITY IN PARASITIC WASPS AND ITS IMPACT ON EXPOSURE TO ABAMECTIN INSECTICIDE	165

Table 49: Bacterial primers used to amplify the 16S rDNA gene of Actinobacteria	168

Table 50: Percentage distribution of sequencing read frequencies corresponding to the different bacterial families and genera in the three parasitic wasps (<i>E. formosa</i> , <i>E. mundus</i> (two strains) and <i>E. eremicus</i>) and percentage of sequence similarity	

between the sequencing reads and 16S ribosomal RNA sequences at genus level	173
Table 51: <i>Arthrobacter</i> species identified in the parasitic wasps studied.....	175
Table 52: Esterase activity towards α –NPA in <i>Arthrobacter</i> species.....	176
Table 53: Lethal effects of different tetracycline concentrations on <i>E. mundus</i> adults	176

RESUMEN

Los programas de Gestión Integrada de Plagas (GIP) promueven el uso de estrategias de control que sean respetuosas con el medio ambiente, sin embargo el uso de insecticidas en los cultivos hortícolas sigue siendo necesario para el control de determinadas plagas, como es el caso de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius). Por ello, el objetivo de esta tesis es el estudio de la integración de las tres estrategias de control más empleadas hoy en día para el control de plagas: el control biológico, el físico y el químico.

Una primera parte de este trabajo ha consistido en el estudio de los **efectos letales y subletales de once insecticidas**, aplicados a la dosis máxima de campo, sobre los enemigos naturales *Eretmocerus mundus* Mercet y *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot, mediante ensayos de laboratorio y persistencia (laboratorio extendido). Para la evaluación de la toxicidad de los insecticidas sobre los estados de vida más protegidos de estos enemigos naturales, se trataron bajo la Torre de Potter las pupas de *E. mundus* y los huevos de *A. swirskii*. Además, se llevaron a cabo ensayos de contacto residual para determinar los efectos letales y subletales de estos insecticidas sobre el estado adulto de ambas especies de enemigos naturales. Para ello, los pesticidas se aplicaron sobre placas de cristal (laboratorio) o sobre plantas (laboratorio extendido: persistencia).

Los resultados mostraron que los insecticidas flonicamida, flubendiamida, metaflumizona, metoxifenocida, spiromesifen y spirotetramat eran compatibles con el **estado de pupa de *E. mundus*** (OILB 1: Inocuos). Sin embargo, abamectina, deltametrina y emamectina fueron categorizadas como ligeramente tóxicas (OILB 2) al causar efectos deletéreos. Los dos pesticidas más tóxicos fueron spinosad y sulfoxaflor, los cuales redujeron significativamente la emergencia de las pupas tratadas (OILB 4: Tóxicos).

Flonicamida, flubendiamida, metoxifenocida y spiromesifen fueron compatibles con el **estado adulto de *E. mundus*** (OILB 1: Inocuos). Abamectina, deltametrina, emamectina, metaflumizona y spiromesifen pueden ser recomendados para su uso en programas de GIP, si se usan los plazos de seguridad apropiados, de acuerdo con la

persistencia de cada uno de estos insecticidas, antes de la liberación del enemigo natural. Al contrario, spinosad y sulfoxaflor no resultaron ser compatibles (OILB D: Persistentes), aunque la realización de ensayos adicionales es necesaria para ver los efectos de los mismos en campo.

Todos los insecticidas estudiados, excepto el spirotetramat (OILB 2: Ligeramente tóxico), fueron selectivos para el **estado de huevo de *A. swirskii*** (OILB 1: Inocuos).

Flonicamida, flubendiamida, metaflumizona, metoxifenocida, spiromesifen, spirotetramat y sulfoxaflor, fueron compatibles con **el estado adulto de *A. swirskii*** (OILB 1: Inocuos). Abamectina, deltametrina, emamectina y spinosad pueden ser recomendados para su uso en programas de GIP, si se usan los plazos de seguridad apropiados, de acuerdo con la persistencia de cada uno de estos insecticidas, antes de la liberación del enemigo natural.

Entre las nuevas estrategias de la GIP, los **plásticos y mallas fotoselectivas** han demostrado ser una herramienta importante para el control de plagas y enfermedades en cultivos hortícolas protegidos. Por ello, en una segunda parte de este trabajo, se estudiaron tanto los efectos directos, como la combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV), sobre *E. mundus*.

En primer lugar, se realizó un ensayo al aire libre para la evaluación de la capacidad de vuelo de *E. mundus* en cajas tipo túnel (1 x 0,6 x 0,6 m) cubiertas con distintas barreras absorbentes de luz UV. Se detectó un efecto directo en la capacidad de orientación de *E. mundus*, debido a que este parasitoide utiliza estímulos visuales para localizar a sus huéspedes, únicamente en las barreras que bloqueaban más del 65% de la luz UV (malla G). En segundo lugar, bajo condiciones de invernadero, se evaluó la combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga sobre *E. mundus*, usando plantas de tomate sanas o infectadas con el TYLCV y cajas (30 x 30 x 60 cm) cubiertas con los distintos plásticos fotoselectivos. En este caso, no se observó ningún efecto en la capacidad benéfica del parasitoide cuando este estaba en contacto con plantas de tomate infestadas con ninfas de *B. tabaci*, lo que demuestra que este insecto usa estímulos táctiles para encontrar a sus huéspedes a cortas distancias. Además, las diferentes

condiciones de radiación UV estudiadas tuvieron cierto impacto en la morfología, fisiología y bioquímica de las plantas de tomate, infestadas o no con el virus de la cuchara, detectándose pequeñas alteraciones en alguno de los parámetros estudiados, como el peso fresco y seco, el contenido en H y el espesor de las cutículas y de las paredes celulares de la epidermis foliar. Por último, no se observaron efectos de la radiación UV mediados por planta, ni en *B. tabaci* ni en su parasitoide, *E. mundus*.

En una tercera parte, se evaluaron los efectos de una **mallá tratada con bifentrin** sobre ambos enemigos naturales, en ensayos de laboratorio, semicampo y campo. Las mallas tratadas fueron diseñadas originariamente para el control de mosquitos vectores de la malaria, y actualmente se está trabajando para su uso en agricultura, como una nueva estrategia de control de plagas. En ensayos de laboratorio, cuando adultos de *E. mundus* y *A. swirskii* se expusieron por contacto durante 72 horas con la mallá tratada (cajas de 6 cm diámetro), se registró una alta mortalidad. Sin embargo, en el ensayo de preferencia, estos enemigos naturales no fueron capaces de detectar la presencia de bifentrin y, en aquellos individuos forzados a atravesar la mallá tratada, no se observó mortalidad a corto plazo (72 horas). En estudios de semicampo, llevados a cabo bajo condiciones de invernadero en cajas de 25 x 25 x 60 cm de altura, la capacidad benéfica de *E. mundus* no se vio afectada. Finalmente, en ensayos de campo llevados a cabo en invernaderos comerciales (4000m²) en Almería, *A. swirskii* no se vio afectado por la presencia en el cultivo de la mallá tratada con bifentrin y los niveles de infestación de *B. tabaci* y *F. occidentalis* detectados bajo dicha mallá, fueron inferiores a los del control.

Por último, se ha evaluado **la composición de la microflora bacteriana de tres especies de parasitoides, *E. mundus*, *Eretmocerus eremicus* Rose & Zolnerowich y *Encarsia formosa* Gahan, y la influencia de la misma en su susceptibilidad a insecticidas**. Se llevó a cabo una extracción total de ADN de los insectos y la región variable V4 del ARNr se amplificó usando cebadores universales bacterianos. Para identificar las secuencias de los géneros bacterianos presentes en los parasitoides, se realizó una *Next Generation sequencing (Illumina sequencing)*. Una vez identificados los géneros bacterianos, el gen ADNr 16S de las Actinobacterias se amplificó del ADN extraído de los insectos, usando cebadores universales bacterianos y específicos de Actinobacterias, y los productos de la *Nested PCR* fueron clonados para identificar

todas las especies del género *Arthrobacter*. Tres bacterias (*A. aurescens* Phillips, *A. nicotinovarans* Kodama, Yamamoto, Amano and Amichi y *A. uratoxydans* Stackebrandt, Fowler, Fiedler and Seiler), próximas a las especies de *Arthrobacter* presentes en los parasitoides, se obtuvieron de la colección bacteriana del BCCM^{TM}/LMG y se midió su actividad esterasa. Finalmente, se realizaron ensayos con antibióticos (tetraciclina) y de contacto residual con insecticidas (abamectina) para determinar la influencia de las especies de *Arthrobacter* en la susceptibilidad de *E. mundus* a insecticidas. Los resultados muestran que este género bacteriano puede afectar a la toxicidad de *E. mundus* a abamectina, mostrando la importancia de la comunidad microbiana en enemigos naturales, factor que debe ser considerado en los estudios de evaluación de los riesgos de los insecticidas.

SUMMARY

Integrated Pest Management (IPM) programs promote the use of control strategies more respectful with the environment; however the use of insecticides in vegetable crops is still needed to control certain pests, such as the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). Therefore, the objective of this work is to study the integration of the three most commonly used pest control strategies nowadays: biological, physical and chemical control.

Firstly, **the lethal and sublethal effects of eleven insecticides**, applied at their maximum field recommended concentration, on the parasitic wasp *Eretmocerus mundus* Mercet and the predator *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot has been assessed in the laboratory and in persistence tests (extended laboratory). To test the effects of pesticides on the most protected life stage of these natural enemies, *E. mundus* pupae and *A. swirskii* eggs were sprayed under a Potter precision spray tower. Laboratory contact tests were therefore conducted to determine the lethal and sublethal effects of these pesticides on the adult stage of these natural enemies. In the residual contact tests the pesticides were applied on glass plates (laboratory) or plants (extended laboratory: persistence).

The study showed that the insecticides flonicamid, flubendiamide, metaflumizone, methoxyfenozide, spiromesifen and spirotetramat were selective for *E. mundus* pupae (IOBC 1: Harmless). Nevertheless, abamectin, deltamethrin and emamectin were categorized as slightly harmful (IOBC 2) due to the deleterious effects caused. The two most harmful pesticides were spinosad and sulfoxaflor, which significantly reduced the adult emergence from treated pupae (IOBC 4: Harmful).

Flonicamid, flubendiamide, methoxyfenozide and spiromesifen were compatible with *E. mundus* adults (IOBC 1: Harmless). Base on the duration of the harmful activity, abamectin, deltamethrin, emamectin, metaflumizone and spirotetramat could be recommended for use in IPM programs if appropriate safety deadlines are used before the natural enemy release. On the contrary, spinosad and sulfoxaflor were not

compatible (IOBC D: persistent), although additional studies are required to determine their effects under field conditions.

All the pesticides tested, except spirotetramat (IOBC 2: Slightly harmful), were selective for *A. swirskii* eggs (IOBC 1: Harmless).

Flonicamid, flubendiamide, metaflumizone, methoxyfenozide, spiromesifen, spirotetramat and sulfoxaflor were compatible with *A. swirskii* adults (IOBC 1: Harmless). However, abamectin, deltamethrin, emamectin and spinosad could be recommended for use in IPM programs if appropriate safety deadlines are used before the natural enemy release.

Among new IPM strategies, **UV-absorbing photoselective plastic films and nets** have been shown to be an important tool for the control of pests and diseases in horticultural protected crops. Because of that, we secondly studied the plant and pest insect-mediated and/or the direct effects on *E. mundus* under different UV radiation conditions, in presence or absence of the *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV).

In the first experiment, performed outdoors, the flight activity of *E. mundus* was studied in one-chamber tunnels (1 x 0.6 x 0.6 m) covered with different photoselective barriers. Because *E. mundus* uses visual cues for host location at a long distance, a direct effect on its host location ability was detected, but only in the UV-absorbing barriers blocking more than 65% of the UV light (G net). In a second experiment, the direct and plant and pest insect-mediated effects of different UV radiation conditions on *E. mundus* were studied, inside cages (30 x 30 x 60 cm) covered with the different UV-plastic films and under greenhouse conditions, using healthy or TYLCV-virus infected tomato plants. In this case, not any effect on the beneficial capacity of this parasitoid was detected, proving that he uses tactile cues at a short distance of the host. Moreover, the different UV radiation conditions studied had a certain direct impact in the morphology, physiology and biochemistry of tomato plants infested or not with the TYLCV, and small alterations in some parameters such as fresh and dry weight, H percentage and cuticle and cell wall thickness of epidermal cells of the leaves, were detected. Finally, none plant-mediated UV effects neither in the whitefly *B. tabaci* nor in their parasitic wasp were found.

Thirdly, the effects of a **bifenthrin treated net** were evaluated in different laboratory, semi-field and field experiments on the natural enemies studied. Treated nets were developed long time ago aiming at the control of the mosquitoes vectors of malaria, and nowadays, there is a great interest on assessing the possibility of their use in agriculture. In laboratory assays, a high mortality was recorded when *E. mundus* and *A. swirskii* adults were exposed by contact to the bifenthrin treated net for 72 hours in small cages (12 cm diameter). However, these natural enemies were not able to detect the presence of bifenthrin in a dual-choice test and no short-term mortality (72 hours) was recorded in those individuals that went through the treated net. In semi-field assays, performed under greenhouse conditions with cages of 25 x 25 x 60 cm high, the beneficial capacity of *E. mundus* was not affected. Finally, in field assays carried out in commercial multispans greenhouses (4000 m²) in Almería, *A. swirskii* was not affected by the presence of the bifenthrin treated net in the crop and the *B. tabaci* and *F. occidentalis* infestation levels were significantly lower than in the control.

Finally, **the composition of the microflora present in three species of parasitoids, *E. mundus*, *Eretmocerus eremicus* Rose & Zolnerowich and *Encarsia formosa* Gahan, and its influence in their susceptibility to insecticides**, have been assessed. A total DNA extraction was performed on insects and universal bacterial primers were used to amplify the variable V4 region of the rRNA. A Next Generation sequencing (Illumina sequencing) was performed to identify the sequences of the bacterial genera present in the parasitic wasps. Once, the bacterial genera were identified, 16S rDNA gene of Actinobacteria were amplified from insects DNA extracts using the universal bacterial and actinobacterial primers, and the nested PCR products, were cloned to identify the *Arthrobacter* species. Three bacteria (*A. aurescens* Phillips, *A. nicotinovarans* Kodama, Yamamoto, Amano and Amichi and *A. uratoxydans* Stackebrandt, Fowler, Fiedler and Seiler), having the closest match with the *Arthrobacter* species present in the parasitic wasps, were obtained from the BCCM^{TM}/LMG bacteria collection and its esterase activity was measured. Finally, antibiotic and residual contact tests were done to determine the influence of *Arthrobacter* species in the susceptibility of *E. mundus* to pesticides (abamectin). The results suggest that this bacterial genus can affect the toxicity of *E. mundus* to

abamectin, which in turn supports the importance of the microbial community in natural enemies that it should be considered as a factor in risk assessment tests of pesticides.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Gestión Integrada de Plagas (GIP)

En los años 50, surgió una nueva visión de la agricultura relacionada con las exigencias derivadas de la protección medioambiental y la seguridad alimentaria, que consideraba como objetivo prioritario la obtención de productos agrícolas de calidad, de manera rentable y sin producir daños en el medio ambiente. Dentro de este marco de actuación de la actividad agraria se ha extendido el uso de algunos modernos sistemas productivos como la agricultura ecológica, la producción integrada y la producción controlada, en los que la protección de cultivos es un pilar fundamental y en particular, el control de plagas, que se hace desde la perspectiva de la Gestión Integrada de Plagas (Viñuela, 2005).

Kogan (1998) define la Gestión Integrada de Plagas como “un sistema de toma de decisiones para la selección y uso de estrategias de control de plagas, aisladas o coordinadas, en una estrategia de manejo que se basa en un análisis de costes beneficios en el que se tienen en cuenta los intereses y el impacto sobre los productores, sociedad y medio ambiente”. Por tanto, se puede decir que la GIP es una manera ecológica de controlar las plagas, cuyo objetivo no es la erradicación de plaga, si no el uso de todas los métodos de control disponibles, incluyendo la no intervención, para mantener las plagas por debajo del umbral que produce pérdidas económicas y a la vez, reducir los efectos negativos que puedan ocasionarse al medio ambiente (Viñuela, 2005).

La aplicación de los principios generales de la GIP es de obligado cumplimiento en la Unión Europea desde el 1 de Enero del 2014, según lo dispuesto en el Anexo III de la Directiva 2009/128/CE referente al uso sostenible de plaguicidas (OJEU, 2009a) (directiva transpuesta en España a través del Real Decreto 1311/2012; BOE, 2012).

De acuerdo con el Anexo I del R.D. 1311/2012, los principios generales de la GIP son los siguientes (MAGRAMA, 2014):

- Uso prioritario de las siguientes estrategias para prevenir o disminuir las poblaciones de organismos nocivos: rotación de cultivos, técnicas de cultivo adecuadas, material de siembra o plantación certificado, variedades resistentes, prácticas de fertilización, enmienda de suelos, riego y drenaje equilibradas, limpieza de maquinaria, protección y mejora de los organismos beneficiosos y sueltas de los mismos en caso necesario.
- En el control de plagas y enfermedades, se antepondrán los métodos biológicos, biotecnológicos, culturales, físicos y genéticos a los métodos químicos.
- Los organismos nocivos deben ser objeto de análisis preventivo y seguimiento durante el cultivo usando los métodos e instrumentos adecuados
- La aplicación de medidas directas de control de plagas se llevarán a cabo cuando el nivel de plaga supere el umbral de intervención.
- Cuando sea necesario el uso de métodos químicos, se usarán materias activas selectivas que no sean tóxicas para humanos, ganado ni medio ambiente.
- Uso de insecticidas limitado por parte de los usuarios profesionales.
- Estrategias para evitar la aparición de resistencias.
- Comprobación de la eficacia de las medidas fitosanitarias aplicadas por parte de los usuarios profesionales.

Dentro de las estrategias de la GIP, el control biológico, el físico y la aplicación de insecticidas selectivos son de las más utilizadas hoy en día.

1.1.1. Control biológico de plagas

El control biológico se basa en la importación, el aumento (inoculación e inundación) o la conservación de enemigos naturales (parasitoides, depredadores y microorganismos entomopatógenos) para lograr que la densidad de las poblaciones plaga permanezcan por debajo del nivel de daño económico (Jacas & Urbaneja, 2008).

Un punto clave en la GIP es el uso del control biológico como una medida directa de control (Jacas & Urbaneja, 2008).

Eilenberg y colaboradores (2001) distinguen entre cuatro grandes métodos de control biológico:

- Control biológico clásico: importación de agentes de control biológico exóticos de los lugares de origen de las plagas para lograr su establecimiento y conseguir un buen control a largo plazo.
- Control biológico inoculativo (control biológico aumentativo): liberación de un agente de control biológico con la intención de que se multiplique y controle la plaga, idealmente, durante todo el ciclo del cultivo.
- Control biológico inundativo (control biológico aumentativo): introducción masiva de enemigos naturales capaces de controlar las plagas por ellos mismos, sin que haya que esperar a la aparición de nuevas generaciones.
- Control biológico por conservación: protección de los enemigos naturales establecidos en los cultivos (eliminando medidas que destruyan a los entomófagos y adoptando actividades que promuevan su acción, longevidad y reproducción) para un adecuado control de las poblaciones plaga.

En los cultivos hortícolas, el control biológico más usado en los invernaderos es el aumentativo, que en función del nivel de plaga y la duración del ciclo será inundativo o inoculativo (Urbaneja & Jacas, 2008). Sin embargo, para el control de algunas plagas (ej. moscas blancas) también se aplica el control biológico de conservación (Alomar, 2003; Urbaneja *et al.*, 2007).

1.1.2. Control físico de plagas

Este tipo de control de plagas se basa en la modificación del medio ambiente físico de la plaga, perturbando el comportamiento de los insectos u ocasionando la muerte de los mismos.

Las técnicas usadas en este tipo de control son muy variadas y comprenden medidas como el uso de trampas y de barreras, modificación de la temperatura (almacenamiento en frío, calor, aire e inmersión en agua caliente), ventilación forzada, modificación de la atmósfera (CO₂, N, gases inertes), uso de luz visible y ultravioleta, radiación ionizante, infrasonidos y ultrasonidos (Vincent *et al.*, 2009).

Dentro de las herramientas de control físico más utilizadas, están las barreras físicas (Weintraub, 2009), ya sean de tipo anti-insectos o de exclusión (mallas con un tamaño de poro determinado que evitan la entrada al cultivo de plagas), fotoselectivas (mallas que bloquean la luz UV interfiriendo en la visión, orientación y dispersión de los insectos) o tratadas con insecticidas (mallas que combinan el control físico y químico, frenando la entrada de insectos al interior del cultivo y la dispersión de virus) (Díaz *et al.*, 2004).

1.1.3. Control químico de plagas

Tras el descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT, realizado por Paul Herman Müller en el año 1939, se inició la era de los insecticidas modernos, de síntesis y de amplio espectro. Al grupo de los clorados, se le unieron al poco tiempo los fosforados, carbamatos y piretroides, que parecían la solución definitiva al control de plagas, comenzando con ellos una “lucha química ciega” (Casida & Quistad, 1998).

A mediados de los 60's, comenzaron a aparecer los problemas derivados de la lucha química, como son la alteración del medio ambiente, la aparición de resistencias en los insectos plaga y la presencia de residuos insecticidas en los alimentos (Carson *et al.*, 1962; Delgado, 2010). Desde entonces, la lucha química ha sufrido una evolución constante.

Actualmente, a pesar de que se promulga un uso sostenible de insecticidas y pese a la existencia de un gran abanico de estrategias de control, el uso de insecticidas, en determinados momentos del cultivo, sigue siendo necesario para hacer frente a algunas especies de insectos plaga y producir económicamente. Por ello, una de las herramientas de la GIP más utilizadas hoy en día, es el uso conjunto del control biológico y químico (Medina *et al.*, 2008).

Con el objetivo de proteger a la fauna útil, nació la directiva 91/414/EEC (OJEC, 1991), que regula el uso de productos fitosanitarios en los países miembros de la Unión Europea y fue pionera en el mundo en establecer estudios ecotoxicológicos obligatorios en dicha fauna útil para poder realizar el registro de los mismos [actualmente derogada por el nuevo reglamento 1107/2009 (OJEU, 2009b)].

1.2. Los cultivos hortícolas

1.2.1. Importancia, distribución y producción mundial

La horticultura es una de las actividades agrícolas intensivas de mayor importancia mundial, ya que permite obtener grandes rendimientos por superficie y tiempo, al explotar al máximo las potencialidades del suelo y de las plantas. En este sentido, la horticultura se presenta como una alternativa que permite alimentar a millones de personas en el mundo, empleando para ello, insumos de alta tecnología y prácticas de manejo intensivo para la producción (Maroto, 2000).

En cuanto a la situación actual de los cultivos hortícolas en el mundo, se puede observar en la **Tabla 1** que, tanto la superficie dedicada a dichos cultivos como la producción de los mismos, han ido aumentando a lo largo de los últimos años (FAOSTAT, 2015).

Tabla 1: Situación mundial de los cultivos hortícolas.

AÑO	2011	2012	2013
Área cosechada (ha)	57.332.667,9	58.564.259,9	58.234.032,1
Producción (t)	1.087.699.705,9	1.113.767.611,1	1.135.690.215,8

Fuente: FAOSTAT, 2015.

Según datos de la FAO, los principales productores de hortícolas son China, India, EE.UU. y Turquía (**Tabla 2**), países que conjuntamente han producido durante los últimos 3 años el 67% de la producción mundial. España ocupa el décimo lugar en la producción mundial de hortícolas.

Tabla 2: Producción de hortalizas (t) de los principales países productores.

AÑO	2011	2012	2013
China	561.452.572	567.913.870	580.702.354
India	108.039.709	115.443.800	122.164.220
EE. UU.	37.747.756	35.834.949	32.143.513
Turquía	27.406.658	27.700.113	28.280.809

Fuente: FAOSTAT, 2015.

1.2.2. Importancia, distribución y producción nacional

La globalización de la horticultura demanda con mayor frecuencia unos estándares más competitivos y eficaces en la aplicación de técnicas sostenibles con el medio. La agricultura española es pionera en muchos de esos cambios que están sucediendo en Europa. Dichos cambios están liderados por las nuevas prácticas de manejo del suelo, las estrategias para optimizar el riego y la fertirrigación, el control integrado de plagas y las recientes técnicas de recolección (Maroto, 2000; Reche, 2012).

La horticultura española, debido a la diversidad climática presente en las distintas regiones del país, se caracteriza por una gran variedad de cultivos y de técnicas de cultivo (incluyendo los cultivos hidropónicos, característicos de la cultura hortícola española de los últimos años).

Hasta el año 2011 los cultivos hortalizas españoles experimentaron un ligero decrecimiento tanto en superficie, como en producción (**Tabla 3**). En el año 2012, a pesar de que la superficie dedicada a dichos cultivos fue inferior a la de años anteriores (348.000 ha), la producción aumentó un 2,4% (MAGRAMA, 2015a).

Tabla 3: Área cosechada y producción nacional de hortalizas.

AÑO	2009	2010	2011	2012
Área cosechada (ha)	379.000	364.000	351.000	348.000
Producción (t)	14.031.000	13.148.000	12.973.000	13.283.000

Fuente: MAGRAMA, 2015a.

En España el cultivo de productos hortícolas se distribuye por todo el territorio español, destacando las comunidades de Andalucía, Murcia y Castilla La Mancha, con el 32, 15 y 14% del total de la superficie dedicada a la producción de dichos cultivos, respectivamente (**Tabla 4**).

Tabla 4: Superficies dedicadas a cultivos hortícolas por Comunidad Autónoma en el año 2012.

CC. AA.	Superficie (ha)		
	Aire libre	Protegido	Total
Andalucía	53.599	54.983	108.582
Murcia	46.314	4.043	50.357
Castilla La Mancha	46.005	696	46.701
Extremadura	22.498	2.064	24.562
Comunidad Valenciana	19.174	2.471	21.645
Navarra	18.726	881	19.607
Galicia	13.325	2.006	15.331
Castilla y León	13.055	218	13.273
Cataluña	10.968	347	11.315
Aragón	9.618	95	9.713
La Rioja	4.211	359	4.570
Canarias	3.748	1.906	5.654
Baleares	2.285	259	2.544
País Vasco	2.151	263	2.414
Asturias	697	61	758
Madrid	641	97	738
Cantabria	151	0	151

Fuente: MAGRAMA, 2015a.

Dentro de la comunidad de Andalucía, la provincia de Almería, es la mayor productora de hortícolas. Almería cuenta con una superficie de cultivo de 48.676 ha, de las cuales 37.622 ha, se dedican al cultivo protegido.

Como se puede observar en la **Tabla 5**, el tomate es el principal cultivo hortícola en nuestro país. En el año 2012, se dedicaron a este cultivo 48.617 ha, obteniéndose una producción de 4.046.431,1 t de tomate.

El segundo producto hortícola más importante es la cebolla, con 22.867 ha de cultivo y una producción de 1.169.719,4 t.

Siguiendo en importancia a estos dos productos están el pimiento y el melón, con 17.440 ha y 970.294,5 t de producción y, 28.130 ha y 882.869,4 t de producción, respectivamente (MAGRAMA, 2015a).

La superficie de hortalizas cultivada en producción integrada, exceptuando la fresa, descendió de 21.835 ha en el año 2009 a 13.726 ha (el 1,65% de la superficie total dedicada a la producción integrada en nuestro país) en el 2012. La producción integrada tan solo se ha implantado en el 15% de las hortalizas, exceptuando la fresa, de la cual se cultiva el 71% bajo producción integrada (MAGRAMA, 2015b).

Tabla 5: Superficies y producciones por cultivo hortícola.

Cultivo	Superficie (ha)		Producción (t)		
	Aire Libre	Protegido	Aire Libre	Protegido	Total
Col	6664	5	215712,4	175	215887,4
Berza	640	0	19743	0	19743
Espárrago	9740	491	47504,4	2702,4	50206,8
Apio	1457	0	68449,4	0	68449,4
Lechuga	32260	936	848166,7	28763,3	876930
Escarola	2370	27	58065,7	891	58956,7
Espinaca	3161	128	60468,2	1344	61812,2
Acelga	2201	126	54679,4	6957,1	61636,5
Cardo	549	0	24997	0	24997
Grelo	7033	0	85452,1	0	85452,1
Canónigo	7	180	38,5	1152	1190,5
Rúcula	2	135	50	1026	1076
Achicoria verde	103	0	2767	0	2767
Endivia	355	0	8336,6	0	8336,6
Borraja	91	31	5036,6	1790	6826,6
Sandía	12740	6202	498089,3	373230,1	871319,4
Melón	22858	5272	691585,4	191284	882869,4
Calabaza	1882	23	47889,6	1035	48924,6
Calabacín	2556	6323	80862,6	384179,1	465041,7
Pepino	1043	7768	30806,3	717693,3	748499,6
Pepinillo	65	0	801,7	0	801,7
Berenjena	1412	2481	43988,1	202151,9	246140
Tomate	30116	18501	2164509,4	1881921,7	4046431,1
Pimiento	6700	10740	216765,4	753529,1	970294,5
Guindilla	144	5	2238,6	161,5	2400,1
Fresa y Fresón	219	7426	3517,6	287326,8	290844,4
Alcachofa	15638	0	195346,4	0	195346,4
Coliflor	22885	1	360551,7	15	360566,7
Brocoli	6573	14	144383,7	880	145263,7
Ajo	17494	0	154360,7	0	154360,7
Cebolla	22866	1	1169684,4	35	1169719,4
Cebolleta	819	1	21645,7	30	21675,7
Puerro	2985	14	90697	327	91024
Remolacha de mesa	702	0	30096,7	0	30096,7
Zanahoria	6697	48	366500,6	4070	370570,6
Rábano	351	2	6063,2	71	6134,2
Nabo	269	0	5968,2	0	5968,2
Judías verdes	6461	3233	102892,6	64925,1	167817,7
Guisantes verdes	11446	158	77210,9	2304,6	79515,5
Habas verdes	6216	0	50146,3	0	50146,3
Champiñón	0	47970	0	134699,8	134699,8
Setas	0	8239	0	12762,2	12762,2
Otros	9590	169	163338	6144	169482

Fuente: MAGRAMA, 2015a.

1.2.3. Plagas principales de los cultivos hortícolas españoles

Las plagas principales que atacan a algunos de los cultivos hortícolas más importantes en España, el tomate, el pimiento, el pepino, la berenjena, la judía, el calabacín, el melón y la sandía, son (Junta de Andalucía, 1994; Robledo *et al.*, 2009):

- Moscas blancas: *Bemisia tabaci* (Gennadius), *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae).
- Trips: *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae).
- Pulgones: *Aphis gossypii* Glover, *Myzus persicae* (Sulzer), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Aulacorthum solani* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae).
- Lepidópteros: *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), *Spodoptera exigua* (Hubner), *Spodoptera littoralis* Boisd., *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Chrysodeixis chalcites* (Esper), *Autographa gamma* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae).
- Araña roja: *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae).
- Araña blanca: *Poliphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae).
- Vasates: *Aculops lycopersici* (Masse) (Acari: Eriophyidae).
- Minadores: *Liriomyza trifolii* (Burgess), *Liriomyza bryoniae* (Kalt.) (Diptera: Agromyzidae).

De entre las plagas principales de los cultivos hortícolas españoles, hay que destacar a la mosca blanca *B. tabaci*, debido a que es transmisora de una gran cantidad de virus pertenecientes a los grupos geminivirus, closterovirus, carlavirus, potyvirus, nepovirus, luteovirus y rudivirus (Oliveira *et al.*, 2001), haciendo una especial mención al Virus del rizado amarillo del tomate o Virus de la cuchara (TYLCV), del cual *B. tabaci* es el único vector (Picó *et al.*, 1996). El TYLCV es uno de los virus de mayor importancia en el área mediterránea, ya que origina una parada casi total en el desarrollo de las plantas afectadas (Sánchez-Campos *et al.*, 1999; Khalil *et al.*, 2014).

1.3. *Bemisia tabaci* (Gennadius)

1.3.1. Sistemática

La posición sistemática de esta especie de mosca blanca que se cita a continuación, está basada en la clasificación de Fauna Europaea (2015a):

CLASE: Insecta

ORDEN: Hemiptera

SUBORDEN: Sternorrhyncha

SUPERFAMILIA: Aleyrodoidea

FAMILIA: Aleyrodidae

GÉNERO: *Bemisia* Quaintance & Baker, 1914

ESPECIE: *B. tabaci* (Gennadius, 1889)

1.3.2. Origen, distribución e importancia

Tres posibles orígenes se atribuyen a *B. tabaci*, conocida como mosca blanca del tabaco, del algodónero o de la batata: la India o Pakistán, orígenes propuestos por diversos autores debido a la existencia de una gran diversidad de parasitoides y de varias especies de *Bemisia* próximas (Brown *et al.*, 1995), o África tropical, atendiendo a una evolución filogenética del taxón *Bemisia* (Campbell *et al.*, 1996).

Fue descrita la primera vez por Gennadius, como plaga de tabaco en Grecia en el año 1889. En el continente americano se encontró por primera vez sobre boniato en 1887. Desde entonces, se ha ido extendiendo como plaga desde las regiones tropicales y subtropicales hasta las zonas templadas (Brown *et al.*, 1995).

Las primeras citas de este insecto como plaga en España datan de 1943, año en el que fue citada por Gómez-Menor (Gómez-Menor, 1943; Callejas & Ochando, 2005).

Hasta hace unos años, se pensaba que dicha especie estaba formada por 33 biotipos aunque actualmente se sabe que *B. tabaci* es un complejo de 24 especies indistinguibles morfológicamente y clasificadas dentro de 11 grandes grupos (De Barro *et al.*, 2011). Los biotipos se diferenciaban atendiendo a características como el desarrollo de

resistencias a insecticidas, asociación con el huésped, capacidad de dispersión, transmisión de virus e inducción de cambios fisiológicos en plantas, De Barro y colaboradores (2011) han puesto de manifiesto la inadecuación de las mismas para clasificar a *B. tabaci*, debido a que estas características son comunes entre distintos grupos genéticos y variables dentro de un mismo grupo.

La importancia de *B. tabaci* en la diseminación de enfermedades se puso de manifiesto a finales de los años 80, con la aparición del llamado biotipo B, que fue considerado una nueva especie de mosca blanca, *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (De Barro *et al.*, 2011).

En la década de los 90 la problemática de las moscas blancas como vectores de virosis se agudizó en España al aparecer el llamado biotipo Q, pues tenía una gran capacidad para desarrollar resistencia frente a la mayor parte de materias activas comercializadas, incluidos los neonicotinoides y los reguladores de crecimiento. Desde entonces, *B. tabaci* ha sido considerada plaga llave de muchos cultivos de invernadero (Urbaneja *et al.*, 2007).

Actualmente *B. tabaci* se encuentra distribuida por casi todo el mundo, como se puede ver en la **Figura 1**. Las grandes zonas del mundo donde está ausente son: Ecuador, Chile, norte de Brasil, gran parte de los EE.UU. y Canadá, parte del centro y norte del continente asiático, en los países africanos, Mauritania, Mali, Niger, Namibia, Botswana y Zambia, los países de la costa oriental báltica, y en los dos polos (EPPO, 2015). En Europa, según la Directiva 2000/29/CE (OJEC, 2000), se consideran plaga de cuarentena a todas las poblaciones de *B. tabaci* no europeas portadoras de los virus *Bean Golden Mosaic Virus*, *Cowpea Mild Mottle Virus*, *Lettuce Infectious Yellow Virus*, *Pepper Mild Tigré Virus*, *Squash Leaf Curl Virus*, *Euphorbia Mosaic Virus* y *Florida Tomato Virus*.

La importancia mundial de la especie *B. tabaci* radica en su papel de plaga polífaga y cosmopolita que la hace responsable de la reducción de producción en millones de hectáreas de cultivos en todo el mundo (Gerling *et al.*, 2001). Esta mosca blanca ocasiona dos tipos de daños en los cultivos, daños directos, debidos a la extracción de savia de las plantas, secreción de melaza e inducción de alteraciones fisiológicas, y

daños indirectos, como la transmisión de virus, el desarrollo de hongos conocidos como “negrilla” sobre la melaza secretada y la pérdida de capacidad fotosintética como consecuencia de la aparición de “negrilla” (Oliveira *et al.*, 2001).

Figura 1: Mapa de distribución mundial de *B. tabaci*

(Fuente: EPPO, 2015).

1.3.3. Ciclo de vida y descripción de los estados de desarrollo

Las moscas blancas poseen un desarrollo alometábolo. Su ciclo biológico comprende tres estados, huevo, ninfa y adulto (**Figura 2**).

Los huevos son de forma elíptica y asimétrica, y tienen una longitud de unos 0,18 mm. Recién puestos son de color blanquecino verde amarillento y se colorean gradualmente hasta adquirir un color marrón (**Figura 3**). La hembra de *B. tabaci* coloca los huevos principalmente en el envés de las hojas quedando en posición vertical gracias al pedicelo que los ancla al parénquima de las hojas (Malais & Ravensberg, 2006).

Figura 2: Ciclo de vida de *B. tabaci*
(Fuente: Malais & Ravensberg, 2006).

Figura 3: Huevo de *B. tabaci*
(Fuente: Bayer CropSciences, 2015).

Bemisia tabaci pasa por cuatro estadios ninfales antes de alcanzar el estado de adulto. El cuarto y último estadio ninfal es también conocido como pupa, ya que en él, *B. tabaci*, deja de alimentarse y permanece inmóvil.

El primer estadio ninfal es móvil, de forma elíptico-alargada, aplanada y de color blanco con una franja amarilla en la parte superior del abdomen. Posee tres pares de patas, dos antenas con cuatro artejos y ojos simples de color rojo, casi inapreciables. Una vez que encuentra un lugar adecuado para alimentarse, la ninfa se fija a la hoja, repliega las patas y las antenas y muda, transformándose en una ninfa de segundo estadio (Llorens & Garrido, 1992; Malais & Ravensberg, 2006).

El segundo estadio ninfal es de aspecto similar al estadio anterior, aunque de mayor tamaño que éste e inmóvil. En él comienzan a hacerse patentes los micetomas (órgano

en cuyo interior los insectos albergan microorganismos endosimbióticos) (Chapman, 1982), de color amarillo anaranjado, en la zona media del abdomen (**Figura 4**).

El tercer estadio ninfal es de aspecto similar al estadio anterior, aunque de mayor tamaño que éste y también inmóvil. Al comienzo del cuarto estadio ninfal, su forma es ancha y aplanada, mientras que al final de dicho estadio, va adquiriendo una forma circular. Tras estos cambios se le denomina pupa. Los ojos aparecen como dos grandes manchas rojas fácilmente visibles, los micetomas pasan a ser menos notables y se pueden observar los rudimentos alares (**Figura 5**). El adulto emerge del pupario haciendo una incisión en forma de T en el mismo (**Figura 6**) (Llorens & Garrido, 1992; Malais & Ravensberg, 2006).

Figura 4: Ninfa de *B. tabaci*. Detalle de los micetomas
(Fuente: Téllez *et al.*, 2006).

Figuras 5 y 6: Pupa y exuvia de *B. tabaci*
(Fuente: Téllez *et al.*, 2006).

Los adultos de *B. tabaci*, nada más emerger, despliegan sus alas, plegándolas posteriormente en paralelo, y recubren su cuerpo de una sustancia cerosa pulverulenta que es segregada por sus glándulas ventrales, dándoles ese color blanco crema

característico de las moscas blancas (**Figura 7**). Las hembras de *B. tabaci* se diferencian de los machos por su genitalia y por su mayor tamaño (Byrne & Bellows, 1991; Malais & Ravensberg, 2006).

Figura 7: Adulto de *B. tabaci*

(Fuente: EPPO, 2005).

Diez horas después de la emergencia, los machos adultos están listos para aparearse (Ortega *et al.*, 2008). Esta especie de mosca blanca posee una reproducción partenogenética facultativa arrenotoca, ya que las hembras no fecundadas ponen huevos haploides, que dan lugar a machos, y las fecundadas, diploides, que dan lugar a hembras (Byrne & Bellows, 1991; Ortega *et al.*, 2008).

La duración del desarrollo de los estados inmaduros de *B. tabaci* está determinada por diversos factores bióticos y abióticos, tales como la temperatura, el biotipo o especie, la planta huésped y el fotoperiodo.

La temperatura es uno de los factores abióticos con mayor influencia sobre la biología de estos aleiródidos. A temperaturas bajas, el tiempo de desarrollo de huevo a adulto es mayor que a temperaturas más altas y, además, es más variable entre individuos (González & Gallardo, 1999; Pereira, 2003). Según van Lenteren & Noldus (1990) el rango de temperaturas que permiten el desarrollo de *B. tabaci* se encuentra entre los 11 y 33°C, aunque otros autores, como Muñiz & Nombela (2001), han demostrado que la mosca blanca del tabaco puede completar su ciclo a 35°C.

Estudios llevados a cabo por Muñiz & Nombela (2001) ponen de manifiesto la influencia del biotipo o especie sobre la velocidad de desarrollo de *B. tabaci*. En dicho trabajo los autores estudian las variaciones en el ciclo de desarrollo de los dos biotipos

presentes en España, el B y el Q, a temperaturas constantes y sobre pimiento. Como se puede observar en la **Tabla 6**, el biotipo Q se desarrolla más rápidamente que el B a la misma temperatura.

Tabla 6: Tiempo de desarrollo (días) de los biotipos B y Q de *B. tabaci* sobre tomate a distintas temperaturas [fotoperiodo 16:8 h (L:O)].

Temperatura (°C)	Biotipo	Huevo	N1	N2	N3	N4	Huevo-Adulto
17	B	11,7±0,01a	5,3±0,01a	5,8±0,02a	10,1±0,03a	12,1±0,03a	45,2±0,09a
	Q	11,2±0,02b	5,1±0,02b	4,7±0,02b	9,6±0,02b	11,8±0,02b	42,7±0,1b
20	B	9,19±0,01a	4,2±0,03a	4,9±0,02a	7,9±0,02a	10,0±0,03a	36,5±0,06a
	Q	8,91±0,03b	3,9±0,02b	3,8±0,02b	7,8±0,03b	9,5±0,02b	34,1±0,1b
23	B	7,02±0,02a	3,3±0,01a	3,7±0,01a	5,5±0,02a	6,3±0,02a	26,2±0,05a
	Q	6,37±0,02b	3,1±0,02b	3,5±0,02b	5,2±0,04b	6,1±0,03b	24,4±0,12b
26	B	5,32±0,03a	3,1±0,02a	3,2±0,04a	4,6±0,02a	5,1±0,03a	21,5±0,1a
	Q	5,14±0,03b	2,8±0,02b	2,9±0,03b	4,6±0,02a	5,1±0,02a	20,6±0,12b
30	B	4,51±0,02a	2,6±0,02a	3,1±0,02a	3,6±0,02a	3,9±0,02a	17,9±0,04a
	Q	4,14±0,03b	2,2±0,03b	2,5±0,04b	3,6±0,02a	3,4±0,04b	16,1±0,14b
33	B	4,15±0,02a	2,4±0,01a	2,8±0,02a	3,3±0,02a	3,8±0,02a	16,8±0,06a
	Q	3,98±0,02b	2,1±0,04b	2,2±0,02b	3,8±0,01b	3,7±0,03b	15,9±0,12b
35	B	5,03±0,03a	3,1±0,02a	3,6±0,02a	4,1±0,02a	4,1±0,02a	19,8±0,12a
	Q	4,69±0,02b	2,4±0,03b	2,8±0,02b	4,1±0,01b	4,0±0,03a	18,1±0,10b

Fuente: Muñiz & Nombela, 2001.

La planta huésped es otro factor determinante en el tiempo de desarrollo (van Lenteren & Noldus, 1990; Tsai & Wang, 1996) (**Tabla 7**). También hay que tener en cuenta, que dentro de una misma especie de planta huésped, existen diferencias en el desarrollo de los estados inmaduros de *B. tabaci* en función de la edad de la hoja, debido a cambios en la composición nutritiva de las mismas (Pereira, 2003).

En cuanto al fotoperiodo, se sabe que la velocidad de desarrollo es mayor en condiciones de día largo (16L: 8O h) que en condiciones de día corto (8L: 16O h) (Pereira, 2003).

Tabla 7: Tiempo de desarrollo (días) de *B. tabaci* biotipo B sobre distintos huéspedes y a 25°C.

Huésped	Huevo	N1	N2	N3	N4	Huevo-Adulto
Berenjena	5,96±0,8a	1,99±0,3c	2,35±0,6b	1,92±0,5c	5,09±0,6b	17,31±0,7d
Tomate	6,21±0,6a	2,21±0,6bc	2,23±0,7b	2,23±0,6b	5,11±0,9b	17,96±1,3c
Batata	6,14±0,4a	2,39±0,7b	2,11±0,4b	2,36±0,8b	5,14±1,1b	18,14±1,3c
Pepino	6,37±0,7a	2,34±0,8b	2,43±0,7b	2,31±0,5b	5,89±0,6a	19,34±1,0b
Judía	6,0±0,7a	3,05±0,7a	3,1±0,7a	2,87±0,7a	5,92±0,9a	20,95±1,9a

Fuente: Tsai & Wang, 1996.

1.3.4. Métodos de control de *B. tabaci* en cultivos hortícolas

Un ejemplo de la necesidad de aplicar programas de GIP para controlar de forma eficaz a una especie plaga, es la mosca blanca *B. tabaci*.

Hasta hace poco tiempo, y debido al temor que suscitaba la transmisión de uno de los virus hortícolas de mayor importancia mundial, el Virus de la cuchara (TYLCV) en tomate, la mejor forma de controlar a este aleiródido era el uso de insecticidas. Este uso indiscriminado de plaguicidas indujo la aparición de resistencias en las poblaciones de esta plaga, dejando, por tanto, de ser eficaz el control químico (Brown, 1994; Oliveira *et al.*, 2001).

Hoy en día a pesar de que el uso de insecticidas sigue siendo necesario, se acude a un control integrado. Aun así el control de esta mosca blanca sigue siendo difícil, debido a su gran capacidad de reproducción, al gran número de huéspedes y a su facilidad para desarrollar resistencia a los plaguicidas (Cahill *et al.*, 1996; Pereira, 2003).

1.3.4.1. Control biológico de *B. tabaci* en cultivos hortícolas

El control biológico de la mosca blanca del tabaco en cultivos hortícolas se basa fundamentalmente en el uso de tres enemigos naturales, *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae), *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) y

Eretmocerus mundus Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) (van der Blom, 2007; Robledo *et al.*, 2009). Otros enemigos naturales usados son los parasitoides *Eretmocerus eremicus* Rose & Zolnerowich y *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae), capaces de parasitar también ninfas de la mosca blanca *T. vaporariorum*, y el chinche depredador *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) (Junta de Andalucía, 1994).

Nesidiocoris tenuis se suele usar en los cultivos de tomate y berenjena. Su introducción en el cultivo se debe hacer en las primeras semanas o al inicio de la floración, y en sitios donde el nivel de plaga sea alto, ya que si hay baja disponibilidad de presa, *N. tenuis* no se instala adecuadamente. Otro dato a tener en cuenta en la liberación de este enemigo natural, es que no tolera bien las bajas temperaturas y los días cortos, por ello cuando se libera en otoño-invierno no se instala de forma correcta hasta la llegada de la primavera (Robledo *et al.*, 2009).

Amblyseius swirskii se instala de forma rápida en todos los cultivos hortícolas, exceptuando el tomate, donde no es capaz de desarrollarse y establecerse. Si las sueltas de este fitoseido se realizan durante las primeras semanas del cultivo, cuando el tamaño de la planta no es lo suficientemente grande como para mantener las condiciones de humedad relativa necesarias para el desarrollo del ácaro, se aconseja mantener la humedad del invernadero por encima del 60% durante ese tiempo. Esta especie de ácaro se debe introducir en el cultivo de forma preventiva en cuanto la planta tenga un tamaño apropiado, al comienzo de la floración, o cuando la presa esté presente en el mismo (Robledo *et al.*, 2009).

Eretmocerus mundus se suele liberar en tomate, pimiento y berenjena, en cuanto se detecta la presencia de mosca blanca. Su instalación en el cultivo es lenta, notándose su efecto a los meses de su liberación (Robledo *et al.*, 2009). En la zona del Mediterráneo, esta especie de parasitoide endémica aparece de forma espontánea en el interior de los invernaderos, ayudando al control de *B. tabaci* (Téllez *et al.*, 2003; Urbaneja *et al.*, 2007).

1.3.4.2. Métodos físicos de control de *B. tabaci* en cultivos hortícolas

El uso de barreras físicas juega un papel cada vez más significativo en los programas de GIP.

En invernaderos, el control físico de la mosca blanca del tabaco se ha basado fundamentalmente en el uso de mallas anti-insectos, las cuales evitan su entrada al interior del cultivo, y más modernamente en el uso de plásticos y mallas fotoselectivos y mallas tratadas con insecticidas.

Las mallas y plásticos fotoselectivos bloquean parcialmente, en mayor o menor medida, la transmisión de luz UV, interfiriendo con la visión y la orientación de los insectos, y por tanto, con el movimiento de los mismos (Díaz & Fereres, 2007). Varios estudios han demostrado la efectividad de estas barreras en el control tanto de las poblaciones de *B. tabaci* como de los virus que éstas transmiten, pues los ambientes pobres en luz UV dificultan el vuelo de las moscas blancas y su dispersión, limitando por tanto la extensión del virus (Antignus *et al.*, 1998, 2000; Legarrea *et al.*, 2010).

A pesar de que existen estudios que afirman que el uso de barreras fotoselectivas es compatible con algunas especies de organismos de control biológico, como *Orius laevigatus* (Fieber) (Heteroptera: Anthocoridae), *Aphidius colemani* Viereck, *Aphidius ervi* Haliday, *Aphidius matricariae* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae), *Diglyphus isaea* Walker (Hymenoptera: Eulophidae) y *E. formosa* (Chyzik *et al.*, 2003; Chiel *et al.*, 2006; Doukas & Payne, 2007c; Legarrea *et al.*, 2012a, 2014), éstas pueden tener un efecto negativo en algunas especies como *E. mundus*, al interferir con su orientación, lo que ocasiona una disminución de la depredación y la parasitación de los insectos plaga (Chiel *et al.*, 2006).

Las mallas tratadas con insecticidas, cuyo uso estaba restringido hasta la fecha al ámbito de la entomología médica (Hougard *et al.*, 2002), se tratan de aplicar ahora a la agricultura. La efectividad de este tipo de mallas en control de *B. tabaci* viene determinada tanto por el tamaño de poro, como por el tipo de insecticida empleado (Dader *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2014). Actualmente hay disponibles dos tipos de

mallas tratadas con insecticidas: las más convencionales, que son pulverizadas o sumergidas en las soluciones insecticidas, y las más modernas, denominadas mallas insecticidas de larga duración (*Long Lasting Insecticidal Nets*: LLINs), las cuales llevan incorporado el tratamiento insecticida en el momento de su fabricación, lo que alarga notablemente su efecto al degradarse menos el insecticida con la luz (Martin *et al.*, 2007).

Hasta la fecha sólo Dader *et al.* (2014) han demostrado la compatibilidad de un enemigo natural, *A. colemani*, con una malla tratada con bifentrin, por ello es necesario realizar más ensayos que pongan de manifiesto la compatibilidad de esta técnica con el control biológico.

1.4. *Eretmocerus mundus* Mercet

1.4.1. Sistemática

La posición sistemática de esta especie de parasitoide que se cita a continuación, está basada en la clasificación de Fauna Europaea (2015b):

CLASE: Insecta
ORDEN: Hymenoptera
SUBORDEN: Apocrita
SUPERFAMILIA: Chalcidoidea
FAMILIA: Aphelinidae
SUBFAMILIA: Eretmocerinae
GÉNERO: *Eretmocerus* Haldeman, 1850
ESPECIE: *E. mundus* Mercet, 1931

1.4.2. Origen, distribución e importancia

Eretmocerus mundus es un himenóptero nativo de la región mediterránea, donde frecuentemente aparece de forma espontánea parasitando *B. tabaci* en cultivos hortícolas protegidos (Urbaneja *et al.*, 2007).

Como se puede observar en la **Figura 8**, en Europa esta especie de himenóptero se encuentra principalmente en Francia, España, Italia, Islas Británicas, República Checa, Alemania, Malta, República de Moldavia, Mónaco, Países Bajos y Ucrania (Fauna Europaea, 2015c).

Figura 8: Distribución geográfica de *E. mundus* en Europa

(Fuente: Fauna Europaea, 2015c).

La importancia de la especie *E. mundus* radica en su papel de parasitoide específico y muy eficaz de la especie de mosca blanca *B. tabaci* (Malais & Ravensberg, 2006; Urbaneja *et al.*, 2007).

A nivel mundial, *E. mundus* es una de las especies de parasitoides más utilizadas para el control de la mosca blanca del tabaco. Esta especie de afelínido es usada en programas de control biológico en Europa, África, Norteamérica, Suramérica y Asia (van Lenteren, 2012).

En España, hasta el año 2002, la única especie del género *Eretmocerus* disponible comercialmente y capaz de controlar eficazmente a *B. tabaci* era *E. eremicus* (Urbaneja *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el control biológico de *B. tabaci* llevado a cabo de forma natural por *E. mundus* es más eficaz que el llevado a cabo por la especie introducida *E. eremicus*, debido a la gran especificidad de *E. mundus* por esta especie de mosca blanca y por su capacidad de soportar altas temperaturas (Rodríguez *et al.*, 1994;

van der Blom, 2002; Urbaneja *et al.*, 2007; van Lenteren, 2012). Actualmente, a pesar de que *E. mundus* sigue disponible comercialmente en España, su uso ha disminuido significativamente debido al gran control que de esta plaga están realizando los depredadores *A. swirskii*, *N. tenuis* o *M. pygmaeus*.

Como ya se ha comentado anteriormente, *E. mundus* puede pasar al interior de los invernaderos de forma espontánea, a través de las aberturas de ventilación, y ejercer un control natural de la mosca blanca, ayudando a los enemigos naturales introducidos en el cultivo (Téllez *et al.*, 2003; Urbaneja *et al.*, 2007). Por ello, es de vital importancia el estudio de la compatibilidad de estos himenópteros con otras estrategias de control de plagas tales como el uso de insecticidas y barreras físicas, con la finalidad de favorecer su conservación.

1.4.3. Ciclo de vida y descripción de los estados de desarrollo

Eretmocerus mundus desarrolla su ciclo en dos fases: una ectoparásita (debido a que la longitud del ovipositor no es suficiente para poder atravesar la cutícula de las ninfas huéspedes) y otra endoparásita (Urbaneja *et al.*, 2007). Pasa por un estado de huevo, 3 estadios larvarios, una fase pupa y adulto (Malais & Ravensberg, 2006).

Esta especie de himenóptero posee una reproducción partenogenética facultativa arrenotoca. Las hembras ovipositan bajo las ninfas de mosca blanca (preferiblemente ninfas N2 ó N3, aunque son capaces de parasitar cualquier estadio ninfal) (**Figura 9**) (Téllez *et al.*, 2003).

Figura 9: Ninfa N2 de *B. tabaci* despegada de la hoja, bajo ella un huevo de *E. mundus*.

Tras la eclosión del huevo, para poder alimentarse, el primer estadio larvario de *E. mundus* penetra en el interior de la ninfa de *B. tabaci* a través de la zona ventral de la

misma (Téllez *et al.*, 2003). La fase endoparásita de este himenóptero comprende los 3 estadios larvarios y el estado de pupa (Urbaneja *et al.*, 2007).

Uno de los signos de parasitación de una ninfa de *B. tabaci* por parte del parasitoide *E. mundus* es el desplazamiento de los micetomas de la mosca blanca. Dicho desplazamiento ocurre a los 7-9 días de la parasitación y se produce del centro de la ninfa a los laterales de la misma (**Figura 10**) (Urbaneja *et al.*, 2007).

Figura 10: Ninfa de *B. tabaci* parasitada por *E. mundus* (micetomas desplazados)

(Fuente: Téllez *et al.*, 2006).

Al comienzo del estado de pupa, los ojos aparecen formados y de una coloración rojiza, también se pueden apreciar las extremidades y la cabeza (**Figura 11**). Al final del estado de pupa, los ojos van adquiriendo una tonalidad negra verdosa y se puede apreciar totalmente formado al insecto (**Figura 12**) (González-Zamora, 1997).

Figura 11: Pupa de *E. mundus* al comienzo de dicho estado.

Figura 12: Pupa de *E. mundus* al final de dicho estado.

Una vez finalizado el periodo de pupación, el adulto emerge a través de un orificio circular que hace en la zona dorsal de su huésped (**Figura 13**).

Figura 13: Exuvia de *E. mundus*

(Fuente: Téllez *et al.*, 2006).

Los adultos son de color amarillo marrón, siendo los machos de coloración más oscura que las hembras (**Figura 14**). Los machos de *E. mundus* se diferencian de las hembras por su genitalia y por la coloración y forma de las antenas, siendo las de las hembras de color claro y las de los machos de color negro (**Figura 15**) (Koppert Biological Systems, 2015a).

Figura 14: Adulto de *E. mundus*.

Figura 15: Detalle de las antenas de *E. mundus* en ambos sexos. Foto al microscopio óptico.

Las hembras de esta especie de himenóptero, también usan el ovipositor para atravesar el orificio vasiforme de las ninfas de *B. tabaci* y así obtener de ellas la hemolinfa necesaria para alimentarse (Gerling & Fried, 2000; Urbaneja *et al.*, 2007).

Aparte de la mortalidad producida por el parasitismo en sí y por las picaduras alimenticias, *E. mundus* también mata a las ninfas de mosca blanca mediante la mutilación de las mismas (inserciones del ovipositor que no van seguidas de una puesta o de una picadura alimenticia) (Gerling & Fried, 2000).

La duración del desarrollo de los estados inmaduros de *E. mundus* está determinada por la temperatura, el estadio ninfal de *B. tabaci* al que parasitan y el cultivo. El desarrollo de huevo a adulto dura de 2 a 3 semanas, pero bajo condiciones subóptimas, puede llegar a durar hasta un mes (Malais & Ravensberg, 2006).

Urbaneja & Stansly (2004) demostraron que el mayor tiempo de desarrollo de este afelínido se produce cuando parasitan ninfas N1 de *B. tabaci* y el menor, cuando parasitan ninfas N2 y N3.

Urbaneja y colaboradores (2007) definieron el tiempo de duración de cada estado de desarrollo de *E. mundus*, así como la longevidad, los parámetros reproductivos y el *host feeding* (número de ninfas de mosca blanca destinadas a su alimentación), en función del sexo del parasitoide y de la especie de planta huésped de *B. tabaci* (**Tablas 8 y 9**).

Tabla 8: Tiempo de desarrollo (días) de los estados inmaduros de *E. mundus* en tomate y pimiento a 25 °C.

Sexo	Estados de desarrollo	Tomate	Pimiento
Macho	Huevo - Pupa	10,93 ± 0,18b	10,95 ± 0,19b
	Pupa - Adulto	5,5 ± 0,13b	5 ± 0,1b
	Huevo - Adulto	16,3 ± 0,19b	15,97 ± 0,21b
Hembra	Huevo - Pupa	11,23 ± 0,2a	11,33 ± 0,46a
	Pupa - Adulto	6 ± 0,31a	5,77 ± 0,15a
	Huevo - Adulto	17,27 ± 0,28a	17,11 ± 0,32a

Fuente: Urbaneja *et al.*, 2007.

Tabla 9: Longevidad, parámetros reproductivos y *host feeding* de *E. mundus* en tomate y pimiento infestados con ninfas N2 de *B. tabaci*.

Parámetros evaluados	Tomate	Pimiento
Longevidad hembras (días)	8,5 ± 0,9a	10,5 ± 0,9a
Oviposición (días)	8,1 ± 0,9a	10 ± 1,0a
Post-oviposición (días)	0,4 ± 0,1a	0,4 ± 0,2a
Fecundidad (huevos viables / hembra)	147,8 ± 12,6a	171,1 ± 21,5a
Tasa de oviposición (huevos / día y hembra)	19 ± 1,5a	17 ± 1,0a
Ninfas que sirven de alimento / día	1,5 ± 0,1a	1,5 ± 0,1a

Fuente: Urbaneja *et al.*, 2007.

1.5. *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot

1.5.1. Sistemática

La posición sistemática de esta especie de ácaro depredador que se cita a continuación, está basada en la clasificación de Fauna Europaea (2015d):

CLASE: Arachnida

SUBCLASE: Micrura

INFRACLASE: Acari

SUPERORDEN: Anactinotrichida

ORDEN: Mesostigmata

SUBORDEN: Dermanyssina

SUPERFAMILIA: Ascoidea

FAMILIA: Phytoseiidae

GÉNERO: *Amblyseius* Berlese, 1904

ESPECIE: *A. swirskii* Athias-Henriot, 1962

1.5.2. Origen, distribución e importancia

Amblyseius swirskii es un ácaro depredador que aparece distribuido por la zona oriental del Mediterráneo, de donde es originario y donde aparece de forma espontánea en cultivos hortícolas, frutales, algodón, cítricos y flora silvestre. En las zonas del litoral de Israel es el ácaro depredador predominante en cítricos (Malais & Ravensberg, 2006; Ferragut *et al.*, 2010)

La importancia de la especie *A. swirskii* radica en su papel de depredador polífago capaz de alimentarse de un gran número de especies plaga. Principalmente se alimenta de larvas de trips y de huevos y ninfas de primeros estadios de moscas blancas, y en menor medida de arañas blancas y amarillas. En cultivos como berenjena, pimiento y gerbera, *A. swirskii* puede sobrevivir con polen como fuente de alimento (McMurtry & Croft, 1997; Malais & Ravensberg, 2006; Ferragut *et al.*, 2010; Lee & Gillespie, 2011; Calvo *et al.*, 2015).

A nivel mundial, *A. swirskii* es una de las especies de ácaros depredadores más utilizadas al conferir un control eficaz de moscas blancas y trips. Esta especie de fitoseido es usada en programas de control biológico en Europa, África, Norteamérica, Suramérica y Asia (van Lenteren, 2012).

En España, este ácaro comenzó a estar disponible comercialmente en el año 2005 (van der Blom, 2007; Calvo *et al.*, 2015). En la época del auge del control biológico en España, en cultivos de pimiento, *B. tabaci* era controlada principalmente por el parasitoide *E. mundus* y *F. occidentalis* por el chinche depredador *O. laevigatus*. Sin embargo, en ciertas zonas o épocas del año, la presión de plagas es mayor y estos enemigos naturales no son capaces de controlar completamente a dichas plagas. Todo esto propició la búsqueda de nuevos agentes de control como *A. swirskii* (Belda & Calvo, 2006).

Actualmente *A. swirskii* se usa en programas de control biológico de trips y moscas blancas en cultivos de pimiento, berenjena, pepino, judía, calabacín, melón y sandía durante todo el año (ya que no entra en diapausa y tolera temperaturas altas) (Robledo *et al.*, 2009; Koppert Biological Systems, 2015b). Debido a su gran eficacia como agente de control de plagas, y al igual que en el caso de *E. mundus*, es de vital importancia el estudio de la compatibilidad del mismo con otras estrategias de control usadas en la GIP.

1.5.3. Ciclo de vida y descripción de los estados de desarrollo

El ciclo biológico de *A. swirskii* comprende cinco estados: huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto (**Figura 16**) (Malais & Ravensberg, 2006; Robledo *et al.*, 2009).

Figura 16: Ciclo de vida de *A. swirskii*

(Fuente: Koppert Biological Systems, 2015).

Los huevos son de forma oval y presentan coloración lechosa (**Figura 17**).

Figura 17: Huevos de *A. swirskii*.

Tras la eclosión del huevo, aparece el estado de larva, de color blanco casi transparente y que se caracteriza por la presencia de 3 pares de patas (**Figura 18**). Los

estados de protoninfa y deutoninfa por los que pasa el ácaro hasta convertirse en adulto, se caracterizan por ser de mayor tamaño que la larva y por tener 4 pares de patas. Ambos estadios ninfales se diferencian en el tamaño y en la coloración, siendo la deutoninfa más oscura y de mayor tamaño que la protoninfa (Malais & Ravensberg, 2006; Robledo *et al.*, 2009).

Figura 18: Larva de *A. swirskii*.

Los adultos son de color marrón claro a rojizo (**Figura 19**).

Figura 19: Adultos de *A. swirskii*

(Fuente: Koppert Biological Systems, 2015).

Las hembras de *A. swirskii* se diferencian de los machos por su genitalia, por el tamaño (siendo las hembras de mayor tamaño que los machos) y por la presencia de espermatecas, las cuáles, junto con las setas y las placas ventrales y dorsal, sirven para la identificación de la especie (**Figura 20**) (Malais & Ravensberg, 2006; Ferragut *et al.*, 2010).

Figura 20: Detalle de las espermatecas de una hembra de *A. swirskii* y de la placa ventroanal, al microscopio óptico.

La duración del desarrollo de *A. swirskii* está determinada por el tipo y cantidad de alimento disponible, por la temperatura y por la humedad relativa.

Como se puede observar en la **Tabla 10**, *A. swirskii* es capaz de completar su desarrollo alimentándose de varios tipos de presas y de polen. En general, esta especie de ácaro completa su ciclo de huevo a adulto en 5-6 días a una temperatura de unos 26-27°C.

La escasez de alimento también influye en el desarrollo del ácaro. Elsawi & Abou-Awad (1992) observaron que cuando *A. swirskii* era alimentado durante los estados inmaduros con dos protoninfas de *T. urticae*, el tiempo de desarrollo de huevo a adulto, a 25-27°C y 70-80% HR, aumentaba hasta los $9,26 \pm 0,16$ días.

Lee & Gillespie (2011) demostraron que la duración del desarrollo de este fitosiedo de huevo a adulto cuando se alimentaba de polen de la especie *Typha latifolia* L., disminuía de 23,5 a 5,5 días, conforme la temperatura iba aumentando de 15 a 34°C, a partir de los cuales el tiempo de desarrollo volvía a aumentar. Sin embargo, la longevidad de los adultos disminuía con el aumento de la temperatura. Estos autores también definieron la temperatura máxima (37,37 °C), mínima (8,07 °C) y óptima (32,3 °C) de desarrollo.

La humedad relativa también es un factor condicionante en el desarrollo, debido a que afecta a la eclosión de los huevos. Bolckmans *et al.* (2005) comprobaron que a humedades relativas comprendidas entre el 69 y el 50,5%, la eclosión de los huevos de

A. swirskii se reducía a un 45% y 3%, respectivamente. Para que el porcentaje de eclosión sea mayor del 84%, la humedad debe ser superior al 75%.

Tabla 10: Tiempo de desarrollo (días) de huevo a adulto del ácaro depredador *A. swirskii* en función de su alimentación.

Tipo de alimentación	Condiciones ambientales	Sexo	Tiempo de desarrollo				
			Huevo	Larva	Protoninfa	Deutoninfa	Huevo-Adulto
<i>T. urticae</i>	26 °C - 70% HR	♀	1,84±0,39	0,9±0,1	1,37±0,31	1,56±0,38	5,5±0,5
		♂	1,37±0,29	0,75±0,17	1,87±0,52	1,37±0,34	5,18±0,56
<i>T. urticae</i>	27°C- 70-80% HR	♀ y ♂	2,59±0,11	1,0±0,0	1,32±0,1	1,45±0,11	6,36±0,10
<i>Eriophyes dioscoridis</i> Soliman & Abou-Awad	27°C- 70-80% HR	♀ y ♂	2,04±0,04	1,0±0,0	1,39±0,09	1,25±0,08	5,71±0,12
Polen <i>Ricinus communis</i> L.	27°C- 70-80% HR	♀ y ♂	2,73±0,09	1,0±0,0	2,0±0,09	2,0±0,08	7,73±0,16
<i>A. lycopersici</i>	25 °C - 70% HR	♀	1,87±0,06	0,67±0,0	1,23±0,07	1,18±0,08	4,97±0,07
		♂	1,92±0,07	0,78±0,07	1,5±0,17	0,83±0,17	5,03±0,06
Polen <i>Typha latifolia</i> (L.) Dulac	25 °C - 70% HR	♀	1,84±0,06	0,73±0,03	1,74±0,11	1,85±0,09	6,16±0,14
		♂	2,04±0,04	0,67±0,0	1,27±0,12	1,59±0,1	5,56±0,12

Fuente: El-Laithy & Fouly, 1992; Momen & El-Saway, 1993; Park *et al.*, 2010.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

Los programas de GIP promueven el uso de estrategias de control que sean respetuosas con el medio ambiente. Sin embargo el uso de insecticidas en los cultivos hortícolas sigue siendo necesario para el control de determinadas plagas, como es el caso de la mosca blanca *B. tabaci*. Por ello, el objetivo de este trabajo es el estudio de la integración de las tres estrategias de control más empleadas hoy en día para el control de *B. tabaci*: el control biológico, el físico y el químico.

Nuestra investigación se centró en dos importantes enemigos de la mosca blanca del tabaco, *E. mundus* y *A. swirskii*, y para llevar a cabo este estudio se fijaron los siguientes objetivos concretos:

- Estudio de la toxicidad de 11 insecticidas (abamectina, deltametrina, emamectina, flubendiamida, flonicamida, metaflumizona, metoxifenocida, spinosad, sulfoxaflor, spirotetramat y spiromesifen), empleados para el control de plagas en cultivos hortícolas, sobre *E. mundus* y *A. swirskii*.
- Estudio de los efectos directos (capacidad de visión, orientación y vuelo) de mallas y plásticos fotoselectivos sobre *E. mundus*.
- Estudio de la combinación de efectos directos e indirectos (mediados por planta y plaga), de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre *E. mundus*.
- Estudio de compatibilidad de una malla tratada con bifentrin, en condiciones de laboratorio, semicampo y campo, con las dos especies de enemigos naturales.
- Estudio de la composición de la microflora bacteriana de tres especies de parasitoides, *E. mundus*, *E. eremicus* y *E. formosa*, y su papel en la susceptibilidad a los insecticidas.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Todos los ensayos descritos en el presente trabajo, salvo los basados en técnicas moleculares y el realizado en campo, se llevaron a cabo en las distintas instalaciones de la Unidad de Protección de Cultivos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (E.T.S.I.A), perteneciente a la Universidad Politécnica de Madrid. Los ensayos destinados a la evaluación de la influencia de la microflora bacteriana de *E. mundus*, *E. eremicus* y *E. formosa* en su susceptibilidad a insecticidas, se realizaron en el Laboratorio de Agrozoología de la Facultad *Biosciences Engineering* de la Universidad de Gante. El estudio en campo de la compatibilidad de una malla tratada con el insecticida bifentrin con *A. swirskii*, se llevó a cabo en invernaderos comerciales situados en El Ejido (Almería, España).

En el presente capítulo se describen los materiales y métodos generales aplicados en los distintos ensayos de esta tesis. Los puntos a tratar se describen a continuación:

- Descripción de los lugares de estudio y condiciones ambientales en ensayos y en la cría de insectos.
- Cría y manejo de insectos plaga y enemigos naturales.
- Material vegetal.
- Análisis estadísticos.

3.1. Descripción de los lugares de estudio y condiciones ambientales en ensayos y en la cría de insectos

3.1.1. Ensayos de laboratorio y cría de insectos

Para la realización de los ensayos de laboratorio y para la cría de los insectos se usaron dos tipos de cámaras climáticas, una visitable (insectario) y una cámara SANYO MLR-350.

3.1.1.1. Insectario

Los ensayos de evaluación de la toxicidad de insecticidas sobre el estado de desarrollo más protegido de *E. mundus* y sobre el estado adulto de esta especie de parasitoide y del ácaro depredador *A. swirskii* (Capítulo 4, apartados 4.3.2.2.1. y 4.3.2.3), así como los ensayos en laboratorio con mallas tratadas con bifentrin (Capítulo 6, apartado 6.3.3.), se llevaron a cabo en una cámara climática visitable.

Dicha cámara, de dimensiones 2 m de ancho, 4,25 m de largo y 2,5 m de alto, consta de un equipo de ventilación-bomba de calor (marca Interclisa®, modelo CUCV026M3-CXE026M3) regulado por un termostato (marca Sunvic®), con lo que se logra el mantenimiento de la temperatura adecuada y la renovación y el movimiento del aire.

El nivel de humedad se regula mediante un higróstato conectado a un humidificador (marca Defensor®, modelo 505). La temperatura y la humedad se monitorizan con un termohigrógrafo (marca Salmoiraghi®, modelo 1750) y un termohigrómetro digital con memoria de máximas y mínimas.

En cuanto a la iluminación, es proporcionada por dos tubos fluorescentes (Gro-Lux®) por cada estante, situados a 20 cm de altura y que proporcionan una luminancia total de 2500 luxes. La regulación del fotoperiodo se consigue mediante un reloj conmutador (marca Orbis®), que permite la automatización del encendido y apagado.

Las condiciones del insectario en las que se llevaron a cabo este tipo de ensayos fueron las siguientes:

- Temperatura: 25 ± 2 °C
- Humedad relativa: 75 ± 5 %
- Fotoperiodo: 16L:8O h

3.1.1.2. Cámara climática SANYO MLR-350

Los ensayos de evaluación de la toxicidad de insecticidas sobre el estado más protegido de *A. swirskii* (Capítulo 4, apartado 4.3.2.2.2.), el estudio de los efectos subletales (fertilidad y fecundidad) de los mismos en dicha especie de ácaro (Capítulo 4,

apartados 4.3.2.3. y 4.3.3), así como las crías de *B. tabaci* y *A. swirskii*, se llevaron a cabo en una cámara SANYO.

Esta cámara posee unas dimensiones de 45 cm de ancho, 50 cm de largo y 130 cm de altura. Dispone de un panel de control que permite programar el fotoperiodo y la temperatura deseada. La humedad relativa se controla mediante la introducción de recipientes con agua y se monitoriza con un termohigrógrafo digital. La iluminación dentro de la cámara es proporcionada por 12 fluorescentes (marca Mitsubishi/Osram FL40SS-W/37) repartidos por los laterales y la puerta de la misma.

La cría y los ensayos con *A. swirskii* se llevaron a cabo en el interior de dicha cámara debido a la necesidad de mantener la humedad relativa por encima del 75%, ya que, como se ha citado anteriormente, humedades inferiores a ese rango, provocan la desecación de los huevos y la no eclosión de los mismos.

Para la cría de *B. tabaci* se tuvieron en cuenta las condiciones óptimas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo que permitiesen el correcto desarrollo y reproducción máxima de esta especie de mosca blanca.

Las condiciones ambientales bajo las cuales se realizaron dichas tareas fueron las siguientes:

- Temperatura: 25 °C
- Humedad relativa para la cría y ensayos con *A. swirskii*: 75-85 %
- Humedad relativa para la cría de *B. tabaci*: 60-70 %
- Fotoperiodo: 16L:8O h

3.1.2. Ensayos en los Campos de Prácticas de la E.T.S.I. Agrónomos

En los Campos de Prácticas se utilizaron dos ubicaciones distintas para realizar los ensayos, los invernaderos y la Senda Botánica.

En los invernaderos se realizaron los estudios de la combinación de efectos directos e indirectos de ambientes pobres en luz UV sobre *E. mundus* (Capítulo 5, apartado

5.3.2.), el ensayo de compatibilidad de una malla tratada con bifentrin, en condiciones de semicampo, con *E. mundus* (Capítulo 6, apartado 6.3.4.) y el envejecimiento de los residuos insecticidas sobre planta, empleados en los ensayos de persistencia (Capítulo 4, apartado 4.3.3.).

Los invernaderos, de estructura de cristal, poseen un sistema de refrigeración, ventilación e iluminación y están dotados de un programador de riego por goteo. Todas estas características están destinadas a una mayor confortabilidad y seguridad de las plantas.

En la Senda Botánica se llevó a cabo, al aire libre, el ensayo de evaluación de los efectos directos de mallas y plásticos fotoselectivos sobre *E. mundus* (Capítulo 5, apartado 5.3.1.).

Durante la duración de todos los ensayos, la temperatura y la humedad fueron monitorizadas gracias al uso de registradores (Tinytag® Ultra-Gemini Data Logger GLM). De igual forma, las radiaciones UV y PAR (radiación fotosintéticamente activa) fueron registradas mediante el uso de distintos radiómetros, según se describe en cada capítulo.

3.2. Cría y manejo de insectos plaga y enemigos naturales

3.2.1. *Bemisia tabaci*

La cría de *B. tabaci* Biotipo Q fue iniciada en el Instituto de Ciencias Agrarias (ICA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Madrid.

Para la cría se emplearon cajas de metacrilato, de dimensiones 40 cm de ancho, 35 cm de largo y 40 cm de altura, provistas de una tapa forrada con visillo que permitía una correcta ventilación. Dichas cajas poseían en un lateral, un gran orificio central provisto de una manga de visillo, para la introducción de plantas y especímenes adultos (**Figura 21**).

Figura 21: Disposición de las jaulas de cría de *B. tabaci* en el interior de la cámara climática SANYO.

La cría de mosca blanca se llevó a cabo sobre la especie vegetal *Cucumis melo* L. (melón). Esta especie de planta huésped se seleccionó para la cría de la plaga, en base al buen desarrollo de la misma bajo las condiciones de la cámara SANYO.

En cada jaulón se introducían dos plantas de melón (escala BBCH 15: 5^a hoja verdadera del tallo principal desplegada) y 500 moscas blancas. Cuando se comenzaba a observar la aparición de negrilla en las plantas huéspedes, producida por el aumento de la densidad de población de *B. tabaci*, aproximadamente al mes y medio de iniciar la cría, se limpiaba el jaulón y se repetía todo el proceso descrito.

Bajo las condiciones ambientales de la Unidad de Protección de Cultivos, en la cámara SANYO (Capítulo 3, apartado 3.1.1.2.), el ciclo biológico de *B. tabaci* tenía una duración de entre 4 y 5 semanas.

3.2.2. *Eretmocerus mundus*

Esta especie de himenóptero fue suministrada por la casa comercial Agrobio (ERMUNcontrol®, La Mojonera, España), en botes de 100 ml (5.000 pupas mezcladas con serrín).

El día de su recepción, las pupas se separaban en placas Petri® de cristal (10 cm de diámetro y 1,5 cm de altura), en grupos de 100. Dichas placas se mantenían a 8°C en

oscuridad hasta ser usadas en los ensayos o hasta el momento de la obtención de los adultos.

Para la emergencia de los adultos, las placas eran provistas de alimento (gotas de miel aplicadas en la tapa superior de la placa Petri®) e introducidas en el insectario bajo las condiciones descritas anteriormente.

3.2.3. *Amblyseius swirskii*

La cría de *A. swirskii*, se inició a partir de un bote de Swirski-Mite® [bote de 500 ml con 50.000 ninfas y ácaros mezclados con salvado y con el ácaro presa *Carpoglyphus lactis* (L.) (Acari: Carpoglyphidae)] suministrado por la casa comercial Koppert Biological Systems (La Mojonera, España).

El método de cría se basó en el descrito por Rodríguez-Reina y colaboradores (1992). Cada unidad de cría consistía en una bandeja de plástico en la se colocaba el sustrato sobre una capa de algodón saturada de agua, que actuaba como barrera e impedía la huida de los ácaros. Dicho sustrato consistía en un cartón parafinado cubierto con dos discos de papel de filtro negro sobre el cual se disponían los ácaros (**Figura 22**).

Figura 22: Detalle de las unidades de cría de *A. swirskii*.

La alimentación de *A. swirskii* se basaba en los distintos estados de desarrollo de *C. lactis*, criado a su vez sobre polen comercial (polen de mil flores).

Bajo las condiciones de cría de la Unidad de Protección de cultivos, en la cámara SANYO (Capítulo 3, apartado 3.1.1.2.), *A. swirskii* completaba su ciclo de huevo a adulto en 7-9 días. La duración de cada estado de desarrollo de esta especie de fitoseido, se resume en la **Tabla 11**.

Tabla 11: Tiempo de desarrollo (días) de los estados inmaduros de *A. swirskii* bajo las condiciones de cría de la Unidad de Protección de Cultivos [25°C, 75-85% HR, 16:8 h (L:O)].

Estados de desarrollo	Tiempo de desarrollo (días)
Huevo - Larva	2 - 3
Larva - Ninfas (Protoninfa y Deutoninfa)	1 - 2
Ninfas - Adultos	4 - 5

3.3. Material vegetal

Como se ha comentado en la introducción, *A. swirskii* se instala de forma rápida en todos los cultivos hortícolas, exceptuando el tomate, donde no es capaz de desarrollarse e instalarse. Por ello, los ensayos realizados con esta especie de ácaro depredador se llevaron a cabo sobre pimiento.

Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad Marmande (Batlle S.A., Molins de Rei, España), se emplearon con el enemigo natural *E. mundus* en los ensayos de combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV (Capítulo 5, apartado 5.3.2.), de toxicidad de una malla tratada con bifentrin, en condiciones de semicampo (Capítulo 6, apartado 6.3.4.) y persistencia (Capítulo 4, apartado 4.3.3.).

En el ensayo de persistencia con el ácaro *A. swirskii* (Capítulo 4, apartado 4.3.3.), se emplearon plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) de la variedad California Wonder (CMI, Courtaboeuf Cedex, Francia).

Como sustrato para el crecimiento de las plantas se usó una mezcla de tierra (Projar, Valencia, España) y vermiculita Termita® (Aminco, Donostia, España) en proporción 1:1.

Previamente al trasplante de las plántulas, las semillas germinaron en una cámara SANYO a una temperatura de $25 \pm 5^\circ \text{C}$ y una humedad relativa del $75 \pm 5 \%$. Tras el trasplante, las plantas siguieron su desarrollo bajo las condiciones de los invernaderos de la E.T.S.I.A.

3.4. Análisis estadísticos

Para la interpretación de los resultados obtenidos en el presente trabajo, salvo los obtenidos en el ensayo de campo del capítulo 6, se utilizó la aplicación informática Statgraphics® Plus Versión 5.1 (STSC, 1987). Los datos generados en dicho ensayo de campo, se analizaron usando el programa estadístico IBM SPSS Statistics® Versión 9.

Los resultados de los Capítulos 4, 5 y 7 se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), mientras que, los del Capítulo 6 (apartados 6.3.3. y 6.3.4.), se analizaron mediante el test de la t de Student (Martínez-González *et al.*, 2001). Para el análisis de los ensayos de campo (apartado 6.3.5.) se aplicó un modelo de efectos mixtos lineales (LMM) (Littell *et al.*, 1998).

3.4.1. ANOVA

El requisito indispensable para poder realizar el análisis de varianza ANOVA es la verificación de dos hipótesis: la hipótesis de normalidad (los datos deben seguir una distribución normal: Test de Kolmogorov-Smirnoff, $P \geq 0,05$) y la de homocedasticidad (las varianzas deben ser homogéneas: Test de Barlett, $P \geq 0,05$).

Una vez comprobada la validez del test F (análisis de varianza), y en el caso de que el análisis de varianza resultase significativo ($P < 0,05$), se aplicó el test de las mínimas diferencias significativas (LSD). Este test separa las medias de los datos en grupos homogéneos para facilitar la comparación entre los distintos tratamientos.

En el caso de que alguna de las hipótesis de partida no se cumpliera, los datos se transformaron usando las fórmulas $y = \arcsen \sqrt{(x/100)}$, para porcentajes, e $y = \log(x+1)$, para el resto de casos. Si tras la transformación de los datos, alguna de las premisas iniciales seguía sin cumplirse, se recurrió al test no paramétrico Kruskal-Wallis.

3.4.2. t-Student

Al igual que en el análisis de varianza, para poder aplicar el *t*-test se deben cumplir las condiciones de normalidad y homocedasticidad.

Para comprobar si la variable cuantitativa sigue una distribución normal, se deben cumplir, a su vez, 3 requisitos:

- La curtosis (analiza el grado de concentración de los datos alrededor de la media) debe ser menor, en valor absoluto, que dos veces su error estándar.
- La asimetría debe ser menor, en valor absoluto, que dos veces su error estándar.
- El valor máximo y el mínimo de la variable cuantitativa debe quedar dentro del intervalo definido por 3 desviaciones estándar por encima y por debajo de la media.

Una vez comprobada las hipótesis de normalidad, se debe comprobar la homocedasticidad, es decir, se debe cumplir que las varianzas de ambos grupos sean iguales u homogéneas. Para ello, se recurrió a la prueba F de Snedecor.

En el caso de que alguna de las hipótesis de partida no se cumpliera, se recurrió al test no paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon.

3.4.3. Modelo de efectos mixtos lineales (LMM)

El LMM, una alternativa al ANOVA de medidas repetidas, es un análisis que tiene en cuenta tanto la variabilidad de las variables fijas y aleatorias, como los datos nulos en los muestreos y la variabilidad del tiempo. Otra ventaja del LMM es que no precisa que los datos sean homogéneos.

En el análisis de los datos del ensayo de campo se consideraron como variables dependientes (analizadas cada una de forma individual) el número de trips, moscas blancas y ácaros por hoja. Para aplicar el LMM fue necesario hacer un cambio de variable $\log(x + 1)$ con el objetivo de normalizar los datos. Las otras variables consideradas en el análisis fueron:

- Variables fijas: distancia a la malla (0, 4 ó 12 metros) y tipo de malla (control o tratada con bifentrin).
- Variable aleatoria: bandas de muestreo (Oeste, Sur o Este).
- Variable repetida: fechas de los muestreos.

El LMM trabaja con distintas estructuras de covarianza. La mejor estructura de covarianza para el factor de medidas repetidas, fue seleccionada de acuerdo con el valor de Akaike (AIC) más bajo. Se trabajó con un nivel de significación del 5% ($P < 0,05$).

CAPÍTULO 4: COMPATIBILIDAD DE MODERNOS INSECTICIDAS CON *ERETMOCERUS MUNDUS* Y *AMBLYSEIUS SWIRSKII*^{1,2,3}

4.1. Introducción

Como se ha mencionado en la introducción, debido a la problemática que genera la transmisión de virus por parte de *B. tabaci*, es frecuente basar el control de esta plaga en el uso conjunto de enemigos naturales e insecticidas.

A pesar de que los modernos insecticidas causan generalmente un menor impacto en organismos beneficiosos que los insecticidas convencionales, es esencial realizar estudios ecotoxicológicos para evaluar la compatibilidad de los mismos con los enemigos naturales. Dichos estudios deben realizarse caso por caso, ya que especies próximas de insectos pueden tener un comportamiento totalmente distinto frente a un mismo insecticida (Naranjo, 2001; Sugiyama *et al.*, 2011), siendo imposible predecir a priori los resultados. En estos estudios, además de la especie de insecto, también hay que tener en cuenta el estado de desarrollo usado porque, a veces, los insecticidas pueden ser tóxicos para el estado más expuesto del insecto y, a su vez, compatibles con el menos expuesto (Jacas & Viñuela, 1994; Medina *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2004).

Sterk *et al.* (1999) definen en su trabajo los estados de desarrollo más y menos susceptibles a insecticidas, siendo los adultos de los parasitoides, los estados juveniles

---

¹FERNÁNDEZ, M^a. M., AMOR, F., BENGOCHEA, P., VELÁZQUEZ, E., MEDINA, P., FERERES, A. & VIÑUELA, E. 2012. Effects of the insecticides methoxyfenozide and abamectin to adults of the natural enemies *Eretmocerus mundus* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae), *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) and *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae) under laboratory conditions. *IOBC/wprs Bulletin*, 82, 1-7.

²MARÍA DEL MAR FERNÁNDEZ, PILAR MEDINA, ALBERTO FERERES, GUY SMAGGHE & ELISA VIÑUELA. 2015. Are mummies and adults of *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae) compatible with modern insecticides? *Journal of Economic Entomology*, 108(5): 2268-2277.

³Effects of pesticides commonly used on horticultural crops on the predatory mite *Amblyseius swirskii*. *En redacción*.

de los ácaros y las larvas de los insectos depredadores, los considerados más susceptibles y las momias de los parasitoides y los adultos de ácaros/insectos depredadores, los considerados menos susceptibles. A pesar de esta clasificación, en algunas especies de ácaros e insectos depredadores, se puede considerar como estado más protegido a los huevos y/o a las pupas, los cuales pueden estar formados por distintas capas que los hacen impermeables a la penetración de los insecticidas (Medina *et al.*, 2003).

Para evaluar la toxicidad real de un insecticida se deben analizar tanto los efectos letales como los subletales producidos por el mismo, ya que en algunas ocasiones un insecticida que no produce mortalidad directa puede causar efectos subletales, tales como reducción de los parámetros reproductivos, esperanza de vida o comportamiento de los insectos (Schneider *et al.*, 2003; Desneux *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2012).

4.2. Objetivos

El objetivo del trabajo es aportar datos sobre los efectos letales y subletales producidos por modernos insecticidas sobre diferentes estados de desarrollo de *E. mundus* y *A. swirskii*, llevándose a cabo para ello ensayos de laboratorio y estudios de persistencia (laboratorio extendido).

En la **Tabla 12** se resumen los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo, así como los parámetros evaluados en cada uno de ellos.

Tabla 12: Resumen de los ensayos llevados a cabo en *E. mundus* y *A. swirskii* con los productos fitosanitarios y parámetros evaluados para determinar sus efectos nocivos.

Ensayo	Tipo de ensayo según OILB	Estado desarrollo	Parámetros evaluados
Tratamiento directo del estado más protegido del insecto	Laboratorio	Pupas <i>E. mundus</i>	Emergencia adultos
			Mortalidad a las 72 horas de la emergencia
			Parasitación
		Huevo <i>A. swirskii</i>	Eclosión
			Mortalidad en los estadios inmaduros
			Fecundidad
			Fertilidad
Contacto residual sobre sustrato inerte (placas de cristal)	Laboratorio	Adulto <i>E. mundus</i>	Mortalidad tras 72 horas de contacto con los residuos
			Parasitación
		Adulto <i>A. swirskii</i>	Mortalidad tras 72 horas de contacto con los residuos
			Fecundidad
			Fertilidad
			Incremento de la mortalidad a los 7 días del fin de la exposición a insecticidas
Persistencia	Laboratorio extendido	Adulto <i>E. mundus</i>	Mortalidad (72 h) y parasitación
		Adulto <i>A. swirskii</i>	Mortalidad (72 h), fecundidad y fertilidad

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Insecticidas evaluados

Las principales características de los insecticidas evaluados en este trabajo se resumen en la **Tabla 13**. Estos compuestos fueron seleccionados por poseer distintos modos de acción, ser más selectivos para los enemigos naturales que los neurotóxicos clásicos, tener buenos perfiles medioambientales y usarse frecuentemente en cultivos hortícolas para hacer frente a las distintas plagas que afectan a los mismos.

Todos los insecticidas, están incluidos en el anexo I de la Directiva Europea 91/414/CEE referente a las sustancias activas permitidas para su uso agrícola dentro del marco europeo (MAGRAMA, 2015c). El sulfoxaflor ha sido recientemente incluido en dicho anexo I (DOUE, 2015), aunque su uso estaba permitido en EE.UU. desde mayo del 2013 (EPA, 2013).

Además, siete de los insecticidas evaluados han sido clasificados por la agencia de protección medioambiental de los Estados Unidos de América (EPA, 2015) como insecticidas de bajo riesgo (“reduced risk pesticides”): deltametrina, emamectina, flonicamida, metoxifenocida, spinosad, spiromesifen y spirotetramat.

Tabla 13: Características principales de los insecticidas evaluados.

Ingrediente Activo (i.a.)	Modo de acción (IRAC)	Producto comercial/ Contenido i.a.	Casa comercial	Concentración (mg i.a./l) ^a
Abamectina	Activador del canal de cloro	Vertimec ® /1,8 % EC	Syngenta Agro S.A.	18
Deltametrina	Modulador del canal de sodio	Decis Protech ® / 1,5 % EW	Bayer Cropscience S.L.	12,45
Emamectina	Activador del canal de cloro	Affirm ® / 0,855 % SG	Syngenta Agro S.A.	12,83
Flonicamida	Modulador de los órganos cordotonales	Teppeki ® / 50 % WG	Belchim Crop Protection España S.A.	60
Flubendiamida	Modulador del receptor de rianodina	Fenos ® / 24% WG	Bayer Cropscience S.L.	60
Metaflumizona	Bloqueador del canal de sodio dependiente de voltaje	Alverde ® / 24% SC	BASF Española S.L.	240
Metoxifenocida	Agonista del receptor de ecdisona	Runner ® / 24 % SC	Bayer Cropscience S.L.	96
Spinosad	Activador del receptor alostérico nicotínico de la acetilcolina	Spintor 480 SC ® / 48 % SC	Dow Agrosciences Ibérica S.A.	120
Spiromesifen	Inhibidores de la acetil CoA carboxilasa	Oberon SC 240 ® / 24 % SC	Bayer Cropscience S.L.	144
Spirotetramat	Inhibidores de la acetil CoA carboxilasa	Movento ® / 15% OD	Bayer Cropscience S.L.	75
Sulfoxaflor	Agonista del receptor nicotínico de la acetilcolina	-/ 11,4% SC	Dow Agrosciences Ibérica S.A.	60 ^b

IRAC, Insecticide Resistance Action Committee; EC, Concentrado emulsionable; SG, Gránulos solubles en agua; WG, Granulado dispersable en agua; SC, Suspensión concentrada; OD, Dispersión oleosa. ^aDosis máxima recomendada en campo en España. ^bDosis máxima recomendada por la casa comercial/el fabricante.

4.3.1.1. Abamectina

Abamectina, también llamada avermectina de tipo b1, es una lactona macrocíclica producto de la fermentación natural del microorganismo del suelo *Streptomyces avermectilis* (Burg) (Actinomycetales: Streptomycetaceae) (Shipp *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2003), con actividad insecticida y acaricida (De Liñán, 2014). Debido a su actividad insecticida, es tóxico para 84 especies de insectos pertenecientes a 10 órdenes distintos, la mayor parte de los cuales son plagas de gran importancia económica (Shipp *et al.*, 2000).

Abamectina actúa por ingestión y por contacto, y presenta movimiento translaminar (Tomlin, 2009). Según su modo de acción, IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) (2015) lo incluye dentro del grupo 6 (Activadores del canal de cloro). Este producto actúa estimulando la liberación presináptica del neurotransmisor inhibitorio ácido gamma-aminobutírico (GABA), creando una corriente de Cl⁻ constante hacia el interior de las células musculares. Todo ello hace que se inhíba la transmisión de señales en las conexiones neuromusculares, produciendo parálisis (Clark *et al.*, 1994; Tomlin, 2009).

El producto utilizado en este trabajo es Vertimec® (1,8% EC P/V), de la casa comercial Syngenta Agro S.A. En España el uso de este producto está autorizado en una amplia gama de cultivos, utilizándose de forma principal contra ácaros y minadores de hoja pertenecientes al género *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae) (MAGRAMA, 2015d).

4.3.1.2. Deltametrina

Piretroide sintético de actividad insecticida superior a la de las piretrinas naturales. Actúa por contacto e ingestión de forma rápida, incluso a dosis bajas. No es sistémico y posee cierta actividad repelente. Su espectro de acción es muy amplio, siendo capaz de controlar un gran abanico de plagas pertenecientes a los principales órdenes de insectos (Tomlin, 2009; De Liñán, 2014).

IRAC (2015) lo sitúa dentro del grupo 3^a (Moduladores del canal de sodio). Este producto afecta al sistema nervioso al prolongar la apertura de los canales de Na⁺ de las

células presinápticas, bloqueando así la transmisión de los impulsos nerviosos (Casida & Durkin, 2013; De Liñán, 2014).

La formulación empleada en nuestro trabajo es Decis Protech® (1,5% EW P/V) de la casa comercial Bayer Cropscience S.L. Dicho producto fue utilizado como **estándar positivo para las dos especies de enemigos naturales estudiadas**, ya que, a pesar de ser un piretroide de amplio espectro, es usado habitualmente en cultivos hortícolas.

En España Decis Protech® está autorizado para su uso en una gran variedad de cultivos (MAGRAMA, 2015e).

4.3.1.3. Emamectina

Emamectina es una lactona macrocíclica derivada de la avermectina, de última generación. Actúa principalmente por ingestión, aunque también puede actuar por contacto. Posee movimiento translaminar, pero no es sistémica (Tomlin, 2009; De Liñán, 2014).

Este insecticida, al igual que la abamectina, pertenece al grupo 6 del IRAC (Activadores del canal de cloro). Emamectina posee un espectro de acción más reducido que la abamectina, controlando principalmente plagas pertenecientes al orden Lepidoptera (Ishaaya *et al.*, 2002).

La formulación utilizada en este trabajo es Affirm® (0,855% SG P/P) de Syngenta Agro S.A., autorizada para su uso en cultivos hortícolas y en vid (MAGRAMA, 2015f).

4.3.1.4. Flonicamida

Insecticida perteneciente a la nueva clase química de las piridinacarboxamidas, con cierta actividad sistémica y translaminar y eficaz en el control de insectos chupadores como aleiródidos y pulgones (Morita *et al.* 2007; De Liñán, 2014).

Flonicamida está clasificada dentro del grupo 9C (Moduladores de los órganos cordotónicos) del IRAC (2015). Este insecticida afecta al sistema nervioso central bloqueando los canales de K⁺ de tipo A, rectificando la corriente en las neuronas presinápticas, lo que conduce a una despolarización prolongada y a una liberación no

controlada de neurotransmisores, que se traduce a su vez, en una inhibición de la alimentación de los insectos afectados (Casida & Durkin, 2013).

La formulación empleada en nuestro trabajo es Teppeki® (50% WG P/P), de la casa comercial Belchim Crop Protection España S.A., autorizada para su uso en cultivos hortícolas, manzano, peral, melocotonero y ciruelo (MAGRAMA, 2015g).

4.3.1.5. Flubendiamida

Flubendiamida, perteneciente a la familia química de las diamidas, es un insecticida que actúa por ingestión y que muestra una gran especificidad en el control de lepidópteros plaga (Tohnishi *et al.*, 2005; Tomlin, 2009; De Liñán, 2014).

Este compuesto pertenece al grupo 28 (Moduladores del receptor de la rianodina) del IRAC (2015). Flubendiamida tiene una acción neuromuscular, activa el receptor de rianodina provocando una liberación de iones Ca^{2+} de forma incontrolada, alterando a su vez la contracción muscular y produciendo parálisis en los insectos (Casida & Durkin, 2013).

El producto utilizado en este trabajo es Fenos® (24% WG P/P), de la casa comercial Bayer Cropscience S.L. En España el uso de este producto está autorizado en hortícolas y ornamentales herbáceas (MAGRAMA, 2015h).

4.3.1.6. Metaflumizona

Semicarbazona insecticida con un amplio espectro de acción, capaz de controlar insectos pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Himenoptera, Diptera, Isoptera y Sifonaptera, algunos de los cuales son considerados plagas llave de cultivos (Salgado & Hayashi, 2007). Este insecticida actúa principalmente por ingestión, aunque posee cierta actividad por contacto (Tomlin, 2009).

Según su modo de acción, IRAC (2015) lo clasifica dentro del grupo 22B (Bloqueadores del canal de sodio dependiente de voltaje). Este insecticida bloquea los canales de sodio de las células nerviosas de los insectos, inhibiendo los impulsos nerviosos y produciendo finalmente parálisis (Casida & Durkin, 2013; De Liñán, 2014).

En contraste con las primeras semicarbazonas, el modo de acción de la metaflumizona es innovador, ya que para que actúe no se requiere una activación previa del mismo por parte del metabolismo del insecto (De Liñán, 2014).

La formulación empleada en el presente trabajo es Alverde® (24% SC P/V), de la casa comercial BASF Española S.L. En España el uso de este producto está autorizado en berenjena, col, lechuga, tomate, pimiento y patata (MAGRAMA, 2015i).

4.3.1.7. Metoxifenocida

Insecticida regulador del crecimiento, perteneciente a la familia de las diacilhidracinas. Actúa principalmente por ingestión, aunque también puede actuar por contacto y presentar cierta actividad ovicida. No posee actividad transaminar ni sistémica por el floema, sin embargo, sí presenta actividad sistémica en las raíces. Este producto está indicado para el control de lepidópteros (Carlson *et al.*, 2001; Tomlin, 2009; De Liñán, 2014).

Metoxifenocida pertenece al grupo 18 (Agonistas del receptor de ecdisona) del IRAC (2015). Este insecticida se enlaza con la proteína receptora de la ecdisona, provocando de forma prematura la muda de las larvas, ocasionándoles a su vez la muerte. Debido a la especificidad de su modo de acción, este plaguicida no afecta ni a enemigos naturales ni a polinizadores, siendo su uso recomendado en programas de GIP (Smagghe *et al.*, 2013).

El producto empleado en este trabajo es Runner® (24% SC P/V), de la casa comercial Bayer Cropscience S.L. En España su uso está autorizado en mandarina, manzano, melocotonero, naranjo, peral, pimiento, tomate y vid (MAGRAMA, 2015j).

4.3.1.8. Spinosad

Spinosad es una lactona macrocíclica mezcla de dos metabolitos, spinosin A y spinosin D, derivados de la fermentación del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* Mertz & Yao (Actinomycetales: Pseudonocardiales) (Tomlin, 2009; De Liñán, 2014). Spinosad actúa principalmente por ingestión, aunque también tiene cierta acción por contacto y una pequeña acción sistémica (Biondi *et al.*, 2012). Es eficaz en el control de

coleópteros, dípteros, hemípteros, himenópteros, isópteros, lepidópteros, ortópteros, sifonápteros y tisanópteros (Salgado, 1998).

Según su modo de acción, IRAC (2015) lo clasifica dentro del grupo 5 (Activadores del receptor alostérico nicotínico de la acetilcolina). Spinosad activa alostéricamente el receptor de la acetilcolina (nAChR) en un sitio de unión distinto al de ésta, provocando una hiperexcitación del sistema nervioso que se traduce en temblores y posterior parálisis del insecto (Salgado, 1998; Tomlin, 2009). Además, spinosad también tiene efectos sobre los receptores del GABA, aunque esta actividad no es insecticida (De Liñán, 2014).

Spinosad está autorizado para su uso en Agricultura Ecológica en la Unión Europea (OJEU, 2008).

El producto empleado en este trabajo es Spintor 480 SC® (48% SC P/V), de la casa comercial Dow Agrosciences Ibérica S.A., el cual fue utilizado junto con la deltametrina como **estándar positivo en los ensayos con el parasitoide *E. mundus***, ya que es un producto muy tóxico para los himenópteros (Williams *et al.*, 2003; Biondi *et al.*, 2012).

En España el uso del Spintor 480 SC® está autorizado en hortícolas, algodón, maíz dulce, patata, frutales y vid (MAGRAMA, 2015k).

4.3.1.9. Spiromesifen

Insecticida-acaricida perteneciente a la clase química de los ácidos tetrónicos fenilsustituidos espirocíclicos. Spiromesifen es un producto no sistémico, de aplicación foliar, que actúa por contacto y tiene también efecto ovicida (Liu, 2004; Tomlin, 2009; De Liñán, 2014). Este insecticida está indicado para el control de moscas blancas (*Bemisia* sp. y *Trialeurodes* sp.) y de ácaros tetránquidos del género *Tetranychus*, tarsonémidos como *P. latus* y eriófidos como *A. lycopersici* (Nauen & Konanz, 2005; Nauen *et al.*, 2005; De Liñán, 2014).

IRAC (2015) lo ha incluido en el grupo 23 (Inhibidores de la acetil CoA carboxilasa). Spiromesifen inhibe la coenzima acetil A carboxilasa, esencial para la biosíntesis de lípidos (Tomlin, 2009).

La formulación empleada en el presente trabajo es Oberon SC 240® (24% SC P/V), de la casa comercial Bayer Cropscience S.L. En España su uso está autorizado en cultivos hortícolas y en ornamentales herbáceas y leñosas (MAGRAMA, 2015l).

4.3.1.10. Spirotetramat

El spirotetramat es un insecticida derivado del ácido tetrónico que actúa principalmente por ingestión, aunque también puede actuar por contacto (Tomlin, 2009). Presenta sistemicidad en dos vías, es decir, una vez dentro de la planta, el insecticida se mueve hacia las raíces y hacia la parte aérea (De Liñán, 2014). Este insecticida está indicado para el control de insectos chupadores como moscas blancas, pulgones, psilas, cochinillas y trips (Nauen *et al.*, 2008; Brück *et al.*, 2009).

Al igual que spiromesifen, pertenece al grupo 23 del IRAC (2015) y actúa de forma análoga (Tomlin, 2009).

El producto empleado en este trabajo es Movento® (15% OD P/V), de la casa comercial Bayer Cropscience S.L. En España su uso está autorizado en cultivos hortícolas, limonero, mandarino, naranjo y vid de mesa (MAGRAMA, 2015m).

4.3.1.11. Sulfoxaflor

Sulfoxaflor es el primer miembro de la nueva familia química de las sulfoxaminas. Este insecticida actúa tanto por contacto como por ingestión, posee movimiento sistémico y es eficaz en el control de insectos chupadores, incluyendo aquellos resistentes a neonicotinoides y a otros tipos de insecticidas (Babcock *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011; Australian Government, 2013).

Según su modo de acción, IRAC (2015) lo clasifica dentro del grupo 4C (Agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina). El sulfoxaflor imita la acción de la acetilcolina en el receptor, provocando una hiperexcitación del sistema nervioso central

del insecto. Este insecticida es química y bioquímicamente distinto de otros que actúan sobre el nAChR (receptor de la acetilcolina). Además, presenta una relación estructura-actividad (SAR, *structure activity relationships*) distinta al resto de agonistas del nAChR (Sparks *et al.*, 2013).

El producto empleado en el presente trabajo, con una riqueza del 11,4%, fue suministrado por la casa Dow Agrosciences Ibérica S.A. En el momento de la realización de los ensayos este producto solo tenía registro en EEUU, sin embargo ha sido recientemente incorporado al anexo I de la Directiva Europea 91/414/CEE (DOUE, 2015).

4.3.2. Ensayos de laboratorio

4.3.2.1. Aplicación de insecticidas

Los insecticidas evaluados en este trabajo, se aplicaron siguiendo las premisas establecidas por la OILB (Organización Internacional para la Lucha Biológica) (Hassan, 1994), a las dosis máximas registradas para su uso en campo o, en el caso del sulfoxaflor, al ser un producto sin registrar en España, siguiendo la recomendación de la casa comercial (Dow Agrosciences Ibérica S.A.).

Para la aplicación de los insecticidas se utilizó la Torre de Potter® (Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, UK), un pulverizador automático que permite una distribución homogénea de los productos por toda la superficie a tratar y con el tamaño de gota más pequeño posible (Potter, 1952).

En el cálculo de las soluciones insecticidas se utilizó el PIEC (concentración ambiental predecible inicial), fórmula que es función de la dosis máxima aplicada del insecticida en campo y del gasto de agua para cada tipo de cultivo, considerando un factor de corrección para cultivos herbáceos ($f=1$) (**Tabla 14**) (Barrett *et al.*, 1994).

En este trabajo se usó el PIEC (300) debido a que el gasto de 300 l/ha de agua es habitual en los cultivos hortícolas. En la **Tabla 15** se resumen los distintos valores de PIEC, así como las dosis máximas de campo de los compuestos evaluados.

Tabla 14: Concentración ambiental predecible inicial (PIEC).

Concentración ambiental predecible inicial
$PIEC (\mu g/cm^2) = DMC * f / 100$
DMC (g/ha): Dosis Máxima en Campo
f: Factor de corrección (1, para cultivos herbáceos)

Tabla 15: Valores del PIEC y de las dosis máximas de campo de los insecticidas evaluados.

Ingrediente Activo (i.a.)	Dosis máxima en hortícolas	PIEC ($\mu g/cm^2$)
Abamectina	100 cc p.c./hl	3
Deltametrina	83 cc p.c./hl	2,49
Enamectina	150 g p.c./hl	4,5
Flonicamida	12 g p.c./hl	0,36
Flubendiamida	25 g p.c./hl	0,75
Metaflumizona	100 cc p.c./hl	3
Metoxifenocida	40 cc p.c./hl	1,2
Spinosad	25 cc p.c./hl	0,75
Spiromesifen	60 cc p.c./hl	1,8
Spirotetramat	50 cc p.c./hl	1,5
Sulfoxaflor	24 g i.a./ha	2,1

p.c.: Producto comercial. PIEC: Concentración ambiental predecible inicial.

Para el cálculo de las soluciones, además del PIEC, es necesario conocer el valor medio del residuo pulverizado con el que se trabaja, el cual debe estar comprendido entre 1,5-2 mg/cm² (Hassan, 1994). Para ello, antes de comenzar cada ensayo, es necesario calibrar la Torre de Potter® para asegurarnos de que el residuo esté comprendido dentro del rango necesario. Dicha calibración se lleva a cabo aplicando 1 ml de agua destilada a 55 kPa de presión sobre una superficie de dimensiones conocidas, y repitiendo el proceso unas 10 veces para obtener un valor medio del residuo.

Para evitar la presencia de posibles restos de residuos, se debe limpiar el equipo de pulverización con agua y acetona entre aplicaciones insecticidas, las cuales se deben hacer del producto presumiblemente menos tóxico, al más tóxico.

Debido a que el número de insecticidas estudiados era demasiado grande como para evaluar sus efectos sobre los enemigos naturales en una sola vez, cada ensayo de laboratorio se dividió en dos ensayos y en cada uno se utilizó la mitad de los insecticidas, además de los controles negativo y positivo/s.

4.3.2.2. Tratamiento directo de los estados más protegidos de los enemigos naturales

4.3.2.2.1. *Eretmocerus mundus*

Previamente al inicio del ensayo, pupas de *E. mundus* sin sexar, fueron separadas y mantenidas a 8 °C en oscuridad hasta el momento de su utilización, como se describe en el capítulo anterior.

Tras calibrar la Torre de Potter® y preparar las disoluciones insecticidas correspondientes, se procedió a la pulverización directa de las pupas sobre cristal (**Figura 23**). Se hicieron 5 repeticiones por cada tratamiento y se usaron 20 pupas por cada repetición.

Figura 23: Detalle de los cristales donde se colocaban las pupas de *E. mundus* para el tratamiento insecticida.

Una vez secas las pupas, se introdujeron en cajas de metacrilato (7 cm de diámetro y 3 cm de altura), cuyas tapas poseían un orificio (1,5 cm de diámetro) cubierto con rejilla metálica que permitía una correcta ventilación de las mismas.

Para que los insectos que fuesen emergiendo pudieran alimentarse, se dispusieron pequeñas gotas de miel (aplicadas con un alfiler) en las tapas de las cajas.

Posteriormente, se trasladaron las unidades de ensayo al insectario, donde fueron mantenidas bajo las condiciones indicadas en el capítulo 3 (**Figura 24**).

Figura 24: Detalle de una caja de metacrilato con las pupas tratadas de *E. mundus* y distribución de las mismas en el interior del insectario.

Durante 7 días desde el inicio del ensayo, se contabilizaron diariamente los adultos emergidos en cada caja. El recuento finalizó tras comprobarse que no se producían cambios en el porcentaje de emergencia del testigo.

Para evaluar la mortalidad de los adultos emergidos, los insectos que iban emergiendo cada día en cada una de las repeticiones, se pasaban al interior de nuevas cajas de metacrilato. En esta ocasión, en cada caja se introdujo un tubo eppendorf (2 ml) con un foliolo de tomate, para que los insectos se pudiesen resguardar de la electricidad estática reinante en el interior de dichas cajas de plástico. Para rellenar los tubos eppendorf se escogió agar (1,5%) en vez de agua, ya que el agar tiene la capacidad de mantener los foliolos en estado óptimo durante una semana.

Los insectos recién emergidos se alimentaron *ad libitum* con gotas de miel, y de nuevo, fueron sometidos a las condiciones ambientales reinantes en el insectario. La mortalidad de los adultos fue evaluada durante las 72 horas siguientes a su emergencia.

Con los adultos supervivientes (72 horas de edad), se procedió al estudio de la capacidad de parasitación. Para ello, se hicieron 7 repeticiones de 1♀ y 1♂ por cada tratamiento y por el control. Cada pareja se individualizó en cajas de plástico en cuyo interior se encontraban foliolos infestados con ninfas N2 de *B. tabaci* (**Figura 25**). Los insectos se alimentaron de nuevo *ad libitum* con gotas de miel y, transcurridas 24 horas, se retiraron. A los 7-9 días del final del ensayo, cuando se producía el desplazamiento

de los micetomas de la mosca blanca desde su posición central original, se evaluó el número de ninfas N2 de *B. tabaci* parasitadas por cada hembra de *E. mundus*.

Figura 25: Detalle de las cajas empleadas para la evaluación de la parasitación en *E. mundus*.

4.3.2.2.2. *Amblyseius swirskii*

Previamente al inicio del ensayo, se colocaron 25 huevos de *A. swirskii* en placas Petri® de cristal (10 cm de diámetro) y se mantuvieron a 8°C en oscuridad hasta el momento de su utilización.

Los huevos fueron pulverizados con los insecticidas y el control, usando la Torre de Potter® (**Figura 26**). Se hicieron 5 repeticiones por cada tratamiento.

Figura 26: Detalle de las placas Petri® tratadas con los huevos de *A. swirskii*.

Una vez secos los huevos, se introdujeron en cajas desmontables, adaptación de las diseñadas por Jacas & Viñuela (1994). Dichas cajas estaban constituidas por dos placas de cristal (12 x 12 cm) y un aro de metacrilato (3,5 cm de altura y 6 cm de diámetro), ensamblados con gomas. El aro poseía 4 orificios, dos cubiertos con malla metálica, para permitir una correcta aireación y evitar la huída de los insectos del interior de la

caja, y otros dos que permitían la introducción de los insectos y la conexión de las unidades de ensayo a un circuito de ventilación forzada, sólo necesario en los ensayos de contacto residual (Hassan, 1994).

Para la alimentación de los estadios ninfales de *A. swirskii* tras la eclosión de los huevos, se dispusieron en el interior de las unidades de ensayo comederos con huevos y larvas de *C. lactis* sobre polen comercial.

Para evitar la desecación de los huevos y/o de los estadios ninfales, también se dispuso en el interior de las cajas un trozo de judía verde parafinada por ambos extremos y una tira de papel de filtro introducida en un pequeño vaso de cristal, por donde el agua ascendía por capilaridad (**Figura 27**).

Una vez montadas las unidades de ensayo, se introdujeron los huevos tratados en su interior y se trasladaron a una cámara SANYO (condiciones descritas en el apartado 3.1.1.2.).

Figura 27: Detalle de las unidades de ensayo empleadas en el tratamiento de huevos de *A. swirskii*.

Durante 7 días desde el inicio del ensayo, se observaron diariamente los huevos eclosados en cada caja, así como el número de estadios ninfales muertos.

Una vez evaluada la eclosión de los huevos y la mortalidad en los estadios ninfales, con los adultos supervivientes, se procedió al estudio de la fertilidad y fecundidad de los mismos. El séptimo día de ensayo, se desmontaron las unidades experimentales y los adultos presentes en cada repetición, fueron sexados e introducidos en las cajas de metacrilato descritas en el apartado anterior. El fondo de las cajas se cubrió con un

papel de filtro Whatman negro, que facilitaba la observación de los ácaros en su interior. Además, se introdujeron *C. lactis* sobre polen, como alimento, y un sustrato de puesta (fibras de papel de filtro) (**Figura 28**). Durante una semana se evaluó diariamente el número de huevos puesto y el número de ácaros muertos en cada tratamiento.

Figura 28: Detalle de las cajas empleadas para la evaluación de la fecundidad de *A. swirskii*.

La puesta diaria encontrada en cada una de las repeticiones, se individualizó en pequeños vasos de cristal (3 cm de diámetro y 3,5 cm de alto) correctamente etiquetados (**Figura 29**) y la eclosión de los mismos se evaluó diariamente.

Figura 29: Detalle de los vasos empleados para la evaluación de la fertilidad de *A. swirskii*.

4.3.2.3. Tratamiento por contacto residual sobre placas de cristal del estado adulto de ambos enemigos naturales

Para la realización de este ensayo, se usaron las cajas desmontables descritas en el apartado 4.3.2.2.2. Las placas de cristal que constituían dicha caja fueron tratadas bajo

la Torre de Potter®, por una sola cara (cara en contacto directo con los insectos) (**Figura 30**). Se hicieron 5 repeticiones por cada insecticida y por el control.

Figura 30: Detalle de las placas de cristal tratadas.

A continuación, y una vez seco el residuo de las placas a temperatura ambiente, se procedió al montaje de las unidades de ensayo.

En los ensayos con *E. mundus*, para que los insectos pudieran alimentarse, se dispusieron pequeñas gotas de miel en las paredes de los aros de metacrilato que constituían las cajas desmontables (**Figura 31**). En cada unidad experimental se introdujeron 20 *E. mundus* adultos (10 ♀ y 10 ♂) con una edad comprendida entre las 0 y 24 horas de vida.

Figura 31: Detalle de las unidades de ensayo para *E. mundus*.

Para la alimentación de los *A. swirskii*, se dispusieron en el interior de las unidades de ensayo, comederos con *C. lactis* sobre polen comercial. Además, para fomentar que la humedad fuese alta en el interior de las cajas, se dispusieron tiras de papel de filtro, colocadas sobre una fina tira de celofán (para evitar que el agua estuviese en contacto directo con los insecticidas) e introducidas en un pequeño vaso de cristal con agua

destilada (**Figura 32**). En cada unidad de ensayo se introdujeron 20 *A. swirskii* adultos (15 ♀ y 5 ♂).

Figura 32: Detalle de las unidades de ensayo para *A. swirskii*.

En estos ensayos se tuvo en cuenta que la aireación de las unidades experimentales fuera la adecuada, como recomiendan las directrices de la OILB (Hassan, 1994). Para ello, cuando las cajas se trasladaron al insectario, se conectaron mediante una aguja hipodérmica a un circuito de ventilación forzada (**Figura 33**).

Figura 33: Detalle de las unidades de ensayo conectadas al circuito de ventilación forzada.

Los adultos estuvieron expuestos a los residuos insecticidas durante 3 días. Al final de este periodo se evaluó la mortalidad producida como consecuencia de cada tratamiento.

Con los adultos supervivientes, se procedió al estudio de los parámetros reproductivos. En los ensayos con el parasitoide, para la evaluación de la capacidad de parasitación se siguió la misma metodología descrita en el apartado 4.3.2.2.1. En los

ensayos con el ácaro depredador, también se procedió de manera análoga a la descrita en el apartado 4.3.2.2.2., pero realizando 10 repeticiones de 3 ♀ y 1 ♂ por cada tratamiento y por el control. Además, durante la semana que duró la observación de los parámetros reproductivos, se registró la mortalidad diaria en cada uno de los tratamientos.

4.3.3. Ensayos de persistencia

Estos ensayos se llevaron a cabo con aquellos insecticidas que fueron tóxicos en los ensayos por contacto residual bajo condiciones de laboratorio, según la metodología de la OILB.

La evaluación de la persistencia de los insecticidas a lo largo del tiempo, se realizó exponiendo a los enemigos naturales a residuos de 0 (fresco), 4, 10, 21 y 31 días de edad, hasta la pérdida de su toxicidad (categoría 1 OILB).

Todo el procedimiento fue idéntico para *E. mundus* y *A. swirskii*, excepto el sustrato empleado: plantas de tomate (40 cm de altura) en el caso del parasitoide y plantas de pimiento (30 cm de altura) en el caso del ácaro depredador (**Figura 34**). Las plantas se trataron al aire libre, hasta punto de goteo, empleando pulverizadores manuales, y una vez secas, se introdujeron de nuevo en el interior del invernadero, donde se dejaron envejecer los residuos.

Durante el periodo de duración de los ensayos, la temperatura y la humedad fueron monitorizadas gracias al uso de registradores (Tinytag® Ultra-Gemini Data Logger GLM) y, de igual forma, las radiaciones UV y PAR puntuales fueron registradas mediante el uso de radiómetros (Ultra-Violet Meter® MU-200 y Quantum-Meter® BQM, Apogee Instruments). Las medidas de radiación se hicieron a la misma hora (12 am) durante todos los días de duración del ensayo, tanto en el exterior como en el interior del invernadero.

Las condiciones ambientales a las cuales estuvieron sometidas las plantas durante los ensayos, se resumen en la **Tabla 16**.

Figura 34: Detalle de las plantas de tomate y pimienta usadas en los distintos ensayos de persistencia.

Tabla 16: Condiciones ambientales reinantes en el interior del invernadero durante los ensayos de persistencia.

Condiciones ambientales	Ensayo con <i>E. mundus</i> (Julio-Agosto 2012)	Ensayo con <i>A. swirskii</i> (Junio 2013)
T° (°C) media	24,28 ± 0,09	27,02 ± 0,2
T° máxima (°C) media	24,94 ± 0,09	27,85 ± 0,22
T° mínima (°C) media	23,66 ± 0,08	26,29 ± 0,18
HR (%) media	56,58 ± 0,29	45,62 ± 0,51
HR máxima (%) media	59,53 ± 0,28	47,72 ± 0,53
HR mínima (%) media	53,65 ± 0,3	43,48 ± 0,48
Radiación PAR media (μmol/m ² s)	640,88 ± 18,03	496,73 ± 117,24
Radiación UV media (μmol/m ² s)	29,14 ± 1,17	27,88 ± 6,02

Para cada uno de los residuos evaluados, se seleccionaron 5 hojas por cada tratamiento y por el control, las cuales se introdujeron en tubos eppendorf (2 ml) rellenos de agar (**Figura 35**).

Figura 35: Detalle de las hojas de pimiento tratadas e introducidas en tubos eppendorf con agar en el ensayo de persistencia con *A. swirski*.

Cada unidad de ensayo consistía en una caja de metacrilato (descrita en el apartado 4.3.2.2.1.) en cuyo interior se disponían las hojas tratadas con el correspondiente residuo insecticida, los enemigos naturales y un recurso alimenticio (**Figura 36**). En los ensayos con *E. mundus*, se introdujeron 15 adultos (8 ♀ y 7 ♂) por repetición y con *A. swirskii*, 20 adultos (15 ♀ y 5 ♂). Los enemigos naturales fueron alimentados de manera análoga a la descrita en apartados anteriores.

Figura 36: Detalle de las unidades experimentales en los ensayos de persistencia.

Los adultos estuvieron expuestos a los residuos insecticidas durante 3 días. Al final de este periodo se evaluó la mortalidad producida como consecuencia de cada tratamiento.

Una vez evaluada la mortalidad, y con aquellos insecticidas que resultaron inocuos para dicho parámetro, se procedió a la evaluación de los parámetros reproductivos en los enemigos naturales supervivientes, siguiendo la misma metodología descrita en el apartado anterior.

4.3.4. Clasificación de los insecticidas

Una vez finalizados los ensayos, se procedió a la corrección de los valores medios obtenidos para cada parámetro evaluado, usando para ello, la fórmula de Schneider-Orelli $[M (\%) = [(M_{tratado} - M_{control}) / (100 - M_{control})] \times 100]$ para la mortalidad y la fórmula de Abbott $[P (\%) = [1 - (P_{tratado} / P_{control})] \times 100]$ para el resto de parámetros evaluados.

Estos valores corregidos fueron utilizados para clasificar a los insecticidas conforme propone la OILB (Hassan, 1994). Para los **ensayos de laboratorio** las categorías OILB usadas fueron las siguientes: 1, inocuo (<30%); 2, ligeramente tóxico (30-79%); 3, moderadamente tóxico (80-99%) y 4, tóxico (>99%). Para los **ensayos de laboratorio extendido**, las categorías fueron: 1, inocuo (<25%); 2, ligeramente tóxico (25-50%); 3, moderadamente tóxico (51-75%); 4, tóxico (>75%). Y para la clasificación de los insecticidas según su **persistencia**, las categorías empleadas fueron: A, poco persistente (<5 días); B, ligeramente persistente (5-15 días); C, moderadamente persistente (16-30 días); D, persistente (>30 días).

4.4. Resultados

4.4.1. *Eretmocerus mundus*

4.4.1.1. Tratamiento directo de pupas

En la **Figura 37** y en la **Tabla 17**, se muestran los resultados obtenidos al tratar con las soluciones insecticidas, las pupas del parasitoide *E. mundus*. En la **Tabla 18** se dan las categorías OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado y la clasificación final de los mismos, siendo ésta la más desfavorable entre los parámetros estudiados.

La **Figura 37** muestra la reducción de la emergencia de los adultos de *E. mundus* para los distintos insecticidas ($F=207,21$; g.l.=10, 54; $P<0,0001$). La emergencia media de los adultos en los controles de los dos ensayos efectuados (cada uno con la mitad de los insecticidas estudiados) fue del $86,0 \pm 4,0$ y $94,0 \pm 1,87\%$, respectivamente. De los insecticidas evaluados, el tratamiento directo de las pupas de *E. mundus* con emamectina, abamectina, sulfoxaflor y spinosad, causó una mortalidad significativa al

reducir la emergencia de los adultos del $39,36 \pm 2,13\%$, en emamectina, al $97,24 \pm 0,92\%$, en spinosad. Por ello, emamectina y abamectina fueron clasificadas como ligeramente tóxicas (OILB 2) y, sulfoxaflor y spinosad como moderadamente tóxicos (OILB 3) (Tabla 18).

Figura 37: Reducción media de la emergencia (%) de los adultos de *E. mundus* tras el tratamiento directo de las pupas con los insecticidas evaluados. *Los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

Independientemente de si la tasa de emergencia se vio afectada o no, se detectaron algunos efectos subletales (Tabla 17): los adultos emergidos de las pupas tratadas con algunos de los insecticidas evaluados, vivían menos que los de los controles, y/o su capacidad de parasitación se vio afectada. Aunque la mortalidad media de los adultos a las 72 horas de la emergencia en los controles fue del $13,87 \pm 2,27$ ($n=68$) y $15,3 \pm 1,32\%$ ($n=85$), ésta se incrementó significativamente en deltametrina, emamectina, flonicamida, sulfoxaflor y spinosad. Debido a que el incremento de la mortalidad respecto al control no superó el 30% en el caso de deltametrina, flonicamida y emamectina, estos insecticidas fueron clasificados como inocuos (OILB 1), mientras que sulfoxaflor y spinosad, al causar un incremento de la mortalidad superior al 99%, se clasificaron como tóxicos (OILB 4) (Tabla 18).

En los controles, las hembras de *E. mundus* parasitaron de media $16,28 \pm 0,56$ y $16,71 \pm 0,61$ ninfas de segundo estadio (N2) de *B. tabaci* por día, mientras que las hembras emergidas de pupas tratadas con spiromesifen, deltametrina, emamectina y abamectina, mostraron reducciones significativas de este parámetro que iban del $10,73 \pm 2,89\%$, en spiromesifen, al $43,75 \pm 3,59\%$, en abamectina (**Tabla 17**). A pesar de estas reducciones en la capacidad de parasitación, sólo deltametrina, emamectina y abamectina, fueron clasificadas como ligeramente tóxicas (OILB 2) (**Tabla 18**).

Tabla 17: Incremento de la mortalidad a las 72 horas de la emergencia y reducción de la parasitación de los adultos de *E. mundus* emergidos de pupas tratadas directamente con los distintos insecticidas.

Tratamientos	Concentración (mg i.a./l)	% Incremento de la mortalidad 72 h después de la emergencia (n ^a)	% Reducción de la parasitación ^b
Abamectina	18	$2,58 \pm 2,58$ a (15)	$43,75 \pm 3,59$ d
Deltametrina	12,45	$13,45 \pm 2,11$ bc (115)	$30,30 \pm 2,31$ c
Emamectina	12,83	$27,46 \pm 2,4$ d (45)	$33,31 \pm 4,91$ c
Flonicamida	60	$18,58 \pm 3,64$ c (81)	$5,62 \pm 2,39$ ab
Flubendiamida	60	$9,21 \pm 2,07$ ab (70)	$4,11 \pm 1,9$ ab
Metaflumizona	240	$3,44 \pm 2,29$ a (63)	$8,49 \pm 2,93$ ab
Metoxifenocida	96	$2,75 \pm 2,03$ a (52)	$9,63 \pm 2,89$ ab
Spiromesifen	144	$7,49 \pm 3,39$ ab (54)	$10,73 \pm 2,89$ b
Spirotetramat	75	$7,23 \pm 2,99$ ab (56)	$2,11 \pm 1,01$ a
Spinosad	120	100 ± 0 e (5)	-
Sulfoxaflor	60	100 ± 0 e (5)	-
F (g.l.)	-	200,42 (10,44)	25,04 (8, 59)
P	-	< 0,0001	< 0,0001

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^an: Número de adultos analizados. ^bParasitación: Número de ninfas de *B. tabaci* parasitadas por hembra de *E. mundus* y día.

Tabla 18: Clasificación OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado tras el tratamiento directo de las pupas de *E. mundus* y clasificación final de los mismos.

Tratamientos	Concentración (mg i.a./l)	Emergencia ^a	Mortalidad 72 h tras la emergencia ^a	Parasitación ^a	Clase Final OILB ^{a,b}
Abamectina	18	2	1	2	2
Deltametrina	12,45	1	1	2	2
Emamectina	12,83	2	1	2	2
Flonicamida	60	1	1	1	1
Flubendiamida	60	1	1	1	1
Metaflumizona	240	1	1	1	1
Metoxifenocida	96	1	1	1	1
Spiromesifen	144	1	1	1	1
Spirotetramat	75	1	1	1	1
Spinosad	120	3	4	-	4
Sulfoxaflor	60	3	4	-	4

^aCategorías toxicológicas de la OILB en laboratorio: 1=inocuo (reducción<30%), 2=ligeramente tóxico (reducción 30-79%), 3=moderadamente tóxico (reducción 80-99%) y 4=tóxico (reducción>99%). ^bClase Final OILB: clasificación más desfavorable entre los parámetros estudiados.

4.4.1.2. Contacto residual sobre placas de cristal con el estado adulto

En las **Figuras 38 y 39**, se muestran los resultados obtenidos al exponer durante 72 horas a los adultos de *E. mundus* a los distintos insecticidas estudiados. En la **Tabla 19** se muestran las categorías OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado, así como la clasificación final de los mismos.

La **Figura 38** muestra el incremento de la mortalidad de los adultos de *E. mundus* tras la exposición continuada de los mismos a los residuos frescos de los insecticidas durante 72 horas ($F=218,17$; g.l.=10, 54; $P<0,0001$). En los controles la mortalidad media fue del $13,0 \pm 2,0$ y $15,0 \pm 2,74\%$, respectivamente. En los distintos tratamientos, la mortalidad tras la exposición durante 72 horas a los residuos frescos se incrementó significativamente del $7,13 \pm 3,09\%$, en spiromesifen, al 100%, en spinosad y sulfoxaflor. Abamectina, deltametrina, emamectina, metaflumizona y spirotetramat

fueron clasificados como ligeramente tóxicos (OILB 2), y sulfoxaflor y spinosad, como tóxicos (OILB 4) (Tabla 19).

Figura 38: Incremento de la mortalidad (%) de los adultos de *E. mundus* tras el contacto residual con los insecticidas evaluados durante 72 horas. *Los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

La **Figura 39** muestra la reducción de la capacidad de parasitación de los adultos tras la exposición durante 72 horas a los insecticidas ($F=16,25$; g.l.=8,57; $P<0,0001$). Como se observa, se detectaron reducciones significativas en la capacidad de parasitación de los adultos supervivientes al contacto con los residuos insecticidas. A pesar de que el número de ninfas de *B. tabaci* parasitadas por hembra de *E. mundus* y día fue $12,00 \pm 0,65$ y $12,86 \pm 0,40$ en los controles, este número decreció en los tratamientos restantes desde un $1,91 \pm 1,23\%$, en spiromesifen, a un $46,68 \pm 4,30\%$, en abamectina. Abamectina, emamectina y deltametrina, al reducir la capacidad de parasitación más de un 30%, fueron clasificadas como ligeramente tóxicas (OILB 2) (Tabla 19).

Figura 39: Reducción (%) de la parasitación de los adultos de *E. mundus* (número de ninfas de *B. tabaci* parasitadas por hembra de *E. mundus* y día) tras el contacto residual con los insecticidas evaluados durante 72 horas. *Los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

Tabla 19: Clasificación OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado tras la exposición de los adultos de *E. mundus* a residuos frescos de los plaguicidas y clasificación final de los mismos.

Tratamientos	Concentración (mg i.a./l)	Mortalidad 72 h ^a	Parasitación ^a	Clase Final OILB ^{a,b}
Abamectina	18	2	2	2
Deltametrina	12,45	2	2	2
Emamectina	12,83	2	2	2
Flonicamida	60	1	1	1
Flubendiamida	60	1	1	1
Metaflumizona	240	2	1	2
Metoxifenocida	96	1	1	1
Spiromesifen	144	1	1	1
Spirotetramat	75	2	1	2
Spinosad	120	4	-	4
Sulfoxaflor	60	4	-	4

^aCategorías toxicológicas de la OILB en laboratorio: 1=inocuo (reducción<30%), 2=ligeraamente tóxico (reducción 30-79%), 3=moderadamente tóxico (reducción 80-99%) y 4=tóxico (reducción>99%). ^bClase Final OILB: clasificación más desfavorable entre los parámetros estudiados.

4.4.1.3. Persistencia

En la **Tabla 20** se muestran los datos referentes a la mortalidad y capacidad de parasitación de los adultos de *E. mundus*, tras su exposición durante 72 horas a residuos insecticidas de 0, 4, 10, 21 y 31 días de edad sobre hojas de tomate.

En los adultos de *E. mundus*, los residuos frescos (0 días de edad) de todos los insecticidas evaluados causaron una toxicidad similar a la observada en los ensayos de contacto residual en laboratorio.

Los residuos de 4 días de edad de metaflumizona y spirotetramat causaron una mortalidad inferior al 25% respecto al control y no produjeron efectos subletales. Por ello, ambos insecticidas fueron clasificados como poco persistentes (OILB A).

Para el resto de tratamientos, el número de días requeridos para que los residuos perdiesen su actividad tóxica varió de 10 días en emamectina (ligeramente persistente, OILB B), a 21 días en abamectina y deltametrina (moderadamente persistente, OILB C). Spinosad y sulfoxaflor fueron clasificados como persistentes (OILB D), ya que 31 días después del tratamiento (DDT) seguían siendo tóxicos para los adultos de *E. mundus*, produciendo una mortalidad del $38,38 \pm 2,71$ y $68,0 \pm 3,89$ %, respectivamente.

Tabla 20: Mortalidad media de los adultos de *E. mundus* tras ser expuestos durante 72 horas a los residuos insecticidas de 0, 4, 10, 21 y 31 días de edad sobre hojas de tomate y capacidad de parasitación media de los supervivientes.

Tratamiento	Concentración (mg i.a./l)	0 DDT ^a		4 DDT ^a		10 DDT ^a		21 DDT ^a		31 DDT ^a		Categoría OILB ^c
		Mortalidad a las 72 h (%)	Mortalidad a las 72 h (%)	Parasitación ^b	Mortalidad a las 72 h (%)	Parasitación ^b	Mortalidad a las 72 h (%)	Parasitación ^b	Mortalidad a las 72 h (%)	Parasitación ^b	Mortalidad a las 72 h (%)	
Control	-	15,14 ± 1,58 a	10,85 ± 1,72 a	9,84 ± 0,60 a	16,67 ± 1,68 a	12,0 ± 0,44 a	20,01 ± 3,65 a	11,5 ± 0,45 a	4,01 ± 1,64 a	-	-	-
Abamectina	18	86,67 ± 2,11 d	64,76 ± 4,12 d	-	40,57 ± 3,69 b	-	25,33 ± 2,49 a	11 ± 0,43 a	-	-	-	C
Deltametrina	12,45	60,76 ± 2,63 c	38,95 ± 2,95 c	-	43,14 ± 2,79 b	-	26,19 ± 3,62 a	10,8 ± 0,59 a	-	-	-	C
Enamectina	12,83	65,33 ± 3,89 c	35,14 ± 3,25 c	-	32,09 ± 3,16 b	10,71 ± 0,52 a	-	-	-	-	-	B
Metaflumizona	240	35,14 ± 2,48 b	25,33 ± 2,49 b	10,14 ± 0,55 a	-	-	-	-	-	-	-	A
Spirotetramat	75	37,05 ± 1,89 b	24,0 ± 3,40 b	10,83 ± 0,70 a	-	-	-	-	-	-	-	A
Spinosad	120	98,67 ± 1,33 e	97,33 ± 1,63 f	-	64,09 ± 5,58 c	-	78,29 ± 2,72 b	-	38,38 ± 2,71 b	-	-	D
Sulfoxaflor	60	85,24 ± 2,42 d	79,52 ± 2,89 e	-	64,57 ± 5,13 c	-	72 ± 3,89 b	-	68 ± 3,89 c	-	-	D
<i>F</i> (g.l.)	-	148,58 (7,32)	107,71 (7,32)	0,66 (2,16)	22,61 (5,24)	3,57 (1,12)	72,53 (4, 20)	0,56 (2, 14)	122,49 (2,12)	-	-	-
<i>P</i>	-	< 0,0001	< 0,0001	0,5322	< 0,0001	0,0831	< 0,0001	0,5833	< 0,0001	-	-	-

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aDDT: Días después del tratamiento.

^bParasitación: Número de ninfas de *B. tabaci* parasitadas por hembra y día. ^cCategorías toxicológicas de la OILB para persistencia: Poco persistente (<5 días): A, Ligeramente persistente (5-15 días): B, Moderadamente persistente (16-30 días): C, Persistente (>30 días): D.

4.4.2. *Amblyseius swirskii*

4.4.2.1. Tratamiento directo de huevos

En las **Figuras 40 y 41** y en la **Tabla 21**, se muestran los distintos resultados obtenidos al tratar con las soluciones insecticidas ensayadas, huevos del ácaro depredador *A. swirskii*. Las categorías OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado, así como la categoría final de los mismos, se resumen en la **Tabla 22**.

La **Figura 40** muestra la reducción en la eclosión de los huevos de *A. swirskii* tras ser tratados con los distintos insecticidas ($F=5,74$; g.l.=10, 48; $P<0,0001$). La eclosión media en los controles de los dos ensayos efectuados (cada uno con la mitad de los insecticidas estudiados) fue del $96,8 \pm 1,50$ y $89,84 \pm 1,89\%$, respectivamente. De los insecticidas evaluados, el tratamiento directo con la dosis máxima autorizada en hortícolas de deltametrina, emamectina, spinosad y spirotetramat, causó una reducción significativa de la eclosión que fue del $7,11 \pm 3,10\%$ en deltametrina, al $30,09 \pm 4,65\%$ en spirotetramat. A pesar de estas diferencias estadísticamente significativas, solo spirotetramat recibió una categoría toxicológica distinta de 1, al superar este valor el 30% (ligeramente tóxico, OILB 2) (**Tabla 22**).

La **Figura 41** muestra el incremento en la mortalidad de los estadios ninfales procedentes de los huevos de *A. swirskii* tratados con los productos insecticidas ($F=2,19$; g.l.=10, 48; $P=0,0347$). La mortalidad media de las ninfas de *A. swirskii* en los controles fue del $23,11 \pm 2,65$ y $15,82 \pm 1,15\%$, respectivamente. A pesar de que se observó un incremento significativo de la mortalidad de las ninfas procedentes de huevos tratados con emamectina, metaflumizona, spiromesifen y spirotetramat, como fue inferior al 30%, todos los insecticidas fueron clasificados como inócuos (OILB 1) (**Tabla 22**).

Figura 40: Reducción de la eclosión (%) de los huevos de *A. swirskii* tras la pulverización de los mismos con los insecticidas evaluados. *Los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). Cambio de variable ($y = \arcsen(\sqrt{x/100})$) para cumplir homocedasticidad.

Figura 41: Incremento de la mortalidad (%) durante los estadios ninfales de *A. swirskii* tras el tratamiento directo de los huevos con los insecticidas evaluados. *Los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

La **Tabla 21** muestra la reducción de los parámetros reproductivos evaluados (fecundidad y fertilidad). En los controles, el número de huevos puestos por hembra de *A. swirskii* y semana fue $4,24 \pm 0,36$ y $5,89 \pm 0,19$, respetivamente, y la fertilidad de los mismos fue del $99,3 \pm 0,70\%$ y $94,16 \pm 1,60\%$. Aunque no se observaron diferencias significativas en la fecundidad de los ácaros, se detectaron reducciones significativas de la fertilidad en las hembras procedentes de huevos tratados con flonicamida, flubendiamida y metaflumizona. Finalmente, y a pesar de las diferencias estadísticas mencionadas, todos los insecticidas fueron clasificados como inocuos (OILB 1) para los parámetros reproductivos evaluados (**Tabla 22**).

Tabla 21: Reducción de la fecundidad y fertilidad (%) en las hembras de *A. swirskii* procedentes de huevos tratados por pulverización directa con los insecticidas evaluados.

Tratamientos	Concentración (mg i.a./l)	Reducción de la fecundidad ^a (%)	Reducción de la fertilidad ^b (%)*
Abamectina	18	$22,67 \pm 12,26$ a	$1,74 \pm 1,74$ ab
Deltametrina	12,45	$13,84 \pm 3,91$ a	$0,74 \pm 0,49$ a
Emamectina	12,83	$24,88 \pm 13,01$ a	0 ± 0 a
Flonicamida	60	$9,08 \pm 4,29$ a	$6,01 \pm 2,82$ cd
Flubendiamida	60	$8,64 \pm 4,40$ a	$4,19 \pm 1,27$ bcd
Metaflumizona	240	$7,45 \pm 4,70$ a	$8,19 \pm 2,62$ d
Metoxifenocida	96	$5,66 \pm 3,90$ a	$1,71 \pm 1,27$ abc
Spiromesifen	144	$19,19 \pm 10,61$ a	0 ± 0 a
Spirotetramat	75	$15,96 \pm 9,46$ a	$2,23 \pm 1,92$ abcd
Spinosad	120	$8,84 \pm 3,40$ a	$3,42 \pm 3,42$ abc
Sulfoxaflor	60	$15,05 \pm 10,24$ a	$1,41 \pm 0,66$ abc
<i>F</i> (g.l.) o <i>H</i>	-	0,73 (10, 41)	2,75 (10, 40)
<i>P</i>	-	0,6957	0,011

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). *Cambio de variable ($y = \arcsen(\sqrt{x/100})$) para cumplir homocedasticidad. ^aFecundidad: Número de huevos puestos por hembra de *A. swirskii* y semana. ^bFertilidad: Porcentaje de huevos eclosados respecto al total de puestos por hembra de *A. swirskii* y semana.

Tabla 22: Clasificación OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado y clasificación final, tras el tratamiento directo de los huevos de *A. swirskii* con los mismos.

Tratamientos	Concentración (mg i.a./l)	Eclosión ^a	Mortalidad Ninfas ^a	Fecundidad ^a	Fertilidad ^a	Clase Final OILB ^b
Abamectina	18	1	1	1	1	1
Deltametrina	12,45	1	1	1	1	1
Enamectina	12,83	1	1	1	1	1
Flonicamida	60	1	1	1	1	1
Flubendiamida	60	1	1	1	1	1
Metaflumizona	240	1	1	1	1	1
Metoxifenocida	96	1	1	1	1	1
Spiromesifen	144	1	1	1	1	1
Spirotetramat	75	2	1	1	1	2
Spinosad	120	1	1	1	1	1
Sulfoxaflor	60	1	1	1	1	1

^aCategorías toxicológicas de la OILB en laboratorio: 1=inocuo (reducción<30%), 2=ligeramente tóxico (reducción 30-79%), 3=moderadamente tóxico (reducción 80-99%) y 4=tóxico (reducción>99%). ^bClase Final OILB: clasificación más desfavorable entre los parámetros estudiados.

4.4.2.2. Contacto residual sobre placas de cristal con el estado adulto

En la **Figuras 42**, la **Tabla 23** y la **Figura 43**, se muestran los distintos resultados obtenidos al exponer durante 72 horas a los adultos de *A. swirskii* a los distintos insecticidas ensayados. En la **Tabla 24** se muestran las categorías OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado, así como su clasificación final.

La **Figura 42** muestra el incremento en la mortalidad de los adultos de *A. swirskii* tras su exposición continuada a los residuos frescos de los insecticidas durante 72 horas ($F=170,51$; $g.l.=10, 48$; $P<0,0001$). En los controles la mortalidad media fue del $5,0 \pm 1,58$ y $3,06 \pm 1,25\%$, respectivamente. La exposición de los adultos de dicho fitoseido a residuos de abamectina, deltametrina, emamectina, spiromesifen, spirotetramat, spinosad y sulfoxaflor, causó un incremento significativo de la mortalidad entre el $9,59 \pm 1,29\%$, en spirotetramat, al $89,39 \pm 3,68\%$, en spinosad. A pesar de estas diferencias

significativas, tan sólo abamectina, deltametrina, emamectina y spinosad recibieron una categoría OILB distinta de 1 (inocuo), al superar el 30% respecto al control. Los insecticidas abamectina, deltametrina y emamectina fueron clasificados como ligeramente tóxicos (OILB 2) y spinosad, como moderadamente tóxico (OILB 3) (Tabla 24).

Figura 42: Incremento de la mortalidad (%) de los adultos de *A. swirskii* cuando los ácaros fueron expuestos durante 72 horas a los residuos frescos de los insecticidas evaluados. *Los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

La **Tabla 23** muestra la reducción en los parámetros reproductivos evaluados (fecundidad y fertilidad). En los controles, el número de huevos puestos por hembra de *A. swirskii* y semana fue $4,32 \pm 0,35$ y $4,48 \pm 0,30$, respectivamente, y la fertilidad en ambos casos fue del 100%. No se observaron diferencias significativas en la fertilidad de los ácaros expuestos a los residuos insecticidas estudiados, pero si reducciones significativas de la fecundidad en abamectina, deltametrina, emamectina y spiromesifen. Emamectina, al reducir la fecundidad más de un 30%, fue clasificada como ligeramente tóxica (OILB 2), y abamectina y deltametrina, al reducirla un 100%, como tóxicas (OILB 4) (Tabla 24).

Tabla 23: Reducción de la fecundidad y fertilidad (%) de las hembras de *A. swirskii* cuando fueron expuestas durante 72 horas a los insecticidas evaluados por contacto residual.

Tratamientos	Concentración (mg i.a./l)	Reducción de la fecundidad ^a (%)*	Reducción de la fertilidad ^b (%)
Abamectina	18	100 ± 0 d	-
Deltametrina	12,45	100 ± 0 d	-
Emamectina	12,83	70,3 ± 9,26 c	0 ± 0 a
Flonicamida	60	11,11 ± 4,73 a	0 ± 0 a
Flubendiamida	60	11,18 ± 3,93 ab	0 ± 0 a
Metaflumizona	240	11,87 ± 3,31 ab	1,49 ± 1,02 a
Metoxifenocida	96	16,78 ± 4,59 ab	0 ± 0 a
Spiromesifen	144	22,17 ± 5,40 b	0 ± 0 a
Spirotetramat	75	17,74 ± 3,44 ab	0 ± 0 a
Sulfoxaflor	60	8,88 ± 3,41 a	0,68 ± 0,68 a
<i>F</i> (g.l.) o <i>H</i>	-	41,80 (9, 83)	10,26 (7, 70)
<i>P</i>	-	< 0,0001	0,1742

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). *Cambio de variable ($y = \arcsen(\sqrt{x/100})$) para cumplir homocedasticidad. ^aFecundidad: Número de huevos puestos por hembra de *A. swirskii* y semana. ^bFertilidad: Porcentaje de huevos eclosados respecto al total de puestos por hembra de *A. swirskii* y semana.

En la **Figura 43** se presentan los valores corregidos de la mortalidad de los ácaros durante la semana de evaluación de los parámetros reproductivos ($F=58,03$; g.l.=9, 83; $P < 0,0001$). La mortalidad media de los ácaros durante dicha semana en los controles, fue del $27,5 \pm 8,70$ y $17,5 \pm 5,3\%$, respectivamente. En los distintos tratamientos, la mortalidad se incrementó del $1,82 \pm 1,21\%$ en flubendiamida, al 100% en abamectina. Tan solo tres insecticidas recibieron una categoría toxicológica distinta de 1 (inocuo): emamectina (ligeramente tóxica, OILB 2), deltametrina (moderadamente tóxica, OILB 3) y abamectina (tóxica, OILB 4) (**Tabla 24**).

Figura 43: Incremento de la mortalidad de los adultos de *A. swirskii* a los 7 días del fin de la exposición a los residuos frescos insecticidas. *Los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

Tabla 24: Clasificación OILB de los insecticidas para cada parámetro evaluado tras la exposición de los adultos de *A. swirskii* a residuos frescos de los insecticidas y clasificación final de los mismos.

Tratamientos	Concentración (mg i.a./l)	Mortalidad 72 h ^a	Fecundidad ^a	Fertilidad ^a	Mortalidad 7d después de la exposición ^a	Clase Final OILB ^b
Abamectina	18	2	4	-	4	4
Deltametrina	12,45	2	4	-	3	4
Emamectina	12,83	2	2	1	2	2
Flonicamida	60	1	1	1	1	1
Flubendiamida	60	1	1	1	1	1
Metaflumizona	240	1	1	1	1	1
Metoxifenocida	96	1	1	1	1	1
Spiromesifen	144	1	1	1	1	1
Spirotetramat	75	1	1	1	1	1
Spinosad	120	3	-	-	-	4
Sulfoxaflor	60	1	1	1	1	1

^aCategorías toxicológicas de la OILB en laboratorio: 1=inocuo (reducción<30%), 2=ligeramente tóxico (reducción 30-79%), 3=moderadamente tóxico (reducción 80-99%) y 4=tóxico (reducción>99%). ^bClase Final OILB: clasificación más desfavorable entre los parámetros estudiados.

4.4.2.3. Persistencia

En la **Tabla 25** se muestran los datos referentes a la mortalidad y a los parámetros reproductivos de los adultos de *A. swirskii*, tras su exposición durante 72 horas a residuos insecticidas de 0, 4 y 10 días de edad sobre hojas de pimiento, envejecidos en invernadero.

En los adultos de *A. swirskii*, los residuos frescos (0 días de edad) de todos los insecticidas evaluados, salvo spinosad, causaron una toxicidad similar a la observada en los ensayos de contacto residual en laboratorio. El residuo de 0 días de spinosad fue tóxico para los adultos de esta especie de ácaro, sin embargo, dicha mortalidad fue un 43% inferior a la registrada en el ensayo de contacto residual en laboratorio.

El residuo de 4 días de emamectina causó una mortalidad significativamente igual a la del testigo y no produjo efectos subletales, por lo que el insecticida fue clasificado como poco persistentes (OILB A).

El resto de tratamientos (abamectina, deltametrina y spinosad) perdieron su actividad tóxica a los 10 días. Estos plaguicidas produjeron una mortalidad significativamente mayor a la del control, pero ésta nunca superó el 25%, siendo por tanto clasificados como inócuos (OILB 1). Además, la fecundidad y la fertilidad en estos tratamientos fue significativamente igual a la del control. Por ello, estos tres insecticidas fueron clasificados como ligeramente persistente (OILB B).

Tabla 25: Mortalidad media de los adultos de *A. swirskii* tras ser expuestos durante 72 horas a los residuos insecticidas de 0, 4 y 10 días de edad sobre hojas de pimienta y fecundidad y fertilidad de las hembras supervivientes.

Tratamiento	Concentración (mg i.a./l)	0 DDT ^a		4 DDT ^a		10 DDT ^a			Categoría OILB ^d
		Mortalidad a las 72 h (%)	Mortalidad a las 72 h (%)	Fecundidad ^b	Fertilidad ^c (%)	Mortalidad a las 72 h (%)	Fecundidad ^b	Fertilidad ^c (%)	
Control	-	3,06 ± 1,25 a	5,02 ± 2,19 a	3,06 ± 0,24 a	97,01 ± 1,99 a	8 ± 2,55 a	3,11 ± 0,20 a	98,9 ± 1,1 a	-
Abamectina	18	59,0 ± 1,87 d	53 ± 3,74 c	-	-	25 ± 2,74 b	2,98 ± 0,18 a	96,67 ± 2,21 a	B
Deltametrina	12,45	42,19 ± 2,63 c	41,57 ± 3,68 b	-	-	17 ± 3,39 b	2,99 ± 0,16 a	100 ± 0 a	B
Emamectina	12,83	31,42 ± 3,25 b	10,86 ± 1,80 a	2,93 ± 0,29 a	96,13 ± 2,03 a	-	-	-	A
Spinosad	120	48,0 ± 2,55 c	50 ± 3,54 bc	-	-	24,21 ± 1,77 b	3,03 ± 0,20 a	97,96 ± 2,03 a	B
<i>F</i> (g.l.) o <i>H</i>	-	78,16 (4,20)	52,84 (4,20)	0,12 (1,18)	0,16 (1,18)	8,73 (3, 16)	0,10 (3, 35)	2,01 (3,35)	-
<i>P</i>	-	< 0,0001	< 0,0001	0,7278	0,6911	0,0012	0,9593	0,5695	-

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aDDT: Días después del tratamiento.

^bFecundidad: Número de huevos puestos por hembra de *A. swirskii* y semana. ^cFertilidad: Porcentaje de huevos eclosados respecto al total de puestos por hembra de *A. swirskii* y semana. ^dCategorías toxicológicas de la OILB para persistencia: Poco persistente (<5 días): A, Ligeramente persistente (5-15 días): B, Moderadamente persistente (16-30 días): C, Persistente (>30 días): D.

4.5. Discusión

4.5.1. *Eretmocerus mundus*

Sólo cuatro de los once insecticidas estudiados (flonicamida, flubendiamida, metoxifenocida y spiromesifen) fueron compatibles con los dos estados de desarrollo de *E. mundus* estudiados, la pupa y el adulto, siendo clasificados como inócuos (OILB 1). El resto de insecticidas mostraron efectos deletéreos en uno o en ambos estados de desarrollo del parasitoide.

La flonicamida, a pesar de ser inocua (OILB 1) para *E. mundus*, incrementó significativamente la mortalidad de los adultos emergidos de pupas tratadas, así como la de los expuestos a los residuos insecticidas durante 72 horas. Según nuestro conocimiento, tan sólo hay un estudio disponible (Moens *et al.*, 2012) sobre la susceptibilidad de un parasitoide a este nuevo insecticida. En dicho estudio, y en contraste con nuestros hallazgos, se observó que la flonicamida, a una dosis de 80 g i.a. ha⁻¹, producía una mortalidad de las pupas tratadas de *Microplitis mediator* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) superior al 20%, así como una reducción de la capacidad de parasitación de los adultos expuestos por contacto a los residuos insecticidas. Sin embargo, y en conformidad con los resultados obtenidos en el presente trabajo, estudios realizados por Thomazoni y colaboradores (2009) con *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), mostraron que la exposición a esta piridinacarboxamida, a una dosis de 75 g i.a./ha, podía ocasionar una mortalidad directa de los adultos.

La flubendiamida, debido a la alta especificidad en su modo de acción, es un insecticida selectivo para los enemigos naturales. Tohnishi y colaboradores (2005), corroboraron la compatibilidad de dicho insecticida con parasitoides como *E. formosa*, *A. colemani* y *Cotesia glomerata* (L.) (Hymenoptera: Braconidae), estando las concentraciones efectivas 30 (CE₃₀) comprendidas entre 100 y 400 mg i.a./l, valores superiores al usado en el presente trabajo (60 mg i.a./l). En nuestro estudio, el insecticida fue inocuo para *E. mundus*, a pesar de que se detectó una reducción significativa en la capacidad de parasitación de las hembras expuestas a residuos frescos durante 72 horas.

El metoxifenocida fue selectivo para los dos estados de desarrollo de *E. mundus* estudiados. Este insecticida posee un modo de acción muy específico, acelerando la muda sobre todo en lepidópteros, lo que le hace presumiblemente compatible con los enemigos naturales (Carlson *et al.*, 2001; Smagghe *et al.*, 2013). En base a la bibliografía este insecticida es compatible con enemigos naturales diversos, como *Amblyseius californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae), *E. formosa*, *M. pygmaeus*, *O. laevigatus*, *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Hyposoter didymator* (Thunberg) (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Hewa-Kapuge *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2003; van de Veire & Tirry, 2003).

Otro insecticida que resultó compatible con ambos estados de desarrollo de la especie de parasitoide estudiado, fue el spiromesifen. En línea con nuestros resultados, Bielza y colaboradores (2009), en ensayos de laboratorio y campo, observaron que el spiromesifen, aplicado sobre plantas de pimiento a la misma dosis empleada en nuestro trabajo (144 mg i.a./l), no afectaba a la mortalidad de los adultos de *E. mundus* expuestos a los residuos, ni a la actividad de los mismos en campo. Sin embargo, nuestros resultados muestran una reducción significativa de la capacidad de parasitación de las hembras emergidas de pupas tratadas. Dicho efecto subletal, puede ser explicado por una contaminación oral con el insecticida por parte de los adultos de *E. mundus* al emerger, ya que, como observaron Liu y colaboradores (2012), la ingestión de spiromesifen por parte de las hembras de *Tamarixia triozae* (Burks) (Hymenoptera: Eulophidae), producía ese mismo efecto.

La metaflumizona, a pesar de ser selectiva para las pupas de *E. mundus*, produjo efectos deletéreos en los adultos del parasitoide tras ser expuestos a los residuos frescos de dicho insecticida. En los ensayos de contacto residual, fue categorizada como ligeramente tóxica (OILB 2), al incrementar significativamente la mortalidad a las 72 horas del inicio del ensayo. Estos resultados coinciden con los hallazgos hechos por Gradish y colaboradores (2011) en la especie cercana *E. eremicus*, a una concentración dos veces menor a la usada en nuestro estudio.

El spirotetramat, insecticida perteneciente a la misma familia química que el spiromesifen, es considerado un producto de una gran selectividad. Esta gran especificidad está avalada por numerosos estudios de campo y semicampo realizados

con diversas especies de enemigos naturales como, *Aphelinus mali* (Haldeman) (Hymenoptera: Aphelinidae), *Aphytis lingnanensis* Compere (Hymenoptera: Aphelinidae), *Coccidoxenoides spp.* (Hymenoptera: Encyrtidae), *Trichogramma cryptophlebiae* Nagaraja (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y *Aphidoletes spp.* (Diptera: Cecidomyiidae) (Schnorbach *et al.*, 2008; Brück *et al.*, 2009). Las condiciones de laboratorio son, sin embargo, más restrictivas que las de campo y semicampo, y por ello, en nuestro trabajo, se observó un incremento significativo de la mortalidad de los adultos de *E. mundus* expuestos a los residuos de spirotetramat, que llevó a que fuese clasificado como ligeramente tóxico (OILB 2). A pesar de dicho efecto deletero sobre los adultos del parasitoide, el spirotetramat fue inocuo para las pupas de *E. mundus*.

La abamectina, la deltametrina y la emamectina no fueron selectivas para dicha especie de parasitoide, siendo su categoría toxicológica final, OILB 2 (ligeramente tóxicos).

La abamectina redujo significativamente la emergencia de los adultos cuando las pupas fueron tratadas con dicho producto. La edad de la momia de *E. mundus* usada durante el tratamiento insecticida influye en su susceptibilidad, ya que los adultos suelen contaminarse oralmente con el insecticida al salir del pupario, y si la aplicación del insecticida se ha hecho en estadios más jóvenes, éste se puede degradar parcialmente y no afectar de la misma manera al adulto emergente. Estudios previos de nuestro grupo (Fernández *et al.*, 2010a), confirmaron lo anteriormente expuesto, ya que el tratamiento de momias jóvenes de *E. mundus* (sin ojos formados) con abamectina, no afectó a la emergencia de los mismos. Sin embargo, cuando en el presente trabajo, prepupas (ojos rojos formados) y pupas de *E. mundus* fueron pulverizadas directamente con abamectina, la emergencia se vio afectada. Por otro lado y a pesar de la alta mortalidad observada durante la emergencia, la mortalidad de los adultos 72 horas después de la emergencia no se vio afectada, aunque sí se observó una reducción significativa de su capacidad de parasitación. Los adultos de esta especie de parasitoide también exhibieron una alta sensibilidad a los residuos frescos de abamectina, incrementando significativamente su mortalidad y reduciendo su capacidad de parasitación. Otros parasitoides son afectados de manera análoga por este insecticida, como mostraron Kumar y colaboradores (2008), que observaron que al tratar larvas y pupas de

Eretmocerus warrae Naumann & Schmidt (Hymenoptera: Aphelinidae) con dosis de abamectina comprendidas entre 36-72 mg i.a./l, superiores a la usada en nuestro estudio (18 mg i.a./l), la emergencia de los adultos se reducía significativamente. Tzeng and Kao (1999) mostraron igualmente, que residuos frescos de abamectina, incrementaban la mortalidad y reducían la capacidad de parasitación de los adultos de *Eretmocerus orientalis* Silvestri *Eretmocerus warrae* Naumann & Schmidt (Hymenoptera: Aphelinidae).

El piretroide sintético deltametrina incrementó significativamente la mortalidad de los adultos emergidos de pupas tratadas y la de los adultos expuestos durante 72 horas a los residuos frescos. Además, la capacidad de parasitación de los adultos en ambos tipos de ensayos se vio reducida. Tzeng and Kao (1995) obtuvieron valores semejantes de mortalidad en adultos de *E. orientalis* y *Encarsia transvena* (Timberlake) (Hymenoptera: Aphelinidae) expuestos a residuos insecticidas y de esperanza de vida de los parasitoides emergidos de pupas tratadas. Sin embargo, y en contraste con los hallazgos de estos autores, la emergencia de *E. mundus* en nuestro trabajo no se vio afectada. Por tanto, especies próximas pueden tener un comportamiento totalmente opuesto frente a un mismo insecticida, poniendo de manifiesto que los estudios toxicológicos hay que realizarlos caso por caso.

La emamectina produjo en *E. mundus* unos efectos tóxicos análogos a los producidos por la abamectina, a pesar de que la toxicidad de esta última sobre el parasitoide fue mayor. Sugiyama y colaboradores (2011) pusieron de manifiesto la toxicidad de la emamectina en pupas y adultos de *E. mundus*, *E. eremicus* y *E. formosa*, al incrementar la mortalidad de las pupas y reducir la longevidad de los adultos, lo que corrobora los hallazgos obtenidos en el presente trabajo. A pesar de los efectos nocivos de la emamectina descritos en ensayos de laboratorio, estudios llevados a cabo bajo condiciones más reales, en invernaderos comerciales, mostraron la compatibilidad de la emamectina con *E. mundus* (Bengochea *et al.*, 2012).

Los insecticidas más tóxicos (OILB 4) tanto para los adultos como para las pupas de *E. mundus*, fueron el spinosad y el sulfoxaflor. Ambos pesticidas exhibieron una alta toxicidad directa, reduciendo significativamente la emergencia y la esperanza de vida de

los adultos emergidos de pupas tratadas e incrementando la mortalidad de los insectos expuestos a los residuos insecticidas.

El spinosad es un producto altamente tóxico para la mayoría de los parasitoides del género Himenoptera (Biondi *et al.*, 2012). Como era de esperar, este producto mató al 100% de los adultos de *E. mundus* y al 97,24% de las pupas tratadas y, además, los pocos insectos que fueron capaces de abandonar el pupario murieron a los 3 días de la emergencia. Nuestros hallazgos coinciden con los resultados obtenidos por Kumar *et al.* (2008) y Sugiyama *et al.* (2011), quienes observaron que el tratamiento de pupas y larvas de *E. warrae* con spinosad, reducía la emergencia y la longevidad de los adultos, y que la exposición a residuos frescos de dicho insecticida, producía una rápida mortalidad de los adultos y pupas de *E. mundus*.

Existe poca información disponible sobre los efectos del sulfoxaflor en enemigos naturales. Basándonos en resultados de nuestro grupo, el sulfoxaflor puede ser definido como un insecticida poco selectivo al producir una alta mortalidad de los adultos de distintas especies de enemigos naturales como *A. ervi*, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae), *M. pygmaeus* y *O. laevigatus* (100%, 56,67%, 74,33% y 100%, respectivamente), tras la exposición de los mismos a residuos frescos (Manzanares, 2012; Olivares, 2012; Guisado, 2014; Garzón *et al.*, 2015a).

En cuanto a los ensayos de persistencia, sólo dos de los productos que resultaron tóxicos en los ensayos de laboratorio, la metaflumizona y el spirotetramat, resultaron ser poco persistentes (OILB A) y por tanto, compatibles con *E. mundus*.

No hay información bibliográfica disponible sobre la duración de la toxicidad de los residuos de metaflumizona en insectos, pero se sabe que este insecticida posee una hidrólisis rápida en agua y una fácil degradación bajo luz solar (Takagi *et al.*, 2007), lo cual puede explicar los resultados obtenidos, ya que los ensayos se llevaron a cabo en verano, cuando la intensidad lumínica era elevada.

En cuanto al spirotetramat, conforme a los resultados obtenidos en este trabajo, Schnorbach y colaboradores (2008), en ensayos de semicampo, observaron que cuando adultos de *A. lingnanensis* eran expuestos durante 24 horas a residuos de 1 día de edad,

resultaba ser ligeramente tóxico para los parasitoides, mientras que cuando eran expuestos a residuos de 7 días, el insecticida perdía su actividad tóxica inicial.

El resto de insecticidas evaluados no fueron compatibles con dicha especie de parasitoide, necesitando distintos periodos de tiempo para disminuir su toxicidad sobre los mismos.

La emamectina fue clasificada como ligeramente persistente (OILB B). Existe información contradictoria sobre la duración de la actividad tóxica de dicho insecticida, probablemente debido a las diferentes condiciones climatológicas bajo las cuales se llevaron a cabo los ensayos, al tipo de planta tratada y/o a las especies de insectos expuestas a los residuos. En ensayos llevados a cabo en invernaderos comerciales de pimiento, situados en Murcia, la emamectina no afectó a las poblaciones establecidas de *E. mundus* (Bengochea *et al.*, 2012). Sin embargo, en nuestros ensayos, principalmente debido a que la intensidad lumínica y la radiación UV son menores en Madrid que en el Mediterráneo y a que la exposición a los residuos insecticidas en condiciones de laboratorio, fuerza el contacto de los insectos con los mismos al proporcionar una cantidad menor de refugios que en campo, el residuo de 4 días de edad de emamectina siguió siendo tóxico para los parasitoides, mientras que el de 10 días perdió su actividad tóxica. Para otra especie de parasitoide, *Trichogramma chilonis* (Ishii) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), la emamectina, aplicada sobre plantas de tomate, tuvo una actividad residual más prolongada (OILB C, moderadamente persistente) que para *E. mundus* (Sattar *et al.*, 2011).

La abamectina y la deltametrina fueron clasificadas como moderadamente persistentes (OILB C), y el spinosad y el sulfoxaflor, resultaron ser los insecticidas más persistentes (OILB D), cuya actividad tóxica duró más de 30 días. Debido a que la principal vía de degradación de la abamectina y el spinosad es la fotólisis, la selectividad de estos insecticidas varía en función de la cantidad de radiación a la que estén sometidas las plantas tratadas. Van de Veire y colaboradores (2004), corroboraron lo anteriormente expuesto, al realizar estudios de persistencia con el parasitoide *E. formosa*, en distintas localizaciones geográficas y épocas del año. La deltametrina, al igual que en nuestro estudio, también presenta una actividad persistente o

moderadamente persistente sobre otra especie de himenóptero, la *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Hassan, 1998).

En ensayos llevados a cabo por nuestro grupo, el sulfoxaflor fue también clasificado como persistente (OILB D) para adultos de *O. laevigatus* y como moderadamente persistente (OILB C), para *A. ervi*, cuando los residuos insecticidas fueron envejecidos sobre plantas de tomate, en invernaderos localizados en la comunidad de Madrid (Manzanares, 2012; Olivares, 2012).

4.5.2. *Amblyseius swirskii*

Seis de los once insecticidas estudiados (flonicamida, flubendiamida, metaflumizona, metoxifenocida, spiromesifen y sulfoxaflor) fueron compatibles con los dos estados de desarrollo de *A. swirskii* estudiados, el huevo y el adulto, siendo clasificados como inócuos (OILB 1). El resto de insecticidas mostraron efectos deletéreos en alguno de los estados de desarrollo del ácaro depredador.

La flonicamida, a pesar de ser inocua para *A. swirskii*, redujo significativamente la fertilidad de las hembras procedentes de huevos tratados. Este efecto en la fertilidad también fue el único efecto negativo detectado por Moens *et al.* (2011), en larvas de *Episyrphus balteatus* (Degeer) (Diptera: Syrphidae), pues el contacto con residuos frescos de este insecticida no afectaba ni a la mortalidad de los estadios juveniles ni a la posterior fecundidad de las hembras, pero sin embargo sí afectaba a fertilidad de los huevos. En cuanto a la toxicidad de la flonicamida en los adultos de *A. swirskii*, Roditakis y colaboradores (2014), en ensayos de laboratorio, al tratar los adultos con una dosis de 125 mg i.a./l (superior a la usada en nuestro trabajo), también clasificaron a dicho insecticida como inocuo, al producir una mortalidad menor al 30%. Estos autores además detectaron una reducción del 36% de la fecundidad de las hembras tratadas. Este efecto subletal, no observado en nuestro estudio, puede deberse a que el modo de exposición al insecticida fue distinto en ambos ensayos y a que además, el insecticida se aplicó a una dosis dos veces mayor a la empleada en nuestro caso. Más acorde con nuestros resultados, Colomer y colaboradores (2011) demostraron la compatibilidad de la flonicamida (100 mg i.a./l) con poblaciones establecidas de *A. swirskii* sobre pimiento, en ensayos de campo.

La flubendiamida fue inocua para *A. swirskii*. Este insecticida es muy selectivo para los enemigos naturales en base a la bibliografía revisada. Tohnishi y colaboradores (2005), corroboraron la compatibilidad de dicho insecticida con ácaros depredadores como *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) y *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), siendo sus concentraciones efectivas 30 (CE₃₀) de 200 mg i.a./l, valor superior al usado en el presente trabajo (60 mg i.a./l). Estudios llevados a cabo por Lefebvre y colaboradores (2011 y 2012) y Beers & Schmidt (2014), ponen de manifiesto la compatibilidad de este insecticida a dosis comprendidas entre 19 y 987,4 mg i.a. l⁻¹, con todos los estados de desarrollo de los ácaros depredadores *Amblyseius fallacis* (Garman) y *Typhlodromus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae).

La metaflumizona, aunque fue inocua para *A. swirskii*, produjo un incremento significativo de la mortalidad de las ninfas y una reducción de fertilidad de las hembras procedentes de huevos tratados. Dichos efectos subletales podrían deberse a una contaminación con el insecticida por parte de las larvas de *A. swirskii* durante la eclosión de los huevos, ya que como Döker y colaboradores (2014) pusieron de manifiesto, este insecticida, a pesar de inocuo para los adultos, es tóxico para las larvas de *Iphiseius degenerans* (Berlese) (Acari: Phytoseiidae). En nuestro trabajo, aunque la metaflumizona produjo un incremento en la mortalidad de los adultos a los 7 días del fin de la exposición al insecticida, fue inocua para los adultos de *A. swirskii*, pues no superó el 30%. Este resultado coincide con los hallazgos hechos por Gradish *et al.* (2011), tras exponer a los adultos de *A. swirskii* a dosis de 69 y 138 mg i.a./l, inferiores a la usada en nuestro estudio.

Como se ha citado anteriormente, y al igual que en el caso de la flubendiamida, el metoxifenocida, al poseer un modo de acción específico, es selectivo para una gran variedad de enemigos naturales (Carlson *et al.*, 2001; Smagghe *et al.*, 2013). En nuestro trabajo, el metoxifenocida fue inocuo para ambos estados de desarrollo de *A. swirskii* estudiados. La compatibilidad de este insecticida con los ácaros depredadores *A. swirskii*, *A. californicus*, *A. fallacis*, *Galendromus occidentalis* (Nesbitt) y *Kampimodromus aberrans* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae), ha sido corroborada por un gran número de autores (van de Veire & Tirry, 2003; Bostanian *et al.*, 2010; Colomer *et al.*, 2011; Tirello *et al.*, 2013).

Aunque el spiromesifen fue inocuo tanto para los huevos como para los adultos de *A. swirskii*, produjo un incremento de la mortalidad de los estadios ninfales y de los adultos. La susceptibilidad de los ácaros depredadores a este insecticida-acaricida es muy variable y, como afirman Cloyd y colaboradores (2006), puede deberse a las distintas características fisiológicas de los ácaros y/o a hábitos de comportamiento. Cheon y colaboradores (2008) clasificaron a dicho insecticida como inócuo para *Neoseiulus womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae), al observar que la supervivencia de las hembras tratadas con 100 mg i.a./l no se veía afectada durante ninguno de los periodos de observación realizados, llevados a cabo a las 24, 72, 120 y 168 horas del tratamiento. Por otro lado, estudios llevados a cabo por Cloyd y colaboradores (2006) ponen de manifiesto que dicho insecticida a dosis de 15 y 31 ml p.c./l, es tóxico para *P. persimilis* e inocuo para *A. californicus*. Además, en nuestro estudio también pudimos observar una reducción en la fecundidad de las hembras expuestas a los residuos insecticidas durante 72 horas. Estos resultados coinciden con los hallazgos hechos por Sáenz De Cabezón & Zalom (2007), quienes al exponer a hembras de *G. occidentalis* a residuos frescos de spiromesifen, a una dosis de 76,2 mg i.a./l, observaron que a pesar de que la fertilidad de dichas hembras no se veía afectada, la fecundidad de las mismas se reducía significativamente.

El sulfoxaflor fue compatible con los estados de desarrollo de *A. swirskii* estudiados. Como ya se ha indicado anteriormente al discutir los resultados obtenidos en *E. mundus*, existe poca información disponible sobre los efectos del sulfoxaflor en enemigos naturales. Resultados de toxicidad similares a los obtenidos en el presente trabajo con el estado de desarrollo más protegido, fueron obtenidos por Garzón y colaboradores (2015a), en dos especies de depredadores, *C. carnea* y *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). Nuestros resultados también muestran un incremento significativo de la mortalidad de los ácaros adultos tras 72 horas de exposición a los residuos frescos de este insecticida. Este incremento de la mortalidad, aunque de menor grado en el caso de *A. swirskii*, también ha sido observado en diversos estudios realizados por nuestro grupo con distintas especies de enemigos naturales como, *A. ervi*, *C. carnea*, *M. pygmaeus* y *O. laevigatus* (Manzanares, 2012; Olivares, 2012; Guisado, 2014; Garzón *et al.*, 2015a).

El spirotetramat fue el único insecticida que presentó cierta toxicidad sobre el estado más protegido de la especie de fitoseido estudiado (OILB 2). El tratamiento de huevos de *A. swirskii* con este insecticida produjo una reducción significativa en la eclosión y un incremento de la mortalidad de los estadios ninfales. Corroborando nuestros resultados, Lefebvre y colaboradores (2011 y 2012) observaron este mismo efecto ovicida al tratar huevos de dos especies de fitoseidos, *A. fallacis* y *G. occidentalis*, con dosis de 228 y 174 mg ia l⁻¹, respectivamente. Estos mismos autores comprobaron que el tratamiento directo con spirotetramat de los estadios ninfales de dichas especies de ácaros, era tóxico para los mismos. Dicho efecto sobre la mortalidad juvenil, puede explicar los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que las larvas de *A. swirskii* pudieron contaminarse con los residuos insecticidas al abandonar el huevo tratado. En cuanto a la toxicidad de este insecticida sobre el estado adulto, Beers y colaboradores (2014), usando dosis de spirotetramat de 164 y 328 mg i.a./l, vieron que la mortalidad de los adultos de *G. occidentalis* tratados junto con su sustrato, no se incrementaba significativamente a la dosis inferior, pero sí lo hacía con la superior. De modo que, teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que los adultos de *A. swirskii* son más sensibles a este insecticida, ya que con el uso de una dosis inferior (75 mg i.a./l) a la de Beers y colaboradores (2014), la mortalidad se incrementó significativamente tras 72 horas de exposición a los residuos frescos.

La abamectina y la deltametrina fueron selectivas para el estado de huevo (OILB 1, inocuo), sin embargo no lo fueron para los adultos de dicha especie de fitoseido, siendo su categoría toxicológica final, OILB 4 (tóxicos). En ambos casos, los insecticidas incrementaron significativamente la mortalidad de los adultos tras 72 horas de contacto. Los ácaros supervivientes a dicho contacto se vieron afectados internamente, de manera que la movilidad de los mismos era nula. Esta alteración se vio confirmada a lo largo de la evaluación de los parámetros reproductivos, ya que la fecundidad de las hembras se redujo un 100% y la mortalidad de los ácaros durante ese periodo fue del 100% en la abamectina y del 95,03% en la deltametrina.

Como varios autores han puesto de manifiesto en sus estudios, la abamectina parece afectar muy severamente a los ácaros de la familia Phytoseiidae. Al igual que en nuestro trabajo, este compuesto fue clasificado como tóxico (OILB 4) al incrementar la

mortalidad y disminuir la fecundidad y la esperanza de vida, en ensayos de laboratorio, del ácaro depredador *P. persimilis* y de varias especies del género *Amblyseius*, tales como *A. cucumeris*, *A. fallacis* y *Amblyseius degenerans* Berlese (Sterk *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Bostanian & Akalach, 2006; Gentz *et al.*, 2010). En cuanto a la capacidad ovicida de este insecticida, en la bibliografía no hay estudios centrados en ácaros beneficiosos, sin embargo Ismail y colaboradores (2007), corroboran los resultados obtenidos en el presente trabajo, al observar que la abamectina, a la misma dosis que la empleada en nuestro estudio (18 mg i.a./l), no afectaba a la eclosión de los huevos tratados del ácaro fitófago *T. urticae*.

La deltametrina, al ser un insecticida de amplio espectro, es tóxica para una amplia gama de enemigos naturales, entre los que se incluyen ácaros depredadores (Jansen, 2010). En línea con nuestros resultados, Bonafos y colaboradores (2007), en ensayos de laboratorio, observaron que la deltametrina, aplicada sobre plantas de judía y adultos de *Amblyseius andersoni* (Chant) (Acari: Phytoseiidae), a una dosis superior a la nuestra (17,5 mg ia l⁻¹), producía la mortalidad del 100% de los individuos a las 72 horas del tratamiento. De igual manera, Rodrigues y colaboradores (2002), en ensayos de campo llevados a cabo en manzano, con una dosis de deltametrina de 0,3 l pc ha⁻¹, clasificaron este compuesto como tóxico (OILB 4), al reducir significativamente las poblaciones establecidas de los fitoseidos *Amblyseius barkeri* Hughes, *Euseius stipulatus* (Athias-Henriot), *E. finlandicus* (Oudemans) y *Typhlodromus pyri* Scheuten. En nuestro estudio, a pesar de que la deltametrina fue clasificada como inócua para el estado de huevo de *A. swirskii*, se observó una reducción significativa de la eclosión de los mismos. Como en el caso de la abamectina, tan solo hay información relativa al efecto ovicida de este insecticida en el ácaro tetránquido *T. urticae*. Al igual que en nuestro trabajo, Nauen *et al.* (2001) observaron un efecto ovicida de la deltametrina al tratar los huevos de dicha especie de tetránquido a una dosis de 15 mg i.a./l (concentración letal 50, CL₅₀).

Como los insecticidas anteriores, la emamectina fue selectiva para el estado de huevo de *A. swirskii* (OILB 1, inocuo) y ligeramente tóxica (OILB 2), para el estado adulto. El contacto directo de los adultos de *A. swirskii* con residuos frescos de emamectina, redujo significativamente la fecundidad de las hembras e incrementó la mortalidad tras 72 horas de contacto con los mismos y la mortalidad a los 7 días del fin

de dicha exposición al insecticida. Existe poca información disponible sobre los efectos de la emamectina en ácaros depredadores. Resultados de toxicidad similares a los obtenidos en el presente trabajo, fueron reportados por Amor y colaboradores (2012), en ensayos de campo llevados a cabo en pimiento, empleando una dosis de 14,25 mg i.a./l, ligeramente superior a la empleada en nuestro estudio. Otras especies de fitoseidos son afectados de manera análoga por este insecticida, como observaron Kim y colaboradores (2008) con *A. cucumeris*, y Bernard y colaboradores (2010) con *Euseius victoriensis* (Womersley). En nuestro trabajo, la emamectina produjo una reducción significativa de la eclosión de los huevos tratados, así como un incremento de la mortalidad de las ninfas. Debido a que este insecticida está indicado para el control de lepidópteros, el efecto ovicida del mismo solo está citado en dicho orden, sin embargo, como se ha citado anteriormente, la emamectina parece afectar a los estados protegidos de otras especies de enemigos naturales, como es el caso de varias especies de parasitoides (Sugiyama *et al.*, 2011).

El spinosad fue tóxico (OILB 4) para el estado adulto de *A. swirskii*, al incrementar la mortalidad de los ácaros expuestos a los residuos frescos. Estos resultados de toxicidad son similares a los descritos por Rahman y colaboradores (2011), con tres especies de ácaros depredadores *Amblyseius montdorensis* (Schicha) (Acari: Phytoseiidae), *A. cucumeris* y *Hypoaspis miles* (Berlese) (Acari: Hypoaspidae), a una dosis de 96 mg i.a./l. En nuestro trabajo, a pesar de la alta toxicidad sobre el estado adulto, el spinosad fue selectivo para el estado de huevo (OILB 1), aunque provocó una reducción significativa de la eclosión.

En cuanto a los ensayos de persistencia, sólo uno de los productos que resultaron tóxicos en los ensayos de laboratorio con residuo fresco, la emamectina, resultó ser poco persistente (OILB A, <5 días) y por tanto, compatible con *A. swirskii*. Este resultado era de esperar ya que, como comprobaron Amor y colaboradores (2012) en ensayos de persistencia en campo en la región de Murcia, residuos de 3, 7 y 14 días de edad sobre pimiento, eran inocuos para dicha especie de ácaro depredador, al fotodegradarse con facilidad sobre la superficie de las hojas.

Bajo nuestras condiciones, el resto de insecticidas evaluados (abamectina, deltametrina y spinosad) necesitaron más de 5 días para disminuir su toxicidad sobre

esta especie de fitoseido, por lo que fueron clasificados como ligeramente persistentes (OILB B, 5-15 días).

La abamectina, la deltametrina y el spinosad, son insecticidas cuya principal vía de degradación es la fotólisis (van de Veire *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010), de modo que diferencias en la duración de la actividad tóxica de estos productos en especies próximas de ácaros pueden deberse, principalmente, a los distintos niveles de radiación UV bajo los cuales se envejecieron los residuos insecticidas.

En la bibliografía existe información contradictoria sobre la duración de la actividad tóxica de la abamectina en ácaros depredadores. En ensayos llevados a cabo por Blümel & Hausdorf (2002), residuos de 0, 3 y 10 días de edad, envejecidos sobre planta de judía, producían una mortalidad del 100% de las protoninfas del fitoseido *P. persimilis*, mientras que Nadami y colaboradores (2011) y van de Veire y colaboradores (2001), corroborando nuestros resultados, observaron que para *A. californicus* y *P. persimilis*, la abamectina perdía su actividad tóxica a los 10 días de la aplicación.

La deltametrina, al igual que en nuestro estudio, también necesitó más de 5 días para disminuir su toxicidad sobre otra especie de fitoseido, *E. finlandicus* (Broufas *et al.*, 2008). Broufas y colaboradores (2008), en ensayos de persistencia llevados a cabo en Grecia, sobre ciruelos y con los estadíos ninfales de dicha especie de ácaro depredador, observaron que la deltametrina presentaba una actividad moderadamente persistente (OILB C, 16-30 días). Esta mayor persistencia del producto con respecto a nuestros datos, se puede deber tanto al estado de desarrollo y a la especie de ácaro usados en el ensayo, como a una menor degradación fotolítica del producto.

En el caso del spinosad, en el ensayo de persistencia la toxicidad de los adultos de *A. swirskii* a residuos frescos de dicho insecticida fue inferior a la registrada en el ensayo de contacto residual. Esta diferencia en el nivel de toxicidad puede deberse al distinto tipo de sustrato utilizado en los ensayos. En el ensayo de laboratorio se usó un sustrato inerte (cristal) mientras que en el ensayo de persistencia se utilizó sustrato vegetal vivo (plantas de pimiento), el cual puede favorecer la absorción y degradación del insecticida, disminuyendo así la cantidad de residuo presente en la superficie tratada, y por tanto la toxicidad ocasionada por el mismo.

Por último, Van de Veire y colaboradores (2001), en ensayos de persistencia llevados a cabo en pimiento y a una dosis de spinosad de 250 mg ia l⁻¹, clasificaron dicho insecticida como poco persistente (OILB A) para la especie próxima, *A. californicus*. Probablemente, la mayor persistencia del spinosad en nuestro trabajo pueda deberse a que la radiación PAR y UV registradas durante el mismo fueron bajas para la época del año en la que se llevaron a cabo dichos ensayos (PAR: 496,73 ± 117,24 μmol/m²s; UV: 27,88 ± 6,02 μmol/m²s), por lo que el insecticida tardó más tiempo en degradarse bajo dichas condiciones.

CAPÍTULO 5: COMPATIBILIDAD DE BARRERAS FOTOSELECTIVAS CON *ERETMOCERUS MUNDUS*

5.1. Introducción

En los cultivos hortícolas, una de las herramientas de GIP más extendida es el uso de mallas (barreras físicas), que, según su tamaño de poro, evitan la entrada de determinados insectos plaga (Bethke & Paine, 1991). Dentro de las barreras físicas, las mallas fotoselectivas juegan un papel significativo en el control de plagas.

Las barreras fotoselectivas, suponen una mejora de las barreras físicas convencionales al bloquear la transmisión de luz UV, interfiriendo con la visión y la orientación de los insectos, y por tanto, con el movimiento de los mismos (Díaz & Fereres, 2007). Numerosos autores han puesto de manifiesto el excelente control de dichas barreras sobre distintas plagas tales como pulgones, moscas blancas, trips, ácaros y minadores de hojas, así como de los virus transmitidos por las mismas (Antignus *et al.*, 1996, 1998, 2001; Chyzik *et al.*, 2003; Fereres *et al.*, 2003; Kumar & Poehling, 2006; Doukas & Payne, 2007b; Legarrea *et al.*, 2012a, 2012b).

Aunque la compatibilidad de las barreras fotoselectivas con agentes de biocontrol ha sido demostrada por diversos autores (Chyzik *et al.*, 2003; Chiel *et al.*, 2006; Doukas & Payne, 2007c; Legarrea *et al.*, 2012a, 2014), éstas pueden interferir negativamente en la orientación de algunas especies de insectos útiles que basan su localización de presas principalmente en estímulos visuales, disminuyendo el control de plaga que estos insectos pueden llevar a cabo (Chiel *et al.*, 2006; Legarrea *et al.*, 2012a).

La radiación UV abarca una pequeña fracción del espectro electromagnético. Su longitud de onda está comprendida entre los 400-100 nm. Dentro de esta fracción del espectro electromagnético, los efectos biológicos de la radiación varían enormemente con la longitud de onda, por ello, el espectro UV está dividido en tres regiones: UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) y UV-C (280-100 nm) (Diffey, 2002). La radiación UV-C es extremadamente dañina para los organismos, aunque no es una fracción relevante de la radiación solar (Hollósy, 2002). La radiación UV-B puede inducir una

gran variedad de efectos dañinos en los organismos, aunque su longitud de onda solo representa el 1,5% de la radiación solar (Hollós, 2002), además este tipo de radiación puede ser absorbida por el ozono de la estratosfera (Kuhlmann & Müller, 2011). La radiación UV-A, que representa el 6,3% del espectro total, es la menos peligrosa de las tres regiones del UV (Hollós, 2002).

Como consecuencia de la reducción de la capa de ozono, los efectos de la radiación UV-B sobre plantas e insectos están bien estudiados, sin embargo, pocos estudios arrojan algo de luz sobre los posibles efectos ecológicos que pudiera tener la radiación UV-A.

En las plantas la radiación UV-B induce cambios morfológicos, como diferencias en el espesor de las hojas o de la capa de ceras cuticulares, fisiológicos, como reducción de la capacidad fotosintética, y bioquímicos, tales como cambios en los niveles de metabolitos secundarios (flavonoides y otros fenoles), clorofila y lignina (Kakani *et al.*, 2003; Raviv & Antignus, 2004; Kuhlmann & Müller, 2010; Kuhlmann & Müller, 2011). Todos estos cambios afectan a su vez a los insectos fitófagos, modificando su crecimiento poblacional y a la aceptabilidad de dichas plantas por parte de los mismos (Kuhlmann & Müller, 2010; Paul *et al.*, 2012).

Al igual que la radiación UV-B, la UV-A también tiene una influencia directa sobre las plantas. Trabajos realizados por Jayakumar *et al.* (2003) y Verdaguer *et al.* (2012) ponen de manifiesto que medios con UV-A promueven la elongación y el grosor de las células epidérmicas del haz y el crecimiento vegetal (incremento de la biomasa aérea), en comparación con medios sin UV-A o sin una radiación UV-A suplementaria. Según nuestro conocimiento, el único estudio sobre la influencia de la radiación UV-A en las relaciones entre insectos fitófagos y sus plantas huésped es el realizado por Dáder y colaboradores (2014) en condiciones de laboratorio. En dicho estudio observaron que el UV-A inducía cambios a nivel bioquímico y morfológico en dos especies vegetales, berenjena (*Solanum melongena* L.) y pimiento (*C. annuum*), y que dichos cambios afectaban a su vez a sus respectivas plagas, *B. tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) y *M. persicae*.

Por tanto, la radiación UV solar, particularmente la fracción UV-A+-B, juega un papel esencial en el comportamiento de los insectos, pudiendoles afectar tanto directa como indirectamente. De forma directa, modificando su capacidad de visión, orientación hacia sus huéspedes e interacción entre sexos (Raviv & Antignus, 2004). De forma indirecta, a través de cambios morfológicos, fisiológicos o en la calidad nutritiva de los recursos alimenticios, ya sean plantas crecidas bajo ambientes especiales de luz UV, en el caso de insectos plaga (Kuhlmann & Müller, 2011), o dichos insectos fitófagos, en el caso de enemigos naturales (Vet & Dicke, 1992).

Además, se sabe que la radiación UV influye en el desarrollo de enfermedades vegetales ocasionadas por hongos y bacterias, de forma indirecta, al alterar el crecimiento vegetal, la resistencia de la planta huésped al patógeno y el microclima de la filosfera, o de forma directa, al afectar a la supervivencia del patógeno (Paul & Gwynn-Jones, 2003; Díaz & Fereres, 2007). Sin embargo, según nuestro conocimiento, a parte del ensayo realizado por Garzón (2015) sobre pepino (*Cucumis sativus* L.) infestado con el virus CABYV (*Cucurbit Aphid-Borne Yellow Virus*), *A. gossypii* y *C. carnea*, no existe más información acerca de cómo los cambios inducidos por virus vegetales en sus huéspedes, bajo ambientes especiales de radiación UV, influyen a través de la cadena trófica en sus plagas y en los enemigos naturales de la mismas.

5.2. Objetivos

El presente estudio se diseñó con el objetivo de aportar datos sobre los efectos de nuevas barreras fotoselectivas en *E. mundus*, debido a que esta especie de parasitoide basa su detección del huésped en estímulos visuales, por lo que la falta de luz UV modifica dicho comportamiento (Chiel *et al.*, 2006; Fernández, 2010b).

Los objetivos del presente capítulo son:

- Analizar la influencia de distintos tipos de mallas y plásticos fotoselectivos sobre la capacidad de visión, orientación y vuelo de *E. mundus*.
- Evaluar la combinación de los efectos directos e indirectos (mediados por planta y plaga) de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del Virus de la cuchara (TYLCV), sobre *E. mundus*.

5.3. Materiales y Métodos

5.3.1. Efecto directo de ambientes pobres en luz UV y con una alta difusión de luz visible, sobre *E. mundus*

5.3.1.1. Tipos de barreras fotoselectivas

Las mallas estudiadas en este trabajo fueron suministradas por la casa comercial Ginegar Plastic Products Ltd. (Kibbutz Ginegar, Israel). Una de dichas mallas (malla T) fue seleccionada como control negativo, al transmitir el 83% de la radiación UV. El resto de mallas fotoselectivas estudiadas, P, A y G, transmiten porcentajes de radiación UV que van del 60% en la malla P, al 42% en la A y al 39% en la G.

Además de las mallas, en este estudio se utilizó un plástico térmico antiviral, considerado como control positivo al transmitir tan solo el 2% de la radiación UV, suministrado por Solplast S.A. (Murcia, España).

La transmitancia (% de radiación transmitida) medida con espectrofotómetro de las diferentes barreras fotoselectivas estudiadas, se representa en la **Figura 44**. Todas las cubiertas estudiadas dejan pasar altos porcentajes de radiación fotosintéticamente activa (PAR: 400-700 nm) que van del 87% en la malla G, al 74% en la A.

Las características físicas de estas barreras fotoselectivas se resumen en la **Tabla 26**.

Tabla 26: Características físicas de las barreras fotoselectivas estudiadas.

Barrera fotoselectivas	Color	Hilos/cm	Tamaño de poro (mm)	Espesor (µm)
Malla T (Control negativo)	-	10 x 20	0,26 x 0,91	480
Malla P	-	10 x 20	0,26 x 0,92	480
Malla G	-	10 x 20	0,26 x 0,93	480
Malla A	Blanco	10 x 20	0,26 x 0,94	480
Plástico (Control positivo)	-	-	-	200

Figura 44: Radiación transmitida (%) bajo cada tipo de barrera fotoselectiva estudiada (Malla T: control negativo; Plástico térmico antiviral: control positivo). Mediciones realizadas en el Laboratorio de Fotometría, Radiometría y Fibras ópticas del Instituto de Física Aplicada (Instituto Torres Quevedo, CSIC, Madrid) usando un espectrofotómetro Lambda 900 UV/Visible/NIR (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Ltd., Connecticut, EE.UU.)

5.3.1.2. Metodología

Como se ha comentado en el capítulo 3, este ensayo se llevó a cabo al aire libre, en la senda botánica perteneciente a los Campos de Prácticas de la E.T.S.I. Agrónomos.

Para llevar a cabo el ensayo, se construyeron 15 jaulones (3 repeticiones por cada tipo de malla y plástico estudiados), de estructura metálica (dimensiones 1 x 0,6 x 0,6 m), que se forraron con las distintas barreras fotoselectivas (**Figura 45:** imagen izquierda).

Las jaulas se dispusieron a lo largo de la senda botánica siguiendo la distribución al azar mostrada en las **Figuras 45** (imagen derecha) y **46**. Dicha distribución estaba basada en tres módulos separados entre sí 2 metros. En cada módulo, la posición de

cada tipo de jaula variaba con respecto al anterior, para que la variable “posición” no influyese en los resultados.

Figura 45: Detalle de los jaulones empleados en el ensayo y disposición de los mismos en la senda botánica.

Figura 46: Detalle de la distribución de las distintas barreras fotoselectivas estudiadas a lo largo de la senda botánica, durante el ensayo.

En un extremo de los jaulones se colocaron tres trampas amarillas pegajosas de 10 x 10 cm, a distintas alturas (10, 35 y 55 cm del suelo del jaulón). Como atrayente alimenticio se dispusieron 3 tiras de una mezcla de miel y polen sobre cada trampa (**Figura 47**).

En el extremo opuesto de los jaulones, a un metro de distancia de las trampas y a 30 cm del suelo, 100 pupas de *E. mundus* se colocaron sobre las correspondientes plataformas de vuelo (**Figura 48**). En este ensayo se tuvieron que utilizar pupas de *E. mundus* a punto de emerger ese mismo día en vez de adultos, porque los adultos de *E.*

mundus emergidos bajo condiciones ambientales controladas en laboratorio, no se aclimataban a las condiciones reinantes en el exterior, y eran incapaces de abandonar la plataforma de vuelo.

Figura 47: Detalle del atrayente alimenticio y de la disposición de las trampas en el interior de los jaulones.

Figura 48: Detalle de la plataforma de vuelo donde fueron liberados los insectos.

La duración del ensayo fue de 24 horas y al final de dicho periodo se procedió al conteo, bajo lupa binocular, del número de insectos emergidos y pegados en cada una de las trampas amarillas (**Figura 49**).

Figura 49: Detalle de los *E. mundus* [izquierda: ♂ (antena de coloración negra), derecha: ♀ (antena de coloración clara)] pegados en las trampas amarillas.

5.3.1.3. Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa medias) reinantes en el interior de cada tipo de jaula, que fueron monitorizadas de forma idéntica a la descrita en el capítulo 4, se resumen en la **Tabla 27**. En la **Figura 50**, se aprecia la evolución de estas dos variables a lo largo de las 24 horas de duración del ensayo.

Tabla 27: Condiciones ambientales registradas durante el ensayo (Madrid, Mayo 2012).

Barrera fotoselectiva	Temperatura media (°C)	Humedad Relativa media (%)
Malla T (Control negativo)	25,01 ± 1,42	46,68 ± 2,71
Malla P	24,60 ± 1,39	45,65 ± 2,58
Malla A	25,14 ± 1,42	47,07 ± 2,69
Malla G	25,11 ± 1,36	45,03 ± 2,43
Plástico (Control positivo)	26,74 ± 1,64	40,85 ± 2,00

Figura 50: Evolución de la temperatura y la humedad relativa durante las 24 horas de duración del ensayo (Madrid, Mayo 2012).

En la **Tabla 28**, se pueden observar los datos referentes a las radiaciones PAR y UV registradas tanto en el exterior como en el interior de cada jaula, mediante el uso de radiómetros (Ultra-Violet Meter® MU-200 y Quantum-Meter® BQM, Apogee Instruments). Las medidas de radiación se hicieron a la misma hora (12 am) durante todos los días de duración del ensayo, tanto en el exterior como en el interior de las mallas.

Tabla 28: Radiaciones PAR y UV registradas durante el ensayo (Madrid, Mayo 2012).

Barrera fotoselectiva	PAR ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	Reducción PAR (%)	UV ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	Reducción UV (%)
Exterior	$1259,6 \pm 8,63$	-	$72,24 \pm 0,38$	-
Malla T (Control negativo)	$769,67 \pm 19,57$	$38,9 \pm 1,55$	$50,2 \pm 0,76$	$30,51 \pm 1,06$
Malla P	$844,33 \pm 15,47$	$32,97 \pm 1,23$	$38 \pm 0,51$	$47,4 \pm 0,71$
Malla A	$734,67 \pm 5,19$	$41,67 \pm 0,41$	$32,01 \pm 0,9$	$55,68 \pm 1,24$
Malla G	$860,67 \pm 13,43$	$31,67 \pm 1,07$	$25,45 \pm 0,48$	$64,77 \pm 0,66$
Plástico (Control positivo)	$882,83 \pm 11,43$	$29,91 \pm 0,91$	$1,57 \pm 0,47$	$97,83 \pm 0,65$

5.3.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre *E. mundus*

5.3.2.1. Tipos de barreras fotoselectivas

En estos ensayos se utilizaron dos plásticos térmicos suministrados por la casa comercial Solplast S.A., uno no fotoselectivo empleado como control (Térmico Blanco), y otro con propiedades fotoselectivas (Térmico Antivirus). Además se utilizaron dos mallas, la Optinet 50, malla absorbente de luz UV suministrada por Ginegar Plastic Products Ltd. (Kibbutz Ginegar, Israel), y una malla estándar usada como control, suministrada por la casa comercial Criado & López S.L. (El Ejido, Almería). Las características físicas de estas barreras se resumen en la **Tabla 29**.

Tabla 29: Características físicas de las barreras fotoselectivas estudiadas.

Barrera fotoselectiva	Hilos/cm	Espesor (μm)	Propiedades fotoselectivas
Malla control	10 x 20	500	No
Malla Optinet 50	10 x 20	480	Sí
Plástico Térmico Blanco (Control)	-	200	No
Plástico Térmico Antivirus	-	200	Sí

El plástico Térmico Blanco, usado como control, transmite la radiación UV-A (315-400 nm) y bloquea la UV-B (285-310 nm) y, el Térmico Antivirus, plástico absorbente de luz UV, bloquea la transmisión de la radiación UV-A, dejando pasar sólo un 8% de la misma. A pesar de estas diferencias, ambos plásticos transmiten el 85% de la radiación PAR. La malla Optinet 50, transmite un 28% de la radiación UV y un 63% de la PAR, mientras que la malla control deja pasar el 61% del UV y el 84% de la PAR (Legarrea *et al.*, 2009).

5.3.2.2. Metodología

Para llevar a cabo este trabajo se realizaron dos ensayos. El primer ensayo se realizó durante los meses de mayo a julio del año 2013, en ausencia del virus de la cuchara, y el

segundo ensayo, con plantas de tomate infectadas con dicho virus, durante los meses de abril a julio del 2014.

La metodología seguida en ambos ensayos fue la misma, salvo la infestación con el virus.

5.3.2.2.1. Unidades experimentales

Para la realización de este ensayo se construyeron 20 unidades experimentales, 10 absorbentes de luz UV y 10 control. Las unidades experimentales consistían en jaulas de 30 x 30 x 60 cm con estructura de madera, que se forraban en su mitad superior con el plástico correspondiente al tratamiento, y en la mitad inferior, para permitir una correcta aireación de las mismas, con el tipo de malla correspondiente (**Figura 51**). En las jaulas absorbentes se usó el plástico Térmico Antivirus y la malla Optinet 50 y en las jaulas control, el plástico Térmico Blanco y la malla control.

La malla de uno de los extremos inferiores de las jaulas, se pegaba a la misma mediante velcro, para permitir la introducción de plantas e insectos y el suministro de riego cuando fuera necesario.

Figura 51: Detalle de las unidades experimentales.

5.3.2.2.2. Suministro de radiación UV

La radiación UV fue suministrada por lámparas Ultra-Vitalux® 300W E27 (Osram, Múnich, Alemania). La irradiancia de dichas lámparas era de 13,6 Wm⁻² de radiación

UV-A (315-400nm), 3 Wm^{-2} de radiación UV-B (280-315nm) y $41,4 \text{ Wm}^{-2}$ de luz visible (380-780 nm).

Diez de dichas lámparas fueron instaladas a lo largo del invernadero. Bajo cada foco UV, a 50 cm del mismo, se situó una jaula de cada tipo (control y absorbente UV) (**Figura 52**). Durante el ensayo, el fotoperiodo utilizado fue 14:10 h (L:O).

Figura 52: Distribución panorámica de las jaulas bajo los focos de luz UV, a lo largo del invernadero.

5.3.2.2.3. Material vegetal

En estos ensayos se trabajó con plantas de tomate, variedad Marmande. Para la obtención de las plantas, el semillado se llevó a cabo en una bandeja de siembra de 150 alveolos, usando como sustrato una mezcla de tierra y vermiculita (1:1). Una vez realizado el semillado, la bandeja se trasladó a una cámara de germinación con unas condiciones ambientales de $25 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $75 \pm 5\%$ de humedad relativa y un fotoperiodo de 16L:8O h.

Tras la germinación y aparición de los cotiledones, las plántulas fueron transportadas hasta los invernaderos de la E.T.S.I.A., donde fueron trasplantadas a maceteros de 2000 cm^3 de capacidad e introducidas en las distintas jaulas. Las plántulas se desarrollaron en el interior de dichos jaulones bajo los focos de luz UV descritos en el apartado 5.3.2.2.2. Las plantas se mantuvieron en el interior de las jaulas hasta que alcanzaron los 30 cm de altura, momento en el que se procedió a la aplicación de los 4 tratamientos objeto de estudio y a la infestación de las mismas con *B. tabaci*.

5.3.2.2.4. Infección de las plantas con TYLCV

En el ensayo de evaluación de los efectos directos y mediados por planta y plaga, de ambientes pobres en luz UV, en presencia de virus, las plantas fueron infectadas con el Virus de la cuchara (TYLCV). Tanto el virus usado en este ensayo, como el protocolo de infestación de las plantas de tomate con el mismo, fueron proporcionados por el Instituto de Ciencias Agrarias (ICA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Madrid.

A las cuatro semanas de la siembra, se procedió a la inoculación del virus en las plantas. Para ello, previamente, se introdujeron 2.000 moscas blancas durante 72 horas en un jaulón con dos plantas de tomate infectadas con el TYLCV (**Figura 53**), con el objetivo de que adquiriesen dicho virus. Tras la adquisición, se cogieron 50 moscas blancas virulíferas por planta y se introdujeron en jaulones de 0,6 x 0,6 x 1 m, forrados de igual manera a los descritos en el apartado 5.3.2.2.1., para que transmitiesen el virus durante 72 horas. Se infectaron 25 plantas de tomate por tratamiento.

Una vez inoculado el virus, se retiraron las moscas blancas de las jaulas y con la ayuda de una lupa, se eliminó de forma manual cualquier huevo que hubiesen podido poner durante dicho periodo. Dicha operación se repitió diariamente hasta el momento de la segunda liberación de moscas blancas, destinada al desarrollo de los parasitoides.

Figura 53: Detalle de la jaula usada para la adquisición del TYLCV por parte de las moscas blancas.

Para estar seguros de que las plantas habían sido infectadas con el virus, se esperaron 4 semanas desde la inoculación, periodo tras el cual la planta comienza a mostrar síntomas de infección. Se observaron todas las plantas infectadas y se escogieron las 20 plantas (10 plantas crecidas en el jaulón control y otras 10, en el jaulón absorbente de luz UV) con los síntomas más claros (**Figura 54**).

Una vez que las plantas de tomate estaban infectadas con el TYLCV, se procedió a la aplicación del protocolo descrito en el apartado siguiente.

Figura 54: Detalle de los síntomas de infección por TYLCV mostrados por las plantas de tomate.

5.3.2.2.5. Diseño experimental

Para ver los efectos directos y mediados por planta y plaga de ambientes pobres de luz UV sobre *E. mundus*, se aplicaron 4 tratamientos, tanto en el ensayo con planta libre de virus como en el ensayo con virus. Dichos tratamientos se aplicaron cuando las plantas adquirieron un tamaño adecuado, aproximadamente 30 cm de altura.

Los tratamientos objeto de estudio en dichos ensayos fueron los siguientes:

- Control: 5 plantas mantenidas desde la aparición de los cotiledones en jaulas control (plástico Térmico Blanco y malla control estándar).
- Absorbente: 5 plantas mantenidas desde la aparición de los cotiledones en jaulas absorbentes (plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50).
- Control-Absorbente: 5 plantas crecidas en jaulas control desde la aparición de los cotiledones hasta los 30 cm de altura, que posteriormente continuaron su desarrollo en jaulas absorbentes.

- Absorbente-Control: 5 plantas crecidas en jaulas absorbentes desde la aparición de los cotiledones hasta los 30 cm de altura, que posteriormente continuaron su desarrollo en jaulas control.

Tras la aplicación de los 4 tratamientos, se liberaron 50 adultos de *B. tabaci* por jaula, durante 72 horas, con el objetivo de que su descendencia ayudase al enemigo natural *E. mundus* a completar su ciclo de vida.

Adicionalmente, un jaulón de cada tipo (0,6 x 0,6 x 1 m) fue utilizado para el seguimiento del desarrollo de la mosca blanca, necesario para establecer el momento de liberación de los parasitoides. Posteriormente, estos mismos jaulones se utilizaron para seguir el desarrollo de *E. mundus*.

Una vez que las moscas blancas estaban en los estados N3 y/o N2, en cada una de las jaulas se liberaron 50 de adultos de *E. mundus* con menos de 24 horas de edad (30 hembras y 20 machos) y se dejaron que parasitasen durante 72 horas (**Figura 55**). Además en las plantas se colocaron cartulinas de plástico en las cuales se dispusieron pequeñas gotas de miel, como alimento complementario para el parasitoide (**Figura 56**).

Figura 55: Detalle de los recipientes de liberación de *E. mundus* y su disposición en el interior de las jaulas.

Figura 56: Detalle de la disposición del alimento de *E. mundus* en la planta.

Transcurridos 20 días desde la suelta de los parasitoides, cuando aproximadamente el 90% de los adultos de *E. mundus* habían emergido de las ninfas de mosca blanca parasitadas, se dieron por finalizados los ensayos.

En la **Figura 57** se resume el cronograma de las tareas realizadas en ambos ensayos, desde la siembra de las plantas hasta el fin del mismo.

Figura 57: Cronograma de las tareas realizadas a lo largo de los ensayos de combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre *E. mundus*.

Una vez finalizado el ensayo, las plantas se transportaron hasta el laboratorio donde fueron evaluados los siguientes parámetros:

- Número total de ninfas de mosca blanca por tratamiento: secas (ya sea porque muriesen de forma natural o por picaduras alimenticias hechas por el parasitoide), parasitadas y no parasitadas.
- Número de *E. mundus* muertos y emergidos (las pupas de *E. mundus* no emergidas en el momento del análisis de las plantas, fueron separados de las mismas e introducidas en placas Petri® de cristal, donde se mantuvieron bajo las condiciones ambientales descritas en el apartado 3.1.1.1., hasta su emergencia).
- Altura final, peso fresco y seco de las plantas.
- Contenido en carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre de las plantas.
- Análisis de las cutículas y las paredes celulares de la epidermis foliar.

5.3.2.2.6. Altura, peso fresco y seco de las plantas

Para poder determinar posibles efectos de la radiación UV en el crecimiento de las plantas se analizó la altura, el peso fresco y el seco de la parte aérea. Para la obtención del peso seco, las plantas fueron previamente introducidas en una estufa (Anger, Madrid, España) a 60°C durante 72 horas.

5.3.2.2.7. Contenido en carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre de las plantas

La evaluación de estos parámetros se llevó a cabo en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de Microanálisis Elemental de la Universidad Complutense de Madrid.

Para ello, se escogió una hoja previamente desecada de cada repetición (aproximadamente 3 mg), se introdujo en el interior de un tubo eppendorf y se sumergió en nitrógeno líquido durante unos segundos para posteriormente, con la ayuda de una varilla de cristal, pulverizarla finamente.

Una vez que las muestras estaban pulverizadas, se llevaron al CAI, donde, mediante un microanalizador elemental LECO CHNS-932 (Michigan, EE.UU.), determinaron de

forma simultánea el contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre en las mismas. Dicha determinación se llevó a cabo usando la técnica de "dynamic flash combustion", en la que la separación de los elementos del material se produce por combustión a alta temperatura. Tras una serie de manipulaciones químicas, los elementos objeto de análisis se transforman en CO₂, H₂O, N₂ y SO₂ y se cuantifican mediante celdas de infrarrojo y conductividad térmica.

5.3.2.2.8. Análisis de las cutículas y las paredes celulares de la epidermis foliar

La evaluación de este parámetro se llevó a cabo en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME) de la Universidad Complutense de Madrid.

Previamente a la observación de las muestras vegetales al microscopio electrónico de transmisión (MET), se escogieron cinco hojas por tratamiento y, con la ayuda de un bisturí, se tomaron muestras de tamaño 0,2 x 1 cm. Dichas muestras fueron fijadas químicamente, deshidratadas y finalmente, incluidas en una resina hasta la polimerización de la misma. La fijación se hizo en una disolución de glutaraldehído (2,5%) y paraformaldehído (4%) en tampón fosfato monohidratado (0,1 M; pH 7,2) durante 6 horas a 4°C. A continuación, las muestras se lavaron 3 veces con el tampón fosfato monohidratado y se mantuvieron en él toda la noche. Al día siguiente, se realizó la postfijación de las muestras usando tetróxido de osmio al 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente y bajo campana de extracción de gases. Inmediatamente después, las muestras se lavaron con agua destilada tres veces durante 15 minutos, a temperatura ambiente, y posteriormente se deshidrataron en series de etanol. Para la deshidratación, las muestras fueron introducidas durante 15 minutos, en series de etanol al 40%, 50%, 60%, 70% y 80%, y al 90 y 100%, durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se incluyeron de forma progresiva en la resina TAAB 812 [etanol/TAAB (2:1) durante 1 hora, etanol/TAAB (1:1) durante 1 hora y etanol/TAAB (1:2) durante 1 hora]. Terminado dicho proceso, las muestras se pasaron a unos moldes de silicona numerados, se cubrieron de resina pura y se dejaron polimerizar durante 72 horas a 70°C en una estufa (Anger, Madrid, España) (**Figura 58**).

Terminado este proceso, las muestras vegetales incluidas en resina se llevaron al CNME, donde, con la ayuda de un ultramicrotomo, se hicieron cortes transversales de 60 nm de espesor. Posteriormente, los cortes se recogieron en rejillas de cobre y se tiñeron con citrato de plomo Reynolds® y acetato de uranilo (2%). Una vez finalizado este proceso, se procedió a la observación del espesor de las cutículas (aumento 200.000) y de las paredes celulares de las células de la epidermis (aumento 20.000), bajo un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010® (JEOL Ltd., Tokio, Japón) (**Figura 59**). Bajo el microscopio, se analizaron 3 cortes de cada tratamiento; en cada corte se tomaron 5 fotografías de las cutículas y 5 de las paredes; y en cada fotografía se tomaron 3 medidas de longitud.

Figura 58: Detalle de las muestras vegetales incluidas en la resina.

Figura 59: Fotografías al microscopio electrónico de transmisión de las cutículas (imagen izquierda) y paredes celulares (imagen derecha) de la epidermis foliar.

5.3.2.3. Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales reinantes en el interior del invernadero durante ambos ensayos se resumen en la **Tabla 30** y en la **Figura 60**, se observa su evolución a lo largo del ensayo.

Tabla 30: Condiciones ambientales registradas durante los ensayos.

Ensayo	Duración del ensayo	Temperatura media (°C)	Humedad Relativa media (%)
Sin virus	Mayo-Julio 2013	25,42 ± 0,14	51,19 ± 0,30
Con virus	Abril-Mayo 2014	24,48 ± 0,12	50,77 ± 0,28

En cada ensayo, las radiaciones PAR y UV puntuales se registraron, tanto en el exterior como en el interior de cada jaula, siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 5.3.1.3. Además, las radiaciones UV-A y UV-B también fueron registradas mediante el uso del radiómetro ALMEMO 25904S (Ahlborn GmbH, Holzkirchen, Alemania). En la **Tabla 31** se pueden observar los datos medios referentes a las radiaciones PAR y UV presentes durante los ensayos.

Figura 60: Evolución de la temperatura y la humedad relativa durante los ensayos.

A razón del fotoperiodo utilizado (14 horas de luz), la dosis de radiación UV diaria recibida por las plantas e insectos en el interior de las jaulas fue:

- Ensayo realizado en ausencia del TYLCV: 343,22 kJ/m²día de UV-A y 1,51 kJ/m²día de UV-B en las jaulas control, y 46,37 kJ/m²día de UV-A y 0,40 kJ/m²día de UV-B en las jaulas absorbentes de luz UV.
- Ensayo realizado en presencia del TYLCV: 252 kJ/m²día de UV-A y 0,70 kJ/m²día de UV-B en las jaulas control, y 32,76 kJ/m²día de UV-A y 0,20 kJ/m²día de UV-B en las jaulas absorbentes de luz UV.

Tabla 31: Radiaciones PAR y UV registradas durante los ensayos de combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre *E. mundus*.

Ensayo	Tipo de jaula	PAR ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	Transmisión PAR (%)	UV-A (W/m^2)	UV-B (W/m^2)	Transmisión UV-A (%)	Transmisión UV-B (%)
Sin virus	Exterior ^a	940,03 $\pm$ 77,87	-	24,53 $\pm$ 0,72	0,41 $\pm$ 0,01	-	-
	Jaula control ^b	677,59 $\pm$ 63,09	70 $\pm$ 3,33	6,81 $\pm$ 0,35	0,03 $\pm$ 0,001	28,61 $\pm$ 1,99	6,49 $\pm$ 0,35
	Jaula Abs. UV ^b	582,02 $\pm$ 52,94	60,60 $\pm$ 2,60	0,92 $\pm$ 0,14	0,008 $\pm$ 0,0003	3,70 $\pm$ 0,49	1,96 $\pm$ 0,07
Con virus	Exterior ^a	979,67 $\pm$ 47,2	-	23,34 $\pm$ 1,01	0,31 $\pm$ 0,01	-	-
	Jaula control ^b	707,3 $\pm$ 33,36	73,27 $\pm$ 0,75	5,00 $\pm$ 0,18	0,014 $\pm$ 0,0003	24,62 $\pm$ 0,78	4,88 $\pm$ 0,16
	Jaula Abs. UV ^b	596,64 $\pm$ 29,07	60,36 $\pm$ 0,54	0,65 $\pm$ 0,03	0,004 $\pm$ 0,0002	2,62 $\pm$ 0,05	1,48 $\pm$ 0,08

^aMedida tomada sobre las jaulas, a 50 cm de distancia del foco de luz UV. ^bMedida tomada en el interior de las jaulas, en la parte superior de las mismas.

5.4. Resultados

5.4.1. Efecto directo de ambientes pobres en luz UV y con una alta difusión de luz visible, sobre *E. mundus*

En la **Tabla 32** se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados en dicho ensayo.

El porcentaje de emergencia de los adultos de *E. mundus* bajo las barreras fotoselectivas estudiadas, no superó en ningún caso el 40%. Bajo el plástico, tan sólo el 7% de los adultos de dicha especie de parasitoide fueron capaces de emerger, lo que supuso una reducción significativa respecto a la malla control (malla T).

En cuanto al porcentaje de parasitoides pegados respecto a los emergidos, el número varió del $55,28 \pm 4,39\%$ en la malla P, al $2,56 \pm 2,56\%$ en el plástico (control positivo). Tan sólo en la malla G y en el plástico (control positivo) se detectaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la malla control.

Tabla 32: Efecto directo de cubiertas fotoselectivas sobre la emergencia y la capacidad de visión, orientación y vuelo de *E. mundus*.

Barrera fotoselectiva	Emergencia (%)	% Adultos <i>E. mundus</i> pegados/ Emergidos
Malla T (Control negativo)	$36,33 \pm 2,73$ a	$54,92 \pm 4,14$ a
Malla P	$30 \pm 4,04$ a	$55,28 \pm 4,39$ a
Malla A	$31 \pm 1,15$ a	$42,12 \pm 5,62$ ab
Malla G	$35 \pm 3,05$ a	$41,57 \pm 3,61$ b
Plástico (Control positivo)	$7 \pm 3,05$ b	$2,56 \pm 2,56$ c
<i>F</i> (g.l.)	16,34 (4, 10)	26,54 (4, 10)
<i>P</i>	0,0002	< 0,0001

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

5.4.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre *E. mundus*

5.4.2.1. Ensayo con plantas de tomate sanas

5.4.2.1.1. Efecto directo de los ambientes pobres en luz UV sobre las plantas de tomate

Los resultados referentes al efecto de los distintos ambientes de luz UV estudiados sobre la altura y biomasa de las plantas, están recogidos en la **Tabla 33**. Como se puede observar, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos para ninguno de los parámetros evaluados.

Tabla 33: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el crecimiento y la biomasa de las plantas de tomate sanas.

Tratamiento	Peso fresco parte aérea (g)	Peso seco parte aérea (g)	Altura parte aérea (cm)
Control ^a	29,04 ± 6,49 a	4,94 ± 1,15 a	45,14 ± 2,46 a
Absorbente ^b	33,42 ± 7,02 a	5,42 ± 1,05 a	46,38 ± 2,99 a
Control ^a -Absorbente ^b	28,04 ± 9,67 a	4,46 ± 1,42 a	43,14 ± 4,90 a
Absorbente ^b -Control ^a	30,4 ± 6,44 a	4,92 ± 1,11 a	45,74 ± 4,71 a
<i>F</i> (g.l.)	0,10 (3,16)	0,11 (3,16)	0,13 (3,16)
<i>P</i>	0,9607	0,9543	0,9419

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50.

En cuanto al efecto de dichos ambientes en el contenido en carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, en la **Tabla 34** se puede observar que tan sólo en el caso del hidrógeno existen diferencias significativas entre los tratamientos. El mayor contenido en hidrógeno fue detectado en las plantas del tratamiento *Absorbente* ($5,76 \pm 0,09\%$) y el menor, en el tratamiento *Absorbente-Control* ($5,39 \pm 0,13\%$).

Tabla 34: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el contenido C, H, N y S de las plantas de tomate sanas.

Tratamiento	Carbono (%)	Hidrógeno (%)	Azufre (%)	Nitrógeno (%)
Control ^a	35,69 ± 0,34 a	5,75 ± 0,05 a	0,47 ± 0,07 a	0,89 ± 0,07 a
Absorbente ^b	36,17 ± 0,58 a	5,76 ± 0,09 a	0,38 ± 0,06 a	0,88 ± 0,03 a
Control ^a -Absorbente ^b	35,76 ± 0,36 a	5,55 ± 0,06 ab	0,31 ± 0,07 a	0,87 ± 0,07 a
Absorbente ^b -Control ^a	35,55 ± 0,65 a	5,39 ± 0,13 b	0,42 ± 0,05 a	0,89 ± 0,04 a
<i>F</i> (g.l.)	0,28 (3,16)	4,19 (3,16)	1,08 (3,16)	0,02 (3,16)
<i>P</i>	0,8377	0,0229	0,384	0,9949

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50.

En la **Tabla 35** se muestran los datos referentes al espesor de las cutículas y de las paredes celulares de la epidermis foliar. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ambos parámetros, entre los distintos tratamientos. El espesor de las cutículas varió significativamente de $22,28 \pm 1,00$ nm en el tratamiento *Control-Absorbente*, a $29,39 \pm 0,69$ nm en el tratamiento *Absorbente-Control* y el espesor de la pared celular, de $1,83 \pm 0,06$ μ m en el tratamiento *Control-Absorbente*, a $2,5 \pm 0,06$ μ m en el tratamiento *Control*.

Tabla 35: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el espesor de las cutículas y paredes celulares de la epidermis de las plantas de tomate sanas.

Tratamiento	Espesor cutícula (nm)	Espesor pared celular (μ m)
Control ^a	25,14 ± 0,76 b	2,5 ± 0,06 a
Absorbente ^b	22,35 ± 0,93 a	2,24 ± 0,06 b
Control ^a -Absorbente ^b	22,28 ± 1,00 a	1,83 ± 0,06 c
Absorbente ^b -Control ^a	29,39 ± 0,69 c	2,49 ± 0,04 a
<i>F</i> (g.l.)	15,20 (3, 176)	27,82 (3, 176)
<i>P</i>	< 0,0001	< 0,0001

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50.

5.4.2.1.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, sobre *E. mundus*

En la **Tabla 36** se recogen los datos referentes al número total de ninfas de *B. tabaci* (vivas, muertas y parasitadas por *E. mundus*) encontradas al final del ensayo en cada uno de los tratamientos. A la vista de esta tabla se puede inferir que dicho número fue significativamente igual en todos los tratamientos.

Tabla 36: Combinación de efectos directos y mediados por planta de ambientes pobres en luz UV sobre *B. tabaci*.

Tratamiento	Nº medio total de ninfas de <i>B. tabaci</i> ^c
Control ^a	213,6 ± 29,61 a
Absorbente ^b	207,8 ± 42,02 a
Control ^a -Absorbente ^b	186,6 ± 39,67 a
Absorbente ^b -Control ^a	193,8 ± 20,92 a
<i>F</i> (g.l.)	0,13 (3,16)
<i>P</i>	0,9392

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50. ^cNúmero medio total de ninfas: vivas, muertas y parasitadas por *E. mundus*.

Los resultados referentes al número de ninfas de *B. tabaci* parasitadas por *E. mundus*, no parasitadas (mosca blanca vivas, emergidas o en estado de pupa) y muertas (ninfas secas debidas a picaduras alimenticias hechas por los parasitoides o muertas de forma natural) presentes en cada tratamiento, se resumen en la **Figura 61**. Como se puede observar, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para ninguno de dichos parámetros.

Figura 61: Combinación de efectos directos y mediados por planta de ambientes pobres en luz UV sobre *E. mundus* (Ensayo sin virus). *No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P \geq 0,05$) para ninguno de los parámetros evaluados.

^a $F=0,04$; g.l.=3, 16; $P=0,9906$. ^b $F=0,75$; g.l.=3, 16; $P=0,5372$. ^c $F=0,28$; g.l.=3, 16; $P=0,8362$.

El número de *E. mundus* emergidos y muertos (en los estados inmaduros o durante la emergencia) se presenta en la **Tabla 37**. En todos los tratamientos el porcentaje de emergencia fue superior al 88%, no existiendo diferencias significativas en el número de *E. mundus* emergidos y muertos entre los mismos.

Tabla 37: Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga de ambientes pobres en luz UV sobre la emergencia y la mortalidad de *E. mundus* durante los estados inmaduros o durante la emergencia.

Tratamiento	<i>E. mundus</i> emergidos	<i>E. mundus</i> muertos ^c
Control ^a	94,0 ± 13,28 a	9,0 ± 1,70 a
Absorbente ^b	99,0 ± 28,69 a	6,0 ± 1,22 a
Control ^a -Absorbente ^b	101,8 ± 20,19 a	5,6 ± 1,69 a
Absorbente ^b -Control ^a	86,6 ± 11,13 a	11,8 ± 3,89 a
<i>F</i> (g.l.)	0,12 (3,16)	1,50 (3,16)
<i>P</i>	0,9494	0,2532

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50. ^c*E. mundus* muertos: muertos durante la emergencia o en los estados inmaduros.

5.4.2.2. Ensayo con plantas de tomate infectadas con el virus TYLCV

5.4.2.2.1. Efecto directo de los ambientes pobres en luz UV sobre las plantas de tomate

En la **Tabla 38** se resume el efecto de los distintos ambientes de luz UV estudiados sobre la altura y la biomasa de las plantas. La altura de las plantas fue estadísticamente igual independientemente del ambiente de luz al que fueron expuestas. Sin embargo, el peso fresco y seco de las plantas crecidas durante todo su desarrollo en ambientes pobres en luz UV (tratamiento *Absorbente*), fue significativamente inferior ($27,62 \pm 1,98$ y $4,6 \pm 0,33$ g, respectivamente) al resto de tratamientos.

Tabla 38: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el crecimiento y la biomasa de las plantas de tomate infectadas con el TYLCV.

Tratamiento	Peso fresco parte aérea (g)	Peso seco parte aérea (g)	Altura parte aérea (cm)
Control ^a	38,28 ± 3,00 a	6,06 ± 0,48 ab	53,46 ± 1,11 a
Absorbente ^b	27,62 ± 1,98 b	4,6 ± 0,33 b	51,48 ± 1,43 a
Control ^a -Absorbente ^b	40,6 ± 4,50 a	6,88 ± 0,65 a	52,28 ± 0,66 a
Absorbente ^b -Control ^a	34,04 ± 2,58 ab	5,86 ± 0,50 ab	53,18 ± 1,42 a
<i>F</i> (g.l.)	3,26 (3, 16)	3,51 (3, 16)	0,57 (3, 16)
<i>P</i>	0,0491	0,0397	0,6447

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50.

Los resultados referentes al efecto de dichos ambientes en el contenido en carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre de las plantas, están recogidos en la **Tabla 39**. Como se puede observar, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos para ninguno de los parámetros evaluados.

Tabla 39: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el contenido C, H, N y S de las plantas de tomate infectadas con el TYLCV.

Tratamiento	Carbono (%)	Hidrógeno (%)	Azufre (%)	Nitrógeno (%)
Control ^a	36,18 ± 0,79 a	5,34 ± 0,08 a	0,59 ± 0,06 a	1,06 ± 0,09 a
Absorbente ^b	35,19 ± 0,96 a	5,15 ± 0,10 a	0,54 ± 0,12 a	0,98 ± 0,07 a
Control ^a -Absorbente ^b	38,01 ± 0,64 a	5,50 ± 0,07 a	0,43 ± 0,12 a	1,07 ± 0,05 a
Absorbente ^b -Control ^a	36,94 ± 0,81 a	5,32 ± 0,12 a	0,27 ± 0,07 a	0,94 ± 0,09 a
<i>F</i> (g.l.)	2,16 (3, 16)	2,22 (3, 16)	2,08 (3, 16)	0,66 (3, 16)
<i>P</i>	0,1332	0,1252	0,143	0,5887

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50.

En la **Tabla 40** se muestran los datos referentes al espesor de las cutículas y de las paredes celulares de la epidermis foliar. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ambos parámetros estudiados, entre los distintos tratamientos. El

mayor espesor de la cutícula fue detectado en las plantas del tratamiento *Absorbente-Control* ($29,20 \pm 0,78$ nm), el cual fue significativamente igual al de las plantas del tratamiento *Control* ($28,06 \pm 0,77$ nm). Las cutículas de las plantas pertenecientes a los tratamientos *Absorbente* y *Control-Absorbente* fueron disminuyendo significativamente su espesor con respecto a los otros tratamientos. En cuanto a las paredes celulares, el mayor espesor fue observado en el tratamiento *Absorbente-Control* ($2,19 \pm 0,03$ μ m) y fue disminuyendo significativamente en el resto de tratamientos.

Tabla 40: Efecto directo de los distintos ambientes de luz UV en el espesor de las cutículas y paredes celulares de la epidermis de las plantas de tomate infectadas con el TYLCV.

Tratamiento	Espesor cutícula (nm)	Espesor pared celular (μ m)
Control ^a	$28,06 \pm 0,77$ ab	$1,98 \pm 0,03$ b
Absorbente ^b	$26,67 \pm 0,88$ bc	$2,02 \pm 0,02$ b
Control ^a -Absorbente ^b	$25,33 \pm 0,79$ c	$1,74 \pm 0,02$ c
Absorbente ^b -Control ^a	$29,20 \pm 0,78$ a	$2,19 \pm 0,03$ a
<i>F</i> (g.l.)	4,34 (3, 176)	37,81 (3, 176)
<i>P</i>	0,0056	< 0,0001

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50.

5.4.2.2.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga, sobre *E. mundus*

Los resultados referentes al número medio total de ninfas de *B. tabaci* (vivas, muertas y parasitadas por *E. mundus*) encontradas al final del ensayo en cada uno de los tratamientos, se resumen en la **Tabla 41** y, como se puede observar, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 41: Combinación de efectos directos y mediados por planta infectadas con el TYLCV de ambientes pobres en luz UV sobre *B. tabaci*.

Tratamiento	Nº medio total de ninfas de <i>B. tabaci</i> ^c
Control ^a	226,2 ± 13,36 a
Absorbente ^b	195,4 ± 10,21 a
Control ^a -Absorbente ^b	218,8 ± 7,77 a
Absorbente ^b -Control ^a	197,6 ± 10,43 a
<i>F</i> (g.l.)	2,08 (3, 16)
<i>P</i>	0,1429

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50. ^cNúmero medio total de ninfas: vivas, muertas y parasitadas por *E. mundus*.

En la **Figura 62** se recogen los datos referentes al número de ninfas de *B. tabaci* parasitadas por *E. mundus*, no parasitadas (mosca blanca vivas, emergidas o en estado de pupa) y muertas (ninfas secas debidas a picaduras alimenticias hechas por los parasitoides o muertas de forma natural) presentes en cada tratamiento. Como se observa, todos estos parámetros fueron significativamente iguales en todos los tratamientos.

En cuanto al número de *E. mundus* emergidos y muertos (en estados inmaduros o durante la emergencia), en la **Tabla 42** se puede observar que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. En todos los tratamientos el porcentaje de emergencia fue superior al 92%.

Figura 62: Combinación de efectos directos y mediados por planta de ambientes pobres en luz UV sobre *E. mundus* (Ensayo con virus). *No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P \geq 0,05$) para ninguno de los parámetros evaluados.

^a $F=2,45$; g.l.=3, 16; $P=0,1013$. ^b $F=1,46$; g.l.=3, 16; $P=0,2624$. ^c $F=1,29$; g.l.=3, 16; $P=0,3107$.

Tabla 42: Combinación de efectos directos y mediados por planta infectadas con el TYLCV y plaga de ambientes pobres en luz UV sobre la emergencia y la mortalidad de *E. mundus* durante los estados inmaduros o durante la emergencia.

Tratamiento	<i>E. mundus</i> emergidos	<i>E. mundus</i> muertos ^c
Control ^a	118,8 ± 9,62 a	10,0 ± 1,48 a
Absorbente ^b	103,6 ± 3,4 a	5,8 ± 0,97 a
Control ^a -Absorbente ^b	106,0 ± 6,15 a	8,8 ± 1,02 a
Absorbente ^b -Control ^a	99,8 ± 5,73 a	6,6 ± 0,93 a
<i>F</i> (g.l.)	1,55 (3, 16)	2,98 (3, 16)
<i>P</i>	0,2396	0,0624

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^aJaula control: plástico Térmico Blanco y malla control estándar.

^bJaula absorbente: plástico Térmico Antivirus y malla Optinet 50. ^c*E. mundus* muertos: muertos durante la emergencia o en los estados inmaduros.

5.5. Discusión

5.5.1. Efecto directo de ambientes pobres en luz UV y con una alta difusión de luz visible, sobre *E. mundus*

La luz UV juega un papel esencial en la visión de los insectos, de modo que cambios en los niveles de radiación UV pueden influir en vuelo y la orientación de los mismos hacia sus huéspedes.

Bajo las mallas control (malla T), P y A, las cuales en el estudio transmitieron respectivamente el 69,49 - 52,6 y 44,32 % de la radiación UV, el número de *E. mundus* que fueron capaces de orientarse y volar hacia el atrayente alimenticio no se vio afectado por el tipo de malla. Sin embargo, cuando la radiación UV transmitida fue inferior al 35%, como es el caso de la malla G ($25,45 \pm 0,48 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ transmitidos), la visión de esta especie de parasitoide se vio afectada, siendo en un alto porcentaje incapaces de encontrar el atrayente alimenticio incluso a la pequeña distancia de 1 metro.

Resultados análogos a los encontrados en el presente trabajo, han sido descritos por Fernández (2010b) tras evaluar la compatibilidad de la malla fotoselectiva Bionet®, que permitía el paso del 34,24% de la radiación UV ($24,46 \pm 0,99 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ transmitidos), con *E. mundus*. Nuestros resultados coinciden también con los de Chiel y colaboradores (2006) que observaron que *E. mundus* requiere un estímulo visual adecuado para poder orientarse y desplazarse, de ahí que los ambientes pobres en luz UV no favorezcan la dispersión de dicho parasitoide.

En contraste, un elevado número de parasitoides entre los que se encuentran *A. colemani*, *A. matricariae*, *D. isaea* y *E. formosa*, son compatibles con las barreras fotoselectivas (Chyzik *et al.*, 2003; Chiel *et al.*, 2006; Doukas & Payne, 2007a, 2007c).

Por otro lado, se constató, que la metodología empleada para evaluar la compatibilidad de un enemigo natural con un material plástico no era la adecuada, ya que, al no transpirar, no permite una ventilación adecuada y la temperatura aumenta significativamente en el interior de las jaulas. Prueba de ello, fue el pico de temperatura (52°C) registrado en el ensayo en el interior de las cajas cubiertas con el plástico,

alrededor de las 16 horas, que fue probablemente el que causó una mortalidad del 93% de las pupas de *E. mundus*. Por lo que, para la correcta evaluación de este tipo de materiales plásticos, los diseños de las unidades experimentales se deben basar en los invernaderos tipo túnel de la zona de Almería, con el techo de plástico y los laterales de malla, que permiten una correcta aireación del cultivo.

5.5.2. Combinación de efectos directos y mediados por planta y plaga de ambientes pobres en luz UV, en presencia o ausencia del virus TYLCV, sobre *E. mundus*

Como se ha comentado en la introducción, los ambientes especiales de luz UV pueden tener una gran influencia en la morfología, fisiología y bioquímica de las plantas. En términos de crecimiento, tanto en el ensayo con planta sana como en el ensayo con planta infectada con el Virus de la cuchara, la altura del tallo de las plantas fue significativamente igual bajo los distintos regímenes de radiación UV estudiados. A pesar de que una de las respuestas más comunes de aclimatación de las plantas a la radiación UV es la inhibición del crecimiento (Krizek *et al.*, 1997; Jansen, 2002; Kakani *et al.*, 2003), en algunos casos este efecto no ha sido observado, demostrando que los efectos inducidos por la radiación varían con la especie vegetal estudiada (Fiscus & Booker, 1995; Rozema, 1997). Nuestros resultados coinciden con los hallazgos realizados por Dáder y colaboradores (2014), en un trabajo de similar metodología y con la especie vegetal *S. melongen*. Estos autores no observaron diferencias significativas en la longitud del tallo de las plantas de berenjena en función de los distintos ambientes de radiación estudiados. Además, y conforme a nuestros resultados, Kuhlmann & Müller (2009) comprobaron que plantas de brócoli crecidas inicialmente en ambientes de baja radiación UV y que posteriormente continuaron su desarrollo bajo distintas condiciones de la misma, poseían un crecimiento semejante.

Por otro lado, en nuestro trabajo, los resultados referentes al peso fresco y seco de las plantas variaron en función del estado sanitario de las mismas (sanas o infectadas con el Virus de la cuchara). En el ensayo con planta sana, para este parámetro evaluado, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Al igual que en el caso del crecimiento, los efectos de la radiación en el peso de las plantas pueden variar con la especie vegetal estudiada. Diferentes autores han constatado que la producción de

biomasa (peso fresco-seco) era inhibida por la radiación UV-B o UV-A+B (Krizek *et al.*, 1997; 1998; Kadur *et al.*, 2007), aunque otros estudios obtuvieron resultados opuestos, como un efecto nulo (Garzón, 2015b) o un incremento del peso seco vegetal (Liu *et al.*, 2005).

A pesar de este efecto nulo de la radiación UV en la producción de biomasa de plantas sanas, en el ensayo con planta infectada, tanto el peso fresco como el seco observados en el tratamiento *Absorbente*, fueron significativamente inferiores. Este efecto, como se ha comentado en el caso del ensayo con planta sana, no es debido a un efecto directo de la radiación UV en la producción de biomasa, si no a un efecto sobre los niveles de resistencia de la planta al virus. Como han demostrado algunos estudios, los cambios inducidos en las plantas por la radiación UV-B (acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), incremento de flavonoides, antocianos y carotenoides, cambios en el espesor de la cutícula y en la composición de las ceras epicuticulares), pueden conferir resistencia frente a hongos patógenos (Raviv & Antignus, 2004; Díaz & Fereres, 2007). En la bibliografía también se ha descrito este mismo efecto de la radiación en la resistencia de las plantas frente a virus. Yalpani y colaboradores (1994) observaron que la irradiación de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) con UV-C desencadenaba la producción de ácido salicílico (AS) de la misma manera que es inducida por patógenos vegetales. Este incremento en los niveles de AS desencadenaba a su vez la producción de proteínas PR, lo que se traducía en un incremento de la resistencia de las plantas al Virus del mosaico del tabaco (TMV). La radiación UV también puede tener un efecto directo en los virus, como demostraron Semeniuk & Goth (1980), al inactivar el Virus de la patata (PVS) tras la irradiación con UV-A+B de plantas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) infectadas con dicho virus. Según lo anteriormente expuesto, nuestros resultados se pueden justificar basándonos en las bajas dosis de radiación UV recibidas por las plantas del tratamiento *Absorbente*, insuficientes para desencadenar mecanismos de resistencia, de modo que uno de los síntomas producidos por el TYLCV, la reducción del peso fresco y seco (Khalil *et al.*, 2014), se hizo más patente en las plantas crecidas en ambientes de baja radiación UV.

En lo referente al espesor de la cutícula y de la pared celular de la epidermis vegetal, en el ensayo con planta sana, ambos parámetros fueron significativamente mayores en los tratamientos *Control* y *Absorbente-Control*. La cutícula y la epidermis vegetal son barreras importantes de defensa contra los efectos nocivos que la radiación UV puede tener en plantas (Hollósy, 2002; Kuhlmann & Müller, 2011). Reforzando nuestros resultados, Verdaguer y colaboradores (2012) observaron que la exposición a la radiación UV-A de varias especies leñosas, incrementaba el espesor de las células epidérmicas del haz en comparación con plantas crecidas en ausencia de radiación UV. De igual forma, en la bibliografía se pueden encontrar referencias a la inducción del engrosamiento de las cutículas vegetales por parte de la radiación UV-B (Grammatikopoulos *et al.*, 1998; Paoletti, 2005). Cuando los ensayos se realizaron con planta infectada, el efecto de la radiación sobre el engrosamiento de la cutícula fue el mismo que en el ensayo con planta sana, sin embargo el espesor de las paredes celulares de la epidermis fue significativamente menor en los tratamientos *Control* y *Control-Absorbente*, los cuales recibieron durante sus primeras etapas de desarrollo radiación UV. Como se ha comentado anteriormente, la radiación UV a largo plazo puede desencadenar mecanismos de resistencia frente a patógenos, no obstante, a corto plazo esta radiación puede ser otro factor de estrés más, haciendo que las plantas sean durante sus primeras etapas de desarrollo más susceptibles a los mismos. Debido a ello en nuestras plantas observamos uno de los síntomas descritos tras la infección con el TYLCV, la reducción del tamaño de las células epidérmicas (Khalil *et al.*, 2014).

El contenido de C, H, N y S de las plantas fue cuantificado con el objetivo de poder analizar los cambios bioquímicos originados por los distintos ambientes de luz UV estudiados. En ambos ensayos, no se observaron cambios en el nivel de C, H, N y S entre los tratamientos, excepto una reducción en el nivel de H de las plantas sanas pertenecientes al tratamiento *Absorbente-Control*. El hidrógeno es un elemento presente en biomoléculas esenciales, como carbohidratos, proteínas y lípidos, de modo que este dato por sí solo es insuficiente para evaluar los cambios bioquímicos originados como consecuencia de la radiación UV. Diversos autores han descrito cambios de toda índole en el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos de varias especies vegetales expuestas a radiación UV (Teramura, 1983; Santos *et al.*, 1993; Britz & Adamse, 1994; Strid *et al.*, 1994; Barsig & Malz, 2000).

En un sistema trófico, los cambios ocurridos en cada uno de sus niveles tienen influencia en los otros (Price, 1980). Es de esperar por tanto, que los cambios inducidos en las plantas por los ambientes especiales de luz UV, así como por acción de los virus, tengan influencia en sus plagas y los enemigos naturales de las mismas. Sin embargo, en el presente trabajo, tanto en el ensayo con planta sana como con planta infectada con virus, no se observó ningún efecto directo ni mediado por planta de los distintos regímenes de radiación UV estudiados sobre el desarrollo de *B. tabaci* ni de su parasitoide, *E. mundus*. En ambos ensayos, el número total de ninfas de *B. tabaci* encontradas en cada uno de los tratamientos fue significativamente igual. En contraste con nuestros hallazgos, Dáder *et al.* (2014) encontraron que el número de ninfas de esta misma especie de aleiródido era significativamente mayor en los tratamientos *Absorbente* y *Control-Absorbente*. Esta discrepancia en los resultados puede deberse a que en nuestro trabajo las moscas blancas solo estuvieron expuestas durante 72 horas a los distintos ambientes de luz estudiados mientras que, en el trabajo de Dáder y colaboradores (2014), *B. tabaci* estuvo expuesta a dichos ambientes durante todo el ensayo.

Debido a que los cambios inducidos en las plantas de tomate por los distintos ambientes de luz UV estudiados, no afectaron a la biología de *B. tabaci*, tampoco se observaron efectos mediados por planta y plaga sobre *E. mundus*. En ambos ensayos, el número de ninfas de *B. tabaci* parasitadas por *E. mundus* y no parasitadas (mosca blanca vivas, emergidas o en estado de pupa) fue significativamente igual bajo todos los tratamientos. Coincidiendo con nuestros resultados, Chiel y colaboradores (2006) y Fernández (2010b) observaron que en ausencia de luz UV, cuando *E. mundus* se encuentra en contacto directo con plantas infestadas con moscas blancas, la capacidad de parasitación de este insecto no se ve afectada, ya que para ello emplean estímulos táctiles y olfativos, en vez de estímulos visuales.

En la bibliografía no hay información sobre la influencia de la radiación en la alimentación de este parasitoide sobre su huésped (*host feeding*), pero a la vista de nuestros resultados se puede concluir que su efecto es nulo, ya que el número de ninfas de *B. tabaci* muertas (ninfas secas debidas a picaduras alimenticias hechas por *E. mundus* o muertas de forma natural) en los distintos tratamientos fue similar. Por lo

tanto, los parasitoides, al igual que en el proceso de parasitación, se basan en estímulos táctiles y olfativos para realizar el *host feeding*, demostrando que el estímulo visual no es necesario para realizar dicho proceso.

CAPÍTULO 6: COMPATIBILIDAD DE MALLAS TRATADAS CON BIFENTRIN CON *ERETMOCERUS MUNDUS* Y *AMBLYSEIUS SWIRSKII*¹

6.1. Introducción

Las mallas tratadas con insecticidas son utilizadas desde hace años en países del tercer mundo como barreras físico-químicas para el control de los mosquitos vectores de la malaria (*Anopheles spp.*, Diptera: Culicidae) (Hougard *et al.*, 2002; WHO, 2014a). Actualmente hay disponibles dos tipos de mallas tratadas con insecticidas: las más convencionales, que son pulverizadas o sumergidas en las soluciones insecticidas, y las más modernas, denominadas mallas insecticidas de larga duración (*Long Lasting Insecticidal Nets*: LLINs), las cuales llevan incorporado el tratamiento insecticida en el momento de su fabricación (Martin *et al.*, 2007). Los insecticidas más utilizados en este tipo de mallas son los piretroides ya que poseen un alto efecto de choque y una elevada potencia insecticida a bajas dosis, siendo a su vez relativamente seguros para las personas y usos domésticos (Zaim *et al.*, 2000; WHO, 2014b, 2015).

Desde hace algunos años se viene estudiando el posible salto de este tipo de mallas del ámbito de la entomología médica al agrario. Las mallas tratadas con insecticidas pueden reducir el nivel de plaga dentro de un invernadero de dos maneras distintas: mediante la exclusión debida al tamaño de poro y mediante la acción directa del insecticida, al impregnarse los insectos del mismo al atravesar la malla (Díaz *et al.*, 2004). La efectividad de este tipo de mallas en el control de insectos plaga ha sido puesta de manifiesto por diversos autores. Martin y colaboradores (2010) observaron, bajo condiciones de campo, la gran eficacia de una malla tratada con el acaricida dicofol en el control de la principal plaga de la berenjena africana, el ácaro tarsonémido *P. latus*, así como de ácaros del género *Tetranychus*. En invernaderos de tomate, el uso de una malla tratada con alfa cipermetrina redujo significativamente el nivel de infestación

---

¹ Compatibility of bifenthrin-treated nets with the predatory mite *Amblyseius swirskii* and the parasitic wasp *Eretmocerus mundus*. Laboratory, semi-field and field studies. *En redacción*.

Resultados del ensayo de campo en Almería analizados e interpretados por María del Mar Fernández.

de la mosca blanca *B. tabaci* (Martin *et al.*, 2014). De igual manera, varios autores han demostrado la adecuación de mallas tratadas con deltametrina para el control de lepidópteros y pulgones en ensayos de campo llevados a cabo con *Brassica oleracea* L. (Díaz *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006; Licciardi *et al.*, 2008). Más recientemente, estudios llevados a cabo por Dáder y colaboradores (2015) en pepino señalan que el uso de mallas tratadas con bifentrin no sólo reduce la entrada del pulgón *A. gossypii* y la incidencia de los virus transmitidos por el mismo [Virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*: CMV) y Virus del amarilleo de las cucurbitáceas (CABYV)], sino que también es compatible con el parasitoide *A. colemani*.

Hasta la fecha y en nuestro actual estado de conocimiento, aparte del estudio realizado por Dáder y colaboradores (2015), no hay datos disponibles sobre el efecto de este tipo de barreras físico-químicas en enemigos naturales. Debido a ello, y para mostrar la adecuación del uso de este tipo de mallas en programas de GIP, es necesaria la aportación de estudios que esclarezcan todas las posibles vías de contaminación de los enemigos naturales con dichas barreras, así como los efectos de las mismas en esos insectos beneficiosos.

6.2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo es el estudio de la toxicidad de una malla insecticida de larga duración (LLINs) tratada con bifentrin, bajo todos los posibles escenarios y vías de contaminación, sobre los enemigos naturales *E. mundus* y *A. swirskii*.

En la **Tabla 43** se resumen los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo, así como los parámetros evaluados en cada uno de ellos.

Tabla 43: Resumen de los ensayos llevados a cabo con las mallas tratadas con bifentrin y los parámetros evaluados en cada uno de ellos.

Tipo de ensayo	Ensayo	Enemigo natural	Parámetros evaluados
Laboratorio	Toxicidad por contacto	<i>E. mundus</i> y <i>A. swirskii</i>	Mortalidad tras 72 horas de contacto con la malla
	Preferencia entre la malla tratada y una control	<i>E. mundus</i> y <i>A. swirskii</i>	Porcentaje de adultos que atraviesan cada tipo de malla
			Mortalidad a las 72 horas de atravesar cada malla
Semicampo	Toxicidad en condiciones más reales	<i>E. mundus</i>	Número total de ninfas de <i>B. tabaci</i> (vivas, muertas y parasitadas por <i>E. mundus</i>) bajo cada tipo de malla
			<i>E. mundus</i> emergidos bajo cada tipo de malla
Campo	Toxicidad en condiciones de campo	<i>A. swirskii</i>	Densidades poblacionales de <i>A. swirskii</i> , <i>B. tabaci</i> y <i>F. occidentalis</i> a distintas distancias de la malla durante el ciclo del cultivo

6.3. Materiales y Métodos

6.3.1. Características de las mallas utilizadas

Las mallas utilizadas en este trabajo fueron suministradas por la casa comercial Ginegar Plastic Products Ltd (Kibbutz Ginegar, Israel)-Intelligent Insect Control (IIC) SAS (Castelnau Le Lez, Francia). Ambas mallas, la control y la tratada con insecticida, estaban hechas con hilos de polietileno y poseían las mismas características físicas (color amarillo, 10 x 10 hilos/cm y tamaño de poro 1 x 1 mm), salvo el tratamiento insecticida, aplicado sólo en la malla tratada.

La malla seleccionada fue una malla insecticida de larga duración (LLINs) tratada con bifentrín, insecticida que se incorporaba en el interior de sus fibras durante la fabricación. La dosis insecticida inicial era de 3,6 g/Kg de malla, según el fabricante. Por recomendación del mismo, la malla tratada se conservó hasta el momento de su utilización en una cámara frigorífica a 10-12°C y en ausencia de luz, con el fin de evitar la degradación del insecticida.

Al finalizar los ensayos de campo llevados a cabo en Almería, la malla fue recogida y enviada a IIC, con el fin de detectar la degradación insecticida que pudiese haber sufrido. Tras 4 meses de exposición a las condiciones de campo, la concentración de dicha malla tratada se redujo un 47% (1,939 g/Kg de malla).

6.3.2. Bifentrín

El bifentrín es un piretroide sintético no alfa ciano (Hougard *et al.*, 2002), con actividad insecticida y acaricida (Tomlin, 2009). Actúa por contacto e ingestión, tiene un elevado efecto de choque y es eficaz en el control de un amplio rango de plagas foliares pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera y Orthoptera (Tomlin, 2009).

Según su modo de acción, IRAC lo clasifica dentro del grupo 3A (Moduladores del canal de sodio). Este producto actúa sobre el sistema nervioso, interrumpiendo la función de las neuronas mediante la interacción con los canales de sodio (Tomlin, 2009).

El bifentrín está incluido en el anexo I de la Directiva Europea 91/414/CEE referente a las sustancias activas permitidas para su uso agrícola dentro del marco europeo (MAGRAMA, 2015c).

6.3.3. Evaluación de la toxicidad en laboratorio

6.3.3.1. Toxicidad por contacto

El objetivo de estos ensayos era la evaluación de los efectos tóxicos que causaba una malla tratada con el insecticida bifentrín, al entrar en contacto con los enemigos naturales *E. mundus* y *A. swirskii*.

En estos ensayos se emplearon las cajas desmontables diseñadas por Jacas & Viñuela (1994) y descritas en el apartado 4.3.2.2.2. Las placas de cristal que constituían dicha caja fueron forradas con las mallas a ensayar (malla control o tratada con bifentrín). Para evitar la huída de los enemigos naturales del interior de las cajas, el aro de metacrilato fue fijado tanto interior como exteriormente a las placas de cristal usando plastilina (**Figura 63**). Con el fin de que los enemigos naturales pudiesen alimentarse, en el interior de las cajas se dispusieron gotas de miel, en el caso de *E. mundus*, y comederos con huevos y larvas de *C. lactis* sobre polen comercial, en el caso de *A. swirskii*. En cada unidad de ensayo, se introdujeron 20 adultos de *E. mundus* o *A. swirskii*, haciéndose un total de 5 repeticiones por cada tipo de malla.

Figura 63: Detalle de las unidades de ensayo.

En estos ensayos también se tuvo en cuenta que la aireación de las unidades experimentales fuera la adecuada, como recomiendan las directrices de la OILB

(Hassan, 1994). Para ello, una vez que las cajas fueron trasladadas al interior del insectario, se conectaron mediante una aguja hipodérmica a un circuito de ventilación forzada (**Figura 64**).

Figura 64: Detalle de las unidades experimentales conectadas al circuito de ventilación forzada en el ensayo de toxicidad por contacto.

Los adultos estuvieron en contacto con las mallas durante 72 horas y al final de ese periodo de tiempo, se evaluó la mortalidad producida como consecuencia de dicho contacto.

6.3.3.2. Ensayos de preferencia

Una vez evaluada la toxicidad por contacto ocasionada por la malla tratada, se procedió a la evaluación de la preferencia entre dicha malla y una control por parte de los enemigos naturales, estudiándose además, los posibles efectos tóxicos ocasionados en ambas especies de agentes de biocontrol como consecuencia del contacto con el insecticida al atravesar la malla.

Para llevar a cabo estos ensayos se construyeron 4 estructuras de metacrilato en forma de Y, basadas en las descritas por Chiel *et al.* (2006). Los extremos de dichas estructuras eran libres y poseían unas dimensiones de 25 cm de longitud del brazo principal, 11 cm de los brazos laterales y 5 cm de diámetro. Para garantizar que la entrada de luz fuese únicamente cenital, todas las estructuras fueron forradas con film de color negro (**Figura 65**).

Figura 65: Detalle de las estructuras de metacrilato.

Los extremos superiores de cada estructura se cubrieron con las mallas a ensayar y se sujetaron mediante topes de metacrilato. En el interior de dichos topes, se introdujeron distintos atrayentes alimenticios, para controlar la elección de los insectos. En el caso de *A. swirskii*, el atrayente alimenticio utilizado fueron huevos y larvas de *C. lactis*, los cuales se fijaron a un trozo de cartulina usando goma tragacanto (Manuel Riesgo S.A., España) (**Figura 66**). El atrayente alimenticio del parasitoide fueron hojas de tomate infestadas con ninfas N2 de *B. tabaci* y gotas de miel distribuidas en las paredes de los topes de metacrilato (**Figura 67**). Para evitar que los insectos se escapasen, ambos extremos del tubo en Y se cerraron con Parafilm®.

Figura 66: Detalle del atrayente alimenticio (huevos y larvas de *C. lactis*) usado con el ácaro depredador *A. swirskii*.

Figura 67: Detalle del atrayente alimenticio (hojas de tomate infestadas con ninfas N2 de *B. tabaci* y miel) usado con el parasitoide *E. mundus*.

El brazo principal de las estructuras en Y descansaba sobre una placa de cristal forrada, de igual manera que los tubos, con film negro, para evitar la entrada de luz por dicha zona.

Una vez armados los tubos en Y, se procedió a la introducción de los enemigos naturales. Para ello, a través de un orificio de 0,5 mm situado en la base de la estructura, se introdujeron en cada uno de los tubos, 25 adultos de la especie de enemigo natural a ensayar.

Las unidades de ensayo fueron trasladadas al interior del insectario, donde, basándonos en pruebas preliminares y con el objetivo de facilitar el ascenso de los agentes de biocontrol por dichas estructuras, se colocaron verticalmente en los ensayos con *E. mundus* y horizontalmente, en los ensayos con *A. swirskii*. Además, para que la orientación de la luz en el interior del insectario no fuese determinante en la elección de los enemigos naturales, las unidades de ensayo se colocaron de la forma que muestra la **Figura 68**.

A las 24 horas del montaje del ensayo, se evaluó el número de adultos que habían alcanzado cada extremo de la estructura en Y. Dichos insectos fueron utilizados a su vez, para evaluar la mortalidad a corto plazo (72 horas) producida como consecuencia del contacto con el insecticida al atravesar la malla. Para ello, los adultos encontrados en cada uno de los extremos de cada tubo, fueron agrupados en cajas de metacrilato (7 cm diámetro, 3 cm altura) y alimentados *ad libitum*.

Figura 68: Orientación de las unidades de ensayo en el insectario. **B:** Malla tratada con bifentrín. **C:** Malla control.

6.3.4. Evaluación de la toxicidad sobre *E. mundus* en invernadero (semicampo)

Como se ha comentado en el capítulo 3, este ensayo se llevó a cabo en los invernaderos situados en los Campos de Prácticas de la E.T.S.I. Agrónomos. El objetivo de este ensayo era evaluar la compatibilidad de este tipo de barreras físicas con el parasitoide *E. mundus*, bajo unas condiciones de exposición más reales.

Para ello, se utilizaron las jaulas diseñadas por González-Núñez *et al.* (1998), pero introduciendo algunas modificaciones. Las unidades de ensayo, de dimensiones 25 x 25 x 60 cm, consistían en una estructura de madera, forrada por dos de sus caras de visillo, y las otras dos restantes, cubiertas una con las mallas a ensayar y otra, con una fina plancha de metacrilato, que facilitaba el seguimiento del ensayo. El visillo de uno de los extremos inferiores de las cajas estaba dispuesto en las mismas a modo de manga, para la correcta introducción de las plantas e insectos y el suministro de riego cuando fuese necesario. Debido a que el poro de las mallas a ensayar (1 x 1 mm) no era apropiado para evitar que los *E. mundus* se escapasen de las jaulas, se dispuso también sobre dichas mallas un visillo tupido (**Figura 69**). En total se construyeron 8 jaulas, 4 forradas con la malla tratada con bifentrín y las otras 4 restantes, con la malla control (**Figura 70**).

Figura 69: Detalle de las jaulas empleadas en el ensayo. Vista de los distintos laterales de las mismas.

Figura 70: Disposición de las unidades experimentales en el invernadero.

En el interior de cada jaula se introdujo una planta de tomate de 30 cm de altura, infestada con ninfas N2 de *B. tabaci* y, además se colocaron, colgadas en la planta, cartulinas de plástico en las cuales se dispusieron pequeñas gotas de miel, como alimento complementario para el parasitoide. En cada jaula se liberaron 50 adultos de *E. mundus* (30 hembras y 20 machos), los cuales se dejaron parasitando durante 72 horas.

Transcurridos 20 días desde la suelta de los parasitoides, cuando aproximadamente el 90% de los adultos de *E. mundus* habían emergido de las ninfas de mosca blanca parasitadas, las plantas fueron transportadas hasta el laboratorio donde se evaluaron los siguientes parámetros:

- Número total de ninfas de mosca blanca por tratamiento: secas (ya sea porque muriesen de forma natural o por picaduras alimenticias hechas por el parasitoide), parasitadas por *E. mundus* y no parasitadas.
- Número de *E. mundus* muertos y emergidos (las pupas de *E. mundus* no emergidas en el momento del análisis de las plantas, fueron separadas de las mismas e introducidas en placas Petri® de cristal, donde se mantuvieron bajo las condiciones ambientales descritas en el apartado 3.1.1.1., hasta su emergencia).

6.3.5. Evaluación de la toxicidad sobre *A. swirskii* en campo

Para evaluar, en condiciones reales de cultivo, la compatibilidad de este tipo de barreras físicas con el ácaro depredador *A. swirskii*, se llevaron a cabo ensayos de campo en El Ejido (Almería, España). Para ello, se utilizaron dos invernaderos comerciales gemelos, de orientación, distribución y dimensiones idénticas (4.000 m²). Las tareas realizadas a lo largo de este ensayo se describen en la **Tabla 44**.

El cultivo seleccionado para llevar a cabo este trabajo fue el pepino (*C. sativus*), variedad Valle. El marco de plantación utilizado fue de 1 planta cada 0,5 metros, y una separación entre líneas de 2 m. Como se puede observar en la **Tabla 44**, a los 43 días de la plantación del cultivo se colocaron las mallas ensayadas. Cada invernadero se cubrió con un tipo de malla, tratada con bifentrin o control, la cual se dispuso recubriendo las paredes de los mismos (**Figura 71**).

Tabla 44: Cronograma de las tareas realizadas a lo largo del ensayo de campo en Almería.

Fecha	Tarea
10/11/2013	Plantación del cultivo
28/12/2013	Colocación de las mallas
28/12/2013	Tratamiento insecticida- Tiacloprid*
02/01/2014	Tratamientos insecticidas- Acetamiprid y Pimetrozina*
04/01/2014	Tratamiento insecticida- Flonicamida*
07/01/2014	Liberación <i>A. swirskii</i>
23/01/2014	Inicio muestreos
11/04/2014	Muestreo final- Fin ensayo

*Tratamientos dirigidos a la eliminación de poblaciones establecidas de moscas blancas, pulgones y trips.

Figura 71: Detalle de la disposición de las mallas a lo largo de las paredes de los invernaderos en Almería.

Una vez colocadas las mallas, se realizaron varios tratamientos insecticidas con el objetivo de eliminar las plagas que pudiesen estar establecidas previamente en el cultivo. De esta forma se aseguró que la presencia de plagas en cultivo tras dichos tratamientos, se debiese exclusivamente a la entrada de los mismos a través de las mallas. Los plaguicidas seleccionados fueron tiacloprid, acetamiprid, pimetrozina y flonicamida, destinados a la eliminación de moscas blancas, pulgones y trips. Todos ellos se utilizaron a las dosis máximas registradas para su uso en campo (**Tabla 45**).

A los 10 días de la colocación de las mallas, se liberaron los enemigos naturales en el interior de los invernaderos. Para ello se usaron los sobres Swirski-Mite Plus® (sobres de papel con 250 *A. swirskii* mezclados con salvado y el ácaro presa *C. lactis*), comercializados por Koppert Biological Systems. La dosis de suelta empleada en este estudio fue de 100 *A. swirskii* m⁻².

Tabla 45: Características principales de los productos insecticidas utilizados en el ensayo de campo en Almería, destinados a la eliminación de moscas blancas, trips y pulgones que pudiesen estar establecidos en el cultivo previamente a la colocación de las mallas.

Ingrediente Activo (i.a.)	Modo de acción (IRAC)	Producto comercial/ Contenido i.a.	Casa comercial	Dosis máxima hortícolas
Acetamiprid	Agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina (neonicotinoide)	Epik ® / 20 % SP	Sipcam Inagra S.A.	35 g p.c./hl
Flonicamida	Modulador de los órganos cordotonaes	Teppeki ® / 50 % WG	Belchim Crop Protection España S.A.	12 g p.c./hl
Pimetrozina	Modulador de los órganos cordotonaes	Plenum ® / 50 % SG	Syngenta Agro S.A.	50 g p.c./hl
Tiacloprid	Agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina (neonicotinoide)	Calipso 480 SC ® / 48 % SC	Bayer Cropscience S.L.	30 cc p.c./hl

SP, Polvo soluble en agua; WG, Granulado dispersable en agua; SG, Gránulos solubles en agua; SC, Suspensión concentrada.

Tras la liberación de los ácaros depredadores, a los 16 días, comenzaron los muestreos. Los muestreos fueron semanales y se realizaron en las bandas Este, Sur y Oeste de los invernaderos, con el objetivo de analizar tanto los laterales como el centro de los mismos. En cada una de esas bandas, la distribución del enemigo natural y de sus presas fue monitorizada en líneas paralelas a distancias de 0, 4 y 12 m de las mallas estudiadas (**Figura 72**). Las densidades poblacionales de *B. tabaci*, *F. occidentalis* y *A. swirskii* (número medio de individuos por hoja) fueron monitorizadas en 30 hojas por línea, durante 12 semanas.

Figura 72: Esquema de las líneas de muestreo en cada banda a lo largo de los invernaderos.

6.4. Resultados

6.4.1. Evaluación de la toxicidad en laboratorio

6.4.1.1. Toxicidad por contacto

En la **Figura 73** se recogen los datos referentes a la mortalidad de los adultos de *A. swirskii* y *E. mundus*, tras la exposición por contacto, durante 72 horas, a las mallas estudiadas. Como se puede observar, esta forma de exposición, en los dos enemigos naturales, produjo diferencias significativas entre ambas mallas. El contacto con la malla tratada con bifentrín causó una mortalidad en *A. swirskii* del 92% y en *E. mundus*, del 99%.

Figura 73: Mortalidad media (%) de los adultos de *A. swirskii* y *E. mundus* tras el contacto durante 72 horas con las mallas control y tratada con bifentrín. *Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) para ambos enemigos naturales. ^a $t=26,2316$; $P < 0,0001$. ^b $W=0$; $P=0,0094$.

6.4.1.2. Ensayos de preferencia

Los resultados referentes al porcentaje de adultos de *A. swirskii* y *E. mundus* que eligieron entre cada tipo de malla, se resumen en la **Figura 74**. No se detectaron diferencias significativas en la elección entre las mallas por parte de los enemigos naturales estudiados.

Figura 74: Porcentaje medio de adultos de *A. swirskii* y *E. mundus* que escogieron cada tipo de malla. A. Valor referido al total de adultos que atravesaron cada malla. B. Valor referido al total de adultos introducidos en cada estructura en Y. *Los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^a $t=2,16395$; $P=0,0736$. ^b $t=-0,9494$; $P=0,3791$. ^c $W=10$; $P=0,6423$. ^d $t=0,9737$; $P=0,3678$.

En cuanto a la mortalidad a corto plazo (72 horas) ocasionada como consecuencia del contacto con el insecticida al atravesar la malla, en la **Figura 75** se puede observar que ni para *A. swirskii*, ni para *E. mundus* hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas mallas.

Figura 75: Mortalidad media de *A. swirskii* y *E. mundus* 72 horas después de atravesar cada tipo de malla.*Los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^a $t=0,3177$; $P=0,7614$. ^b $W=5,5$; $P=0,5589$.

6.4.2. Evaluación de la toxicidad sobre *E. mundus* en invernadero (semicampo)

En la **Tabla 46** se recogen los datos referentes al número medio total de ninfas de *B. tabaci* (vivas, muertas y parasitadas por *E. mundus*) introducidas en cada tipo de jaula. A la vista de esta tabla se puede inferir que dicho número fue significativamente igual en todos los tratamientos.

Los resultados referentes al número de ninfas de *B. tabaci* parasitadas por *E. mundus*, muertas (ninfas secas debidas a picaduras alimenticias hechas por los parasitoides o muertas de forma natural) y vivas (moscas blancas emergidas o en estado de pupa) presentes en cada tratamiento, se resumen en la **Figura 76**. Como se puede observar, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para ninguno de dichos parámetros.

Tabla 46: Número medio de ninfas de *B. tabaci* introducidas en cada tipo de jaula en los ensayos de invernadero (semicampo).

Tipo de malla	Nº medio total de ninfas de <i>B. tabaci</i> ^a
Control	82,75 ± 7,70 a
Tratada con bifentrín	75 ± 11,27 a
<i>t</i>	-0,567654
P	0,5908

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).^aNúmero medio total de ninfas: vivas, muertas y parasitadas por *E. mundus*.

Figura 76: Ninfas de *B. tabaci* parasitadas por *E. mundus*, muertas y vivas según el tratamiento en los ensayos en invernadero (semicampo). *No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P \geq 0,05$) para ninguno de los parámetros evaluados. ^a $t = -0,628481$; $P = 0,5528$. ^b $t = -0,969861$; $P = 0,3696$. ^c $t = -0,051053$; $P = 0,9609$.

La **Tabla 47** muestra el número de *E. mundus* emergidos y muertos (en los estados inmaduros o durante la emergencia), no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos para ambos parámetros.

Tabla 47: Número de adultos emergidos y muertos de *E. mundus* según el tratamiento en los ensayos de invernadero (semicampo).

Tratamiento	Nº de <i>E. mundus</i> emergidos	Nº de <i>E. mundus</i> muertos ^a
Control	41,5 ± 3,30 a	1,5 ± 0,64 a
Tratada con bifentrin	37,25 ± 5,76 a	1,5 ± 0,29 a
<i>t</i> o <i>W</i>	-0,639652	8
<i>P</i>	0,5460	0,8794

En cada columna los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$). ^a*E. mundus* muertos: muertos durante la emergencia o en los estados inmaduros.

6.4.3. Evaluación de la toxicidad sobre *A. swirskii* en campo

En la **Tabla 48** se muestran los resultados del modelo de efectos mixtos lineales (LMM). Como se puede observar en dicha tabla, el test estadístico para la interacción de las dos variables fijas, “distancia a la malla*tipo de malla”, no es significativo, por lo que no existe una interacción importante entre las mismas. Debido a ello, se pueden sacar conclusiones del comportamiento de cada una de las variables estudiadas de manera independiente. Por otro lado, el LMM nos muestra significación en ambas variables, “Tipo de malla” y “Distancia a la malla”, al hacer una comparación entre sus niveles (**Tabla 48**).

Los datos referentes al número medio de ácaros e insectos plaga por hoja según el tipo de malla, se muestran en la **Figura 77**. Se puede concluir que tanto el número de insectos plaga como el de ácaros fue significativamente mayor en el invernadero control.

Los datos medios de ácaros e insectos plaga por hoja a diferentes distancias de la malla (**Figura 78**) nos indican que, tanto el nivel de plaga como el de *A. swirskii* disminuyen significativamente según se va alejando de la malla.

Tabla 48: Significación de las variables fijas estudiadas y de la interacción de las mismas a lo largo del ensayo de campo en Almería, según el modelo de efectos mixtos lineales (LLM).

Número de <i>F. occidentalis</i> por hoja	F	P ^a	AIC ^b
Tipo de malla	118,7	<0,001	13256,603
Distancia a la malla	122,88	<0,001	
Distancia a la malla x Tipo de malla	1,74	0,176	
Número de <i>B. tabaci</i> por hoja	F	P ^a	AIC ^b
Tipo de malla	17,89	<0,001	14911,12
Distancia a la malla	36,7	<0,001	
Distancia a la malla x Tipo de malla	0,27	0,766	
Número de <i>A. swirskii</i> por hoja	F	P ^a	AIC ^b
Tipo de malla	7,72	0,005	14663,538
Distancia a la malla	101,81	<0,001	
Distancia a la malla x Tipo de malla	0,1	0,9	

^aP<0,05: Significación entre los distintos niveles de las variables o de la interacción de las mismas. ^bEn todos los casos la mejor estructura de covarianza fue la Diagonal, escogida por el menor valor del criterio de Akaike (AIC).

Figura 77: Número medio de individuos por hoja según el tipo de malla durante el ensayo de campo realizado en Almería. *Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P<0,05) para cada organismo estudiado.

Figura 78: Número medio de individuos por hoja según la distancia a la malla durante el ensayo de campo realizado en Almería. *Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) para cada organismo estudiado.

6.5. Discusión

6.5.1. Evaluación de la toxicidad en laboratorio

6.5.1.1. Toxicidad por contacto

El contacto directo, durante 72 horas, con la malla tratada con bifentrin resultó altamente tóxico para ambas especies de enemigos naturales. Debido a la baja selectividad de este insecticida-acaricida, los resultados obtenidos eran esperables. Como está recogido en numerosas publicaciones, el bifentrin es tóxico para una amplia gama de organismos de biocontrol, entre los que se encuentran parasitoides como *Aphidius rhopalosiphii* De Stefani-Perez (Hymenoptera: Braconidae), *T. chilonis*, *E. formosa*, *Encarsia pergandiella* Howard, *E. eremicus*, *E. orientalis* y *Eretmocerus tejanus* Rose & Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae) (Jones *et al.*, 1995; Jansen, 1996; Naranjo *et al.*, 2001; Sterk *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2010), polinizadores como

Bombus terrestris L. (Hymenoptera: Apidae) (Besard *et al.*, 2010; Mommaerts & Smagghe, 2011) y depredadores como *P. persimilis*, *Orius insidiosus* Say (Hemiptera: Anthocoridae), *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister) y *Ceraeochyrsa cubana* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) (Schuster & Stansly, 2000; Cote *et al.*, 2002; Miles & Dutton, 2003; Sterk *et al.*, 2003; Alzoubi & Cobanoglu, 2008; Albernaz *et al.*, 2009).

Concretamente, corroborando nuestros resultados, Jones y colaboradores (1995) demostraron que la exposición a residuos frescos de bifentrin, a una dosis de 90 g ia/ha, reducía la supervivencia de los adultos de *E. mundus* a un 8,5%, tras 96 horas de contacto.

Según nuestro conocimiento, no hay datos referentes a la toxicidad de este insecticida-acaricida sobre *A. swirskii*. Sin embargo, ensayos llevados a cabo por Miles & Dutton (2003) con la especie cercana *A. californicus* demostraron, en ensayos de semicampo, que el bifentrin era altamente tóxico para dicha especie de ácaro.

6.5.1.2. Ensayos de preferencia

Los piretroides son los insecticidas más utilizados en la fabricación de mallas tratadas debido tanto a su alta potencia insecticida y efecto de choque (Zaim *et al.*, 2000; WHO, 2014b, 2015), como a sus propiedades de repelencia e irritabilidad (Takken, 2002; Kawada *et al.*, 2014). Estas propiedades de los piretroides también son extensibles a algunas especies de organismos beneficiosos, entre los que se encuentran polinizadores, parasitoides y depredadores (Desneux *et al.*, 2007; Alyokhin *et al.*, 2010). La repelencia de los piretroides en enemigos naturales se traduce, principalmente, en dos efectos subletales marcados: un aumento de la movilidad para tratar de huir de las zonas tratadas y una reducción de la depredación o la parasitación. Estos efectos se han observado en especies como *A. rhopalosiphi*, *Acanthaspis pedestris* Stål (Hemiptera: Reduviidae), *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) y *C. carnea* en presencia de deltametrina y cipermetrina (Desneux *et al.*, 2007; García, 2011). En otros casos, como por ejemplo en *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae), los volátiles presentes en el medio ambiente, como el piretroide esfenvalerato, pueden interferir con el olor de los recursos

alimenticios, enmascarándolos o haciéndolos repulsivos (García, 2011; Alyokhin *et al.*, 2010).

Sin embargo, estudios llevados a cabo por Moore & Miller (2006), con el chinche de las camas *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae), rompieron con la tónica anteriormente descrita, porque en ensayos de elección demostraron que los piretroides lambda cihalotrin, bifentrin, deltametrina y permetrina no producían repelencia en este insecto.

En nuestro estudio, y acorde con los hallazgos realizados por Moore & Miller (2006), no se observó ningún efecto de repelencia ni en *A. swirskii*, ni en *E. mundus*. Resultados similares fueron obtenidos por Amor (2013) con los depredadores *N. tenuis* y *O. laevigatus*, usando una metodología y una malla LLINs idénticas a las usadas en el presente trabajo, en ensayos de elección.

Por otro lado, el contacto con el insecticida al atravesar la malla no afectó a la mortalidad a corto plazo (72 horas) de ninguna de las especies de enemigos naturales estudiadas. Estos resultados pueden ser atribuidos tanto al tamaño del poro de la malla utilizada, como al modo de contacto de los enemigos naturales con la misma. La longitud de ambos organismos de control biológico [$\varnothing$ *A. swirskii*: 0,5 mm de largo y 0,3 mm de ancho (Malais & Ravensberg, 2006); $\varnothing$ *E. mundus*: 0,67 mm de largo y 0,19 mm de ancho (Mercet, 1931)] es inferior al poro de la malla, 1 x 1 mm, por lo que pudieron atravesar la misma sin apenas entrar en contacto con ella y, por lo tanto, sin apenas contaminarse. Además, los enemigos naturales tan sólo entraron en contacto brevemente con la malla en el momento de atravesarla, de modo que la contaminación con el insecticida fue mínima.

Idénticos resultados se han obtenido con los insectos *N. tenuis* y *O. laevigatus* (Amor, 2013). Estos chinches depredadores son altamente sensibles al contacto prolongado (72 horas) con una LLINs tratada con bifentrin. Sin embargo, la contaminación con el insecticida al atravesar la malla, no produce un efecto marcado en la mortalidad de dichos enemigos naturales, a pesar de su mayor talla.

6.5.2. Evaluación de la toxicidad sobre *E. mundus* en invernadero (semicampo)

En ensayos de semicampo, bajo unas condiciones de exposición más reales, la malla tratada con bifentrin resultó ser compatible con el parasitoide *E. mundus*.

La acción de este enemigo natural no se vio reducida como consecuencia de la malla estudiada, debido a que en este tipo de ensayos, los enemigos naturales no están expuestos de una forma forzada y continuada a la malla, como en los ensayos de laboratorio, pudiendo evitar con facilidad el contacto con el insecticida.

Reforzando nuestros hallazgos, Amor (2013) observó de igual manera la compatibilidad de los enemigos naturales *N. tenuis* y *O. laevigatus* con la misma malla LLINs objeto de estudio del presente trabajo, en ensayos de semicampo.

6.5.3. Evaluación de la toxicidad sobre *A. swirskii* en campo

Los resultados obtenidos en el ensayo de campo, muestran como la malla tratada con bifentrin es capaz de reducir la entrada de la mosca blanca *B. tabaci* y del trips *F. occidentalis*.

La efectividad de este tipo de mallas en el control de plagas se basa tanto en el insecticida empleado en su elaboración como en el tamaño de poro de las mismas. Sin embargo, en nuestro trabajo, la efectividad de la malla en el control de *B. tabaci* se debe en mayor medida a la acción del insecticida, ya que esta especie de mosca blanca tiene un tamaño lo suficientemente pequeño [*B. tabaci*: 0,8-0,95 mm de largo y 0,5 de ancho (Byrne & Bellows, 1991)] para atravesar dicha malla. Liu & Stansly (1995), corroborando nuestros resultados, mostraron la alta repelencia y toxicidad del bifentrin sobre adultos de *B. tabaci*, tras 24 horas de contacto con residuos de distintas concentraciones (0,03-0,12 g ia/l). Por otro lado, en la bibliografía, la información sobre el control de moscas blancas empleando mallas tratadas con insecticidas es contradictoria. Martin y colaboradores (2014) obtuvieron prometedores resultados en el control de *B. tabaci* empleando una malla tratada con el piretroide alfacipermetrina, cuyo diámetro de poro era similar al de la LLNTs objeto de estudio del presente trabajo. Sin embargo y en contraste con nuestros resultados, Dáder y colaboradores (2015)

comprobaron que una malla tratada con bifentrin no era suficiente para evitar la infestación del cultivo con *B. tabaci*, y de igual manera, Díaz y colaboradores (2004), observaron el mismo efecto sobre *Aleyrodes proletella* L. (Hemiptera: Aleyrodidae) usando una malla tratada con deltametrina. Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de la combinación en las mallas tratadas de la materia activa, la dosis y el tamaño de poro adecuados para controlar eficazmente a esta especie de aleiródido.

Frankliniella occidentalis es conocida por sus altos niveles de resistencia a insecticidas como organoclorados, organofosforados, carbamatos, spinosinas y piretroides, entre los que se encuentra el bifentrin (Immaraju *et al.*, 1992; Bielza, 2008). A pesar de ello, este insecticida sigue siendo eficaz en el control de trips, ya que como comprobaron Chau y colaboradores (2005), dos aplicaciones de bifentrin pueden mantener la población del trips por debajo del umbral económico de daños. Al igual que en el caso de *B. tabaci*, la efectividad de la malla empleada en nuestro estudio en el control de *F. occidentalis*, se debe principalmente a la acción del insecticida, ya que, a pesar de que el tamaño de poro de la malla LLNTs estudiada es menor que el tamaño del trips (1,2-1,6 mm de largo y 0,5 mm de ancho: Lacasa & Llorens, 1996), estos, al ser aplanados, pueden atravesar los poros de la malla, impregnándose del insecticida en dicho proceso. Del mismo modo que en nuestro estudio, Martin y colaboradores (2010) comprobaron que una barrera física tratada previamente con dicofol era suficiente para controlar de forma exitosa los ácaros fitófagos *Tetranychus* spp. y *P. latus*, de tamaño menor que *F. occidentalis*, debiéndose principalmente a la acción del insecticida.

Finalmente, la densidad poblacional de *A. swirskii* encontrada en el invernadero cubierto con la malla LLNTs fue inferior a la encontrada en el control. Este efecto en los niveles poblacionales del ácaro depredador no fue debido a la malla tratada en sí, sino a la densidad de plaga presente en cada invernadero. Como se comprobó en los ensayos previos al estudio en campo, el contacto ocasional con la malla tratada con bifentrin no aumentó la mortalidad de *A. swirskii*, por lo que se puede pensar que en el ensayo de campo, dónde el ácaro no entró en contacto con la malla tratada o lo hizo de forma ocasional, la malla LLNTs no afectó de forma directa a este fitoseido. El motivo de esta reducción poblacional fue el mejor establecimiento del ácaro en aquel invernadero con mayor nivel de plaga. Nomikou y colaboradores (2001) y Calvo y

colaboradores (2011) observaron que *A. swirskii* incrementa sus poblaciones cuando las densidades de *B. tabaci* son altas. Además, Calvo y colaboradores (2011) y Messelink y colaboradores (2008), comprobaron que una dieta combinada de *F. occidentalis* y *B. tabaci* mejoraba el establecimiento de *A. swirskii*. Para corroborar lo anteriormente expuesto, también se puede observar que las densidades poblacionales de las plagas en el cultivo fueron disminuyendo según aumentaba la distancia a la malla, y en aquellas líneas donde el nivel de plaga era menor, también lo era el de *A. swirskii*.

CHAPTER 7: DEEP SEQUENCING OF THE BACTERIAL COMMUNITY IN PARASITIC WASPS AND ITS IMPACT ON EXPOSURE TO ABAMECTIN INSECTICIDE¹

7.1. Introduction

Bacteria and insects have evolved together for centuries developing different kinds of interactions (Engel & Moran, 2013). Endosymbiotic bacteria are well known as an extreme example of mutualism in which the host is completely dependent and facilitates the endosymbiont presence. For the more common omnipresent symbionts different beneficial functions have been reported. Host associated bacteria take part in a great diversity of processes such as the amelioration of digestion and the nutrient provisioning (Gilliam, 1997; Minard *et al.*, 2013), the protection against parasitoids and pathogens (Oliver *et al.*, 2003; Koch & Schmid-Hempel, 2011) or the degradation of xenobiotics products (Kikuchi *et al.*, 2012). Aside from the positive aspects of bacteria they are also known as the etiological agents of different diseases. This diverse pallet of interactions with insect health and functionality makes bacteria very useful tools in helping us to manage both beneficial and pest insects (Engel & Moran, 2013).

The continued use of pesticides can trigger the development of resistances in insects. There are many resistance mechanisms but detoxification by enzymes (esterases, glutathione-S-transferases or cytochrome P450-dependant monooxygenases (Yu, 1996; Feyereisen, 1999; van Leeuwen *et al.*, 2005) is acknowledged as one of the most frequent. Integrated pest management programs (IPM) try to avoid the development of resistances reducing the reliance on chemical control. Despite this fact, the joint use of pesticides and natural enemies compatible with these chemicals is still needed to control several kinds of pests, like whiteflies.

A recent research (Kikuchi *et al.*, 2012) has showed that some bacterial symbionts

---

¹M^a del Mar Fernández, Ivan Meeus, Annelies Billiet, Filip Van Nieuwerburgh, Dieter Deforce, Peter Vandamme, Elisa Viñuela & Guy Smagghe. Deep sequencing of the bacterial community in parasitic wasps and its impact on exposure to abamectin insecticide. En proceso de revisión, próximamente será enviado a la revista *PLoS ONE*.

can confer pesticide resistance to the host insects. Among the bacterial groups that can detoxify pesticides is the genus *Arthrobacter*, which it is known to possess a large diversity of enzymes that can metabolize different xenobiotics (Hayatsu *et al.*, 2001; Shapir *et al.*, 2007). However, nothing is known about the influence of *Arthrobacter* enzymes might have on the insects' susceptibility to pesticides.

7.2. Objectives

The objectives of this work were firstly to identify for the first time, the bacteria present in the three parasitic wasp species: two strains of *E. mundus* (to find out whether the biotype differed), *E. eremicus* and *E. formosa* by using the deep sequencing technology. Secondly, to identify the different *Arthrobacter* species present to evaluate their esterase activity. In addition, pesticide and antibiotic assays were also performed to assess the influence of these bacterial enzymes in the susceptibility of *E. mundus* to abamectin, a pesticide with an ester bond.

7.3. Materials and Methods

7.3.1. Insects

E. mundus, *E. eremicus* and *E. formosa* were purchased from Biobest Biological Systems (Westerlo, Belgium). A different strain of *E. mundus* was also obtained from the commercial insectary Agrobío based in Spain (La Mojonera, Almería). The parasitoids were packaged in bottles with 5,000 pupae mixed with sawdust.

Upon arrival in the laboratory, pupae were separated in groups of 100, placed in glass petri dishes (2 cm high and 6 cm in diameter) and kept in the dark in a refrigerator (8°C). To obtain adults for the assays, pupae were moved to a climatized chamber (Incubator MLR-352, Panasonic, Osaka, Japan) at 25 ± 2 °C, 75 ± 5 % relative humidity and 16L:8D photoperiod. After 2 days, adults started to emerge and they were transferred to ventilated plastic cages (5 cm high and 12 cm in diameter) in groups of 25, and provided with small droplets of honey as food.

7.3.2. DNA Extraction

A total DNA extraction was performed on a group of 25 adults of 4 days old because of the small size of about 1 mm of the parasitic wasps. The homogenized insects were incubated 1 h at 56°C in 100 µl of 10% Chelex (Instagene™ Matrix, BIO-RAD), 100 µl of MQ water and 10 µl of proteinase K. Then, the tubes were heated at 97°C for 15 min and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. The supernatants (150 µl of DNA) were transferred into new tubes and were kept at -20 °C until analysis.

7.3.3. Next G sequencing: Illumina sequencing and taxonomic identification

The composite 515F and 806R primers designed by Caporaso *et al.* (2011) were used to amplify the variable V4 region of the rRNA. Aside from the 16S primer site, the 806R composite primers contain a different nucleotide barcode for each species and the Illumina adapters sequences that are necessary for the bridge amplification on the Illumina MiSeq flow cell (Caporaso *et al.*, 2011). The barcodes used were 806rcbc31, 806rcbc32, 806rcbc33 and 806rcbc34 (Caporaso *et al.*, 2011) within a larger run of in total 120 barcodes (Meeus *et al.*, 2015). Double stranded DNA PCR products were quantified with the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent (Life Science technologies) on an Infinite M200 microplate reader (Tecan). Cluster generation and 2x150 paired-end sequencing was performed in one Illumina Miseq flowcell using an Illumina MiSeq Reagent Kit v2 as described in Meeus *et al.* (2015).

All demultiplexed paired-end reads (i.e. 108,361), were analyzed with the mothur software v.1.31.1 (Mothur software, 2014) mainly following the standard operating procedure available on Schloss *et al.* (2009) and Kozich *et al.* (2013). An OTU (operational taxonomic unit) based clustering approach with a 0.03 cutoff level was followed. No ambiguous DNA base pairs were allowed, this resulted in a loss of 53% of the reads and 51,123 sequences remained. The UCHIME algorithm (Edgar *et al.*, 2011), with the abundant sequences as reference, removed possible chimeras and 50,311 remained ready for analysis.

To exclude sequencing errors only the OTUs having more than 0.5% of the sequence reads in any sample were kept. Each OTU was classified after alignment with the Bacterial SILVA SEED database. Each OTU was confirmed by BLASTn of its representative sequence against the 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) of GenBank.

7.3.4. Next 16S rDNA Nested PCR, cloning and sequencing of *Arthrobacter*

16S rDNA gene of Actinobacteria (*Arthrobacter* is a bacterial genus belonging to the phylum Actinobacteria) were amplified from insects DNA extracts using the universal bacterial primer pair Eub8F and 984yR (Bakke *et al.*, 2011) and the actinobacterial primer pair S-C-Act-235-a-S-20 and S-C-Act-878-a-A-19 (Stach *et al.*, 2003) (**Table 49**). The external PCR reaction was carried out in 25 µl volumes containing 0.3 µM of each universal bacterial primers, 0.3 mM of deoxyribonucleotide triphosphates, 1.25 U of Taq polymerase (Invitrogen), 1x PCR buffer, 2 mM of MgCl₂, 5 µl of insects DNA extract as template and sterile water up to 25 µl. PCR was performed in a robocycler (Labcycler, Sensoquest). After 2 min of denaturation at 94°C and 25 thermal cycles of 30 s at 95°C (denaturation), 30 s at 50°C (annealing) and 1 min at 72°C (elongation), PCR was finished by an final elongation step at 72°C for 3 min.

Table 49: Bacterial primers used to amplify the 16S rDNA gene of Actinobacteria.

PCR	Primer	Primer sequence
External PCR	Eub8F	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'
External PCR	984yR	5'- GTAAGGTTCYTCGCGT - 3'
Internal PCR	S-C-Act-235-a-S-20	5'- CGCGGCCTATCAGCTTGTTG -3'
Internal PCR	S-C-Act-878-a-A-19	5'- CCGTACTCCCCAGGCGGGG -3'

The internal PCR reaction was carried out in 30 µl volumes containing 0.3 µM of each actinobacterial primers, 0.3 mM of deoxyribonucleotide triphosphates, 1.5 U of Taq polymerase (Invitrogen), 1x PCR buffer, 2 mM of MgCl₂, 1.2 µl of diluted external PCR products as template and sterile water up to 30 µl. PCR was performed according to the conditions and cycling parameters described by Stach *et al.* (2003).

To check their size, nested PCR products were applied on a 1.5% agarose gel (wt.vol.⁻¹) and visualized via ethidium bromide staining and UV-light. Each PCR was controlled by using *Bifidobacterium*-DNA plasmid as a positive control and a negative control (non-template control).

The nested PCR products were cloned using a pJET1.2 vector (CloneJET PCR cloning kit, Fermentas) (**Figure 79**) and were sent for sanger-sequencing to LGC Genomics (Germany, Berlin). The clone sequences were identified by comparison with the 16S ribosomal RNA database at GenBank by using BLAST (NCBI).

Figure 79: Recombinant clones on a carbencilin-containing LB agar plate.

7.3.5. Bacterial protein extraction and esterase activity

Three bacteria, having the closest match with the *Arthrobacter* species present in the parasitic wasp, were obtained from the BCCM^{TM}/LMG bacteria collection (Laboratory of Microbiology, Ghent University, Belgium): *A. aurescens* Phillips 1953^{AL} (LMG 3815^T), *A. nicotinovorans* Kodama, Yamamoto, Amano and Amichi 1992^{VP} (LMG 16253^T) and *A. uratoxydans* Stackebrandt, Fowler, Fiedler and Seiler 1984^{VL} (LMG 16117). *Lactobacillus kunkeei* Edwards, Haag, Collins, Hutson and Huang 1998^{VL} (LMG 18925), used as negative control in the enzymatic assay, was also obtained from the BCCM^{TM}/LMG.

The *Arthrobacter* strains were grown on Trypton Soy agar at 30°C for 24 h and *L. kunkeei* was grown on MRS agar at the same temperature for 48 h. Cell-free extracts were prepared of 100 mg bacteria (wet weight), suspended in 1 ml of a 0.1 M Sodium Phosphate (SP) buffer (pH 7.5) by sonication on ice, during 5 min. After the sonication, a bead beating was done using 0.3 g of 0.1 mm zirconia beads (45 seconds, speed 6.5).

The homogenates were centrifuged at maximum speed (20,817 rpm) for 3 min at 4°C, then, the supernatants were centrifuged again at 12,000 rpm for 5 min. The supernatants, protein extracts, were poured in clean Eppendorf tubes.

S. littoralis was used as positive control in the measure of the esterase activity. One gut of the fifth instar larvae were dissected out, homogenized in SP buffer and then centrifuged at 12,000g for 15 min at 4°C. The resultant supernatant was diluted 10x and used as enzyme solution.

All protein concentrations were measured with a Coomassie (Bradford) protein assay kit (Thermo Scientific) (**Figure 80**).

Figure 80: Coomassie (Bradford) protein assay.

For the esterase activity towards α -naphthyl acetate (α -NPA), procedures were slightly adapted from van Leeuwen *et al.* (2005). The reaction mixture consisted of 150 μ l of substrate solution (1.5×10^{-4} M α -NPA containing 10% acetone and 0.1 M SP buffer pH 7.5) and 75 μ l of enzyme solution. The incubation time was 30 min at 30 °C. After this period, the enzyme activity was terminated by addition of 37.5 μ l Fast Blue RR salt-sodium dodecyl sulfate reagent and was incubated during 15 minutes at 30°C (**Figure 81**). The rate of α -naphthol formation was monitored at 500 nm with a Powerwave X340 microplate reader and converted to specific activity using a standard curve of α -NA in SP buffer. Experiment consisted of three replicates per bacteria studied and controls.

Figure 81: Esterase activity assay.

7.3.6. Pesticide (residual contact test) and antibiotic assay

The purpose of this assay was to evaluate a possible change in the susceptibility of *E. mundus* adults to abamectin, after being treated with the broad-spectrum antibiotic tetracycline (against Gram- and Gram+ bacteria).

In a first step, an assay to find a tetracycline concentration with no negative fitness effects (mortality) on the parasitoids was performed. The antibiotic was offered mixed with honey at concentrations ranging from 0 up to 400 ppm for 4 consecutive days. Five replicates for each tetracycline concentration and 20 *E. mundus* adults per replicate were used.

In a second step, a residual contact test was developed. Two lines of *Eretmocerus* insects were used in this assay: those fed *ad libitum* during one day with honey and a non-toxic concentration of tetracycline to (100 ppm) and those fed with only honey.

To evaluate the residual contact activity of abamectin, procedure was similar to that described in chapter 4: adults were exposed to fresh pesticide residue using the dismantable cages designed for *P. concolor* by Jacas & Viñuela (1994). The two square glass plates of ceiling and floor (12 sideways; 0.5 cm high) were treated under the Potter precision spray tower with a deposit of $1.5\text{--}2\text{ mg cm}^{-2}$ (1 ml, 55 kPa), at room temperature. Abamectin (Vertimec®, 1.8% EC, Syngenta Agro S.A.) was applied at the maximum field recommended concentration (MFRC) for use in Spain: 18mg active ingredient (a.i.) per litre. Once dry, cages were mounted and groups of 10♀ and 10♂ of *E. mundus* were introduced. Insects were fed *ad libitum* with honey.

Four treatments were done: insects exposed to abamectin and fed with tetracycline in the honey during one day (ABA+TETRA treatment), insects exposed to abamectin and fed with untreated honey (ABA treatment), insects exposed to distilled water and fed with tetracycline in the honey during one day (TETRA treatment), and insects exposed to distilled water and fed with untreated honey (CONTROL treatment). Five replicates were used for each treatment and mortality was recorded 72 hours after exposure.

7.4. Results

7.4.1. Next G sequencing

The raw data are publicly available on NCBI's sequence read archive (SRA) under accession number SRP059636. The 6 major bacterial phyla present in the three species of parasitic wasps of this study were: Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Deinococcus-Thermus, Bacteroidetes and Fusobacteria. Analyses of the overall communities profile indicated that the most dominant groups in all the samples were Firmicutes and Proteobacteria (**Table 50**).

The most representative bacterial class in *E. eremicus* and the Belgian strain of *E. mundus* was Bacilli, while Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria were predominant in *E. formosa* and the Spanish strain of *E. mundus*.

Table 50: Percentage distribution of sequencing read frequencies corresponding to the different bacterial families and genera in the three parasitic wasps (*E. formosa*, *E. mundus* (two strains) and *E. eremicus*) and percentage of sequence similarity between the sequencing reads and 16S ribosomal RNA sequences at genus level.

Phylum	Family	Genus	Abundance (%) in each sample*				Similarity (%) using BLAST alignment
			Ef ^a	Emb ^b	Ems ^c	Ee ^d	
Firmicutes	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	2.06	23.1	3.99	72	100
	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	7.18	25.92	21.49	11.9	100
	Carnobacteriaceae	<i>Granulicatella</i>	0.26	3.49	0.18	0.37	99
	Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>	0.81	1.59	0.85	0.16	100
	Family_XI_Incertae_Sedis	<i>Gemella</i>	0.47	1.47	1.17	0.49	100
	Family_XI_Incertae_Sedis	<i>Peptoniphilus</i>	0.01	0.05	0	1.04	100
Proteobacteria	Anaplasmataceae	<i>Wolbachia</i>	57.17	0.22	0.1	0.06	100
	Pasteurellaceae	Unclassified	22.12	26.49	4.82	4.14	100
	Comamonadaceae	Unclassified	0.36	0.81	19.24	0.41	100
	Comamonadaceae	<i>Curvibacter</i>	0.36	0.13	8.86	0.53	100
	Enterobacteriaceae	<i>Hamiltonella</i>	0.07	1.05	1.61	0.3	100 ^e
	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	0.7	0.11	12.01	0.83	100
	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	0.03	0.21	5.28	0.06	100
	Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>	1.45	1.24	1.22	0.94	100
	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	0.05	0.23	5.31	0.26	100
Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Rothia</i>	2.39	3.74	1.91	2.27	100
	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	1.09	3.54	2.62	1.63	100
Deinococcus-Thermus	Thermaceae	<i>Meiothermus</i>	1.52	2.73	0.85	1.66	100
	Thermaceae	<i>Thermus</i>	0.55	1.76	0.67	0.59	100
Bacteroidetes	Chitinophagaceae	<i>Hydrotalea</i>	0.01	0.18	5.18	0.12	94
	Chitinophagaceae	<i>Sediminibacterium</i>	0.01	0.13	1.11	0	94
	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	0.04	0.09	1.09	0.06	100
Fusobacteria	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	1.29	1.72	0.44	0.18	100

^aEf (*E. formosa*). ^bEmb (*E. mundus* Belgium). ^cEms (*E. mundus* Spain). ^dEe (*E. eremicus*). ^e100% Similar to the sequences of Candidatus *Hamiltonella defensa* (*B. tabaci*). *In bold, percentages higher than 1%.

Using the Silva-SEED database all sequences all bacteria were classified at a family level and 84% of them were assigned to a genus. After BLASTn analysis, the other 16% of unidentified genera showed a relevant match (higher than 94%) with previously reported genera (**Table 50**). The genera *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rothia* and *Arthrobacter* and the family *Pasteurellaceae* seem to be the most important bacterial groups inside the parasitic wasps as they were present in all the samples (**Table 50**).

Despite of the similar bacterial composition in every parasitic wasp studied, we found large differences in the percentages of each bacterial genus in every one (**Figure 82**). We did not observe a particular similarity in the microbiota when looking at the specimens being from a taxonomically more related parasitic wasp, or host whitefly species it parasites. These differences are common among different species, and it can even exist among individuals of the same species, owing to the fact that an important part of the microflora is acquired from the environment or during the insect mass rearing. Perhaps more striking is the fact that the bacterial composition in all the samples had a 55% similarity.

Figure 82: Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot.

7.4.2. *Arthrobacter* species in the parasitic wasps and bacterial esterases assay

Four *Arthrobacter* species (GenBank KT119628-KT119631) were identified and **Table 51** gives the bacterial species with the closest match. As different bacteria had the same identity as the bacteria present in **Table 51**, we cannot suggest a species name for our molecular isolates. We searched the BCCM^{TM}/LMG bacteria collection (Laboratory of Microbiology, Ghent University, Belgium) for bacterial isolates with the closest match to our molecular isolates and retrieved *A. aurescens* (LMG 3815^T), *A. nicotinovarans* (LMG 16253^T), *A. uratoxydans* (LMG 16117). Measurable activities of esterases towards α -NPA were detected in homogenates of *A. aurescens*, *A. nicotinovarans*, *A. uratoxydans* and of the positive control, *S. littoralis* (**Table 52**). Significant esterase activity was not detected in the negative control, *L. kunkeii*, as expected. The nmoles of substrate hydrolyzed per minute and mg of protein was significantly increased from 63.43 ± 10.89 in *A. uratoxydans* to 18.35 ± 4.37 in *A. aurescens*.

Table 51: *Arthrobacter* species identified in the parasitic wasps studied.

Sequence No.	Parasitoid host species	Length	BLAST match, GenBank	Accession No.	% Identity
Emb01	<i>E. mundus</i> Belgium	645	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1 strain	NR_074272.1	99
Emb02	<i>E. mundus</i> Belgium	1043	<i>Arthrobacter ureafacens</i> NC strain	NR_029281.1	97
Ema03	<i>E. mundus</i> Spain	647	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1 Strain	NR_074272.1	99
Ee04	<i>E. eremicus</i>	646	<i>Arthrobacter nicotinovarans</i> DSM420 strain	NR_026194.1	99
Ef05	<i>E. formosa</i>	644	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1 strain	NR_074272.1	99
Ef06	<i>E. formosa</i>	649	<i>Arthrobacter uratoxydans</i> DMS 20647 strain	NR_026238.1	97

Table 52: Esterase activity towards α -NPA in *Arthrobacter* species.

Samples	nmoles of substrate hydrolyzed. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein
<i>S. littoralis</i> (x10)	357.59 $\pm$ 51.48 a
<i>Arthrobacter uratoxydans</i>	63.48 $\pm$ 10.89 b
<i>Arthrobacter nicotinovarans</i>	41.65 $\pm$ 7.75 b
<i>Arthrobacter aurescens</i>	18.35 $\pm$ 4.37 c
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	0.57 $\pm$ 0.5 d
<i>F</i> (d.f.)	94.86 (4,9)
<i>P</i>	<0.0001

Within the same column, data (mean $\pm$ SD) followed with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

7.4.3. Pesticide and antibiotic assay

Lethal effects caused by the different antibiotic concentrations to *E. mundus* adults are presented in **Table 53**. Tetracycline (from 50 up to 250 ppm) did not cause any significant mortality of *E. mundus* adults, however higher concentrations induced a significant mortality ranging from 15.32 $\pm$ 1.79% (300 ppm) to 32.23 $\pm$ 4.55% (400 ppm).

Table 53: Lethal effects of different tetracycline concentrations on *E. mundus* adults.

Tetracycline concentration (ppm)	% Adult mortality at 96h
0	2.3 $\pm$ 1.42 a
50	7.03 $\pm$ 3.50 a
100	5.44 $\pm$ 2.42 a
150	8.11 $\pm$ 3.15 ab
200	10.12 $\pm$ 1.92 ab
250	9.63 $\pm$ 2.80 ab
300	15.32 $\pm$ 1.79 c
400	32.23 $\pm$ 4.55 d
<i>F</i> (d.f.)	10.52 (7,32)
<i>P</i>	<0.0001

Within the same column, data (mean $\pm$ SD) followed with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Lethal effects caused by abamectin to *E. mundus* adults when the insects were pretreated or not with tetracycline are presented in the **Figure 83** ($P < 0.0001$; d.f. = 3, 21; $F = 398.78$). The percentage mortality in the both controls (CONTROL and TETRA treatment) was not significantly different. In the control treatment the percentage mortality was $10.29 \pm 1.5\%$, and with exposure to tetracycline $13.45 \pm 1.60\%$.

The toxicity to abamectin was significantly higher when the parasitic wasps were pretreated with the antibiotic. Without pretreatment of tetracycline the percentage mortality was $63 \pm 2\%$, while with a pretreatment of tetracycline the percentage was $86.21 \pm 2.36\%$.

Figure 83: Percentage mortality of *E. mundus* adults pretreated or not with tetracycline (100 ppm), at 72 h after exposure to fresh residues of abamectin (ABA) and water (C).

Treatments with different letters are significantly different with 95% of confidence, using the LSD test. Vertical bars indicate the standard error of the mean.

7.5. Discussion

7.5.1. Next G sequencing

In our extraction method we used whole insect which emerged from the parasitised whitefly nymphs, keep in sterile lab conditions. Thus some of the identified bacteria could just be outside of the parasitic wasp or be typical contaminant. The low presence of the genus *Deinococcus-Thermus*, being able to survive extreme sterilization measures could represent an artifact. But generally most the genera have been detected in insect or in insect associated environments and there identification will be discussed in this manner. In the present study the bacterial symbionts were classified according to their possible localization and functionality inside the hosts. Those in bold, are present in all the parasitic wasps and therefore they are possibly associated with a certain functionality. These genera are:

- Typical gut bacteria of insects: ***Streptococcus***, *Fusobacterium*, ***Staphylococcus***, ***Pasteurellaceae***, *Burkholderia*, ***Rothia***, *Ralstonia*, *Curvibacter*, *Sphingomonas*, *Sediminibacterium*, *Prevotella*, *Comamonadaceae*, *Veillonella*, *Meiothermus*, *Thermus*, *Hydrotale*, *Granulicatella* and *Gemella*.
- Bacteria present in pollen, nectar and honey: *Peptinophilus* and *Neisseria*.
- Bacteria present in whiteflies: *Hamiltonella*.
- Bacteria involved in insect reproduction: *Wolbachia*.
- Bacteria involved in detoxification of pesticides: ***Arthrobacter*** and *Burkholderia*.

7.5.1.1. Gut bacteria

The growing interest in the study of the gut microbiota of insects in last years has turned out in a significant increase in the number of publications on this topic. Engel & Moran (2013) summarized most of the available information about the bacteria genera present in the gut of insects and the role that they play within their host.

Thanks to the high-throughput sequencing and cultivation methods, the set of bacteria present in the gut of adult honeybees has been well described, but the bacterial

community present in other Hymenoptera species, like parasitic wasps, is still unknown.

Inside the honeybee gut, a distinctive microbial community, composed of a taxonomically restricted set of species specific to social bees, has been reported by different authors (Gilliam, 1997; Engel *et al.*, 2012). Martinson *et al.* (2011) demonstrated that solitary bees and wasps have different profiles of bacterial taxa in their guts. Moreover, they reported that the most common bacterium in these Hymenopterans was *Burkholderia*. Our results are in agreement with these findings, as also we see high differences between the different species and because the bacteria identified in the three studied parasitic wasps were different from the core bacteria found in social bees as well as the presence of *Burkholderia* was detected inside the wasps, despite that this bacterial genus was not a dominant genus in our samples.

In the parasitic wasps, one of the predominant bacterial genera was *Staphylococcus*, found in the three species. In the case of *E. eremicus*, 72% of the bacteria identified belonged to this genus, while the percentage was much lower in the Belgian and Spanish *E. mundus* strains and in *E. formosa*. The presence of *Staphylococcus* in insects is very common, although strikingly it is the first time that it is observed in Hymenopterans. This bacterial genus has been identified from the guts of mosquito adults (Minard *et al.*, 2013), the gypsy moth caterpillar *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantridae) (Engel & Moran, 2013), larvae of *Hepialus gonggaensis* Fu and Huang (Lepidoptera: Hepialidae) (Yu *et al.*, 2008), and *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae) larvae, prepupae and adults (Vasanthakumar *et al.*, 2008). *Staphylococcus* can play several roles inside their hosts, such as modifying the fertility of the mosquito *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae), although the mechanisms remain to be determined (Minard *et al.*, 2013), or increasing the *L. dispar* susceptibility to some toxins by affecting the midgut epithelial permeability (Engel & Moran, 2013).

A very frequent bacterial genus in our parasitic wasps was *Streptococcus*, with a frequency higher than 20% in the *E. mundus* samples, but much less common in *E. formosa* and *E. eremicus*. *Streptococcus* is a gram-positive bacterium that has already been detected in the gut of some pollinators: *A. mellifera* adults (Jeyaprakash *et al.*, 2003; García *et al.*, 2006) and larvae of *B. terrestris* and *Osmia bicornis* L.

(Hymenoptera: Megachilidae) (Mohr & Tebbe, 2006), even though its presence is only sporadic. This bacterial genus is known for its role in the sugar metabolism. Thus, García *et al.* (2006) reported that it is responsible of the production of lactic acid from the fermentation of carbohydrates present in the pollen. Other studies (Schleifer, 1986; Jones & Collins, 1986) demonstrated that it can also metabolize other monosaccharides present in the pollen, such as xylose, galactose and arabinose, which are toxic for *A. mellifera*. *Streptococcus* is not the only genus involved in the metabolization of sugars in insects, and *Fusobacterium* can also play a role (Ulrich *et al.*, 1981; Gibson & Hunter, 2010).

In the parasitic wasps studied we identified bacteria belonging to the family *Pasteurellaceae* with percentages higher than 22 % in *E. formosa* and the Belgian *E. mundus* strain, and lower than 5 % in the Spanish *E. mundus* strain and in *E. eremicus*. Our results are in agreement with the findings of Ahn *et al.* (2012), who reported that the family *Pasteurellaceae* was present within honey bees, both in larvae and adults of *A. cerana* and *A. mellifera*. Unfortunately, to date almost nothing is known yet about the roles of this family *Pasteurellaceae* in Hymenoptera.

Another bacterial genus detected in our metagenomic analysis was *Burkholderia*. Despite the fact that this bacterial genus is commonly found in the soil rhizosphere and on plant surfaces (Compant *et al.*, 2008), it can also be present in the gut of solitary bees (Martinson *et al.*, 2011).

Other genera identified in our parasitic wasps are: *Rothia*, *Ralstonia*, *Curvibacter*, *Sphingomonas*, *Sediminibacterium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Meiothermus*, *Thermus*, *Hydrotale*, *Granulicatella*, *Gemella* genera and the family Comamonadaceae. Although most of these bacteria have been found in the gut of insects, some of them frequently, their functions are still unknown.

7.5.1.2. Bacteria present in pollen, nectar and honey

Although most bacteria found in the present work are associated with insects, we also identified the genera *Peptinophilus* and *Neisseria*, typically present in the floral nectar and honey (Snowdon & Cliver, 1996). These bacteria, present in the

environment, have also been isolated from the abdomen and the integument of *A. mellifera* (Jeyaprakash *et al.*, 2013; Corby-Harris *et al.*, 2014). Despite the fact that it is known that the parasitic wasps studied feed on whitefly larvae, we hypothesize here that the insects could have acquired these bacterial genera from the honey used as food resource during the assays.

7.5.1.3. Bacteria present in whiteflies

Bacteria of the genus *Hamiltonella* are described as facultative symbionts of the whiteflies *Bemisia* spp. and *Trialeurodes* spp. (Chiel *et al.*, 2009; Cass *et al.*, 2014). *Hamiltonella* spp. enhances the fecundity and the nymphal survival of *B. tabaci* and reduces their development time (Su *et al.*, 2013). Degnan *et al.* (2009) and Rao *et al.* (2012) reported that *Hamiltonella defensa* protects aphids and whiteflies from the attack by parasitic wasps by causing high mortality of the developing parasitoid larvae.

Chiel *et al.* (2009) showed in their study that pupae of the aphelinids *E. eremicus*, *Eretmocerus emiratus* Zolnerowich & Rose and *E. pergandiella* acquired *Hamiltonella* spp. from the whiteflies, and then the parasitic wasps lost it during the adult stage. In contrast with these findings, we could detect low levels of this bacterium inside adults of the three parasitic wasp species studied. This difference can be explained mainly by the fact that we worked with DNA extractions performed on groups of 25 adults, instead of 1 adult as used by Chiel *et al.* (2009) and we used deep sequencing technology.

7.5.1.4. Bacteria involved in insect reproduction

The only genus identified in the parasitic wasp species, known to be involved in reproduction, was *Wolbachia*. In *E. mundus* and *E. eremicus* the abundance of *Wolbachia* was lower than 1%, but in the genus *E. formosa* it reached 57.17 %.

Wolbachia are obligate intracellular bacteria that infect arthropods and can induce cytoplasmic incompatibility, thelytoky, feminization of males and male-killing in their host. This bacterium is transmitted predominantly via egg cytoplasm (vertical transmission) from infected mothers to their offspring (Shoemaker *et al.*, 2002; Floate *et al.*, 2006). Nonetheless, horizontal transmission of *Wolbachia* among the whiteflies and their parasitoids also occurs (Ahmed *et al.*, 2010).

Wolbachia is a common bacterium present in solitary bees and wasps (Martinson *et al.*, 2011), and its importance lies in the fact that it induces thelytoky in several genera of parasitic wasps, such as *Eretmocerus* (De Barro & Hart, 2001), *Encarsia* (Hunter, 1999), *Trichogramma* (Stouthamer *et al.*, 1990), *Aphytis* (Gottlieb *et al.*, 1998). Floate *et al.* (2006) and Werren (1997) showed in their studies that this bacterium has a huge potential for use in biocontrol programs. Its manipulation by elimination or transfer could contribute to reduce the populations of the pest species and to enhance those of the natural enemies. Therefore, the genetic transformation of symbionts, like *Wolbachia*, found in arthropod-vectored diseases, can eliminate or decline the disease agents, reducing the spread of the diseases.

7.5.1.5. Bacteria involved in detoxification of pesticides

Arthrobacter was one of the genera identified in all species. It is primarily known as a soil bacterium, and it possesses a large diversity of enzymes that can metabolize different xenobiotics (Hayatsu *et al.*, 2001; Shapir *et al.*, 2007). Therefore this genus has been shown to be involved in the degradation of several kinds of pesticides in the soil such as carbamates, organochlorides and organophosphates (Ohshiro *et al.*, 1999; Russel *et al.*, 2011).

Recently it has been reported that insects can benefit from this diversity of bacterial enzymes, which detoxify xenobiotic products. Kikuchi *et al.* (2012) demonstrated for the first time the influence of the symbiotic microbiota of an insect species on its susceptibility to pesticides. They confirmed that the stinkbugs *Riptortus pedestris* (F.) (Hemiptera: Alydidae) was resistant to the organophosphate pesticide fenitrothion thanks to a specific and beneficial symbiosis with a fenitrothion-degrading *Burkholderia* strain. This bug species can environmentally acquire the *Burkholderia* symbiont at the second instar stage from the soil.

The management of these bacteria could be of a great interest in integrated pest management (IPM) programs. In turn this supports the importance of the microbial community in natural enemies and that it should be considered as a factor in risk assessment tests of pesticides.

7.5.2. Influence of *Arthrobacter* species in the susceptibility of parasitic wasps to pesticides

Despite the presence of the genus *Arthrobacter* in insects have been reported by some authors (Sood & Nath, 2002; Ínce *et al.*, 2014), up to our knowledge, this is the first time that sequences close to the species *A. nicotinovarans*, *A. aurescens*, *A. uratoxydans* and *A. ureafaciens*, are described in insects. It is known that an important part of the microflora is acquired from the environment, and this fact can explain the presence of these soil bacteria in the three parasitic wasps studied.

Our results showing the presence of esterases in the three *Arthrobacter* species studied, mainly in *A. uratoxydans*, and are confirmed by Smacchi (1999) and Bornscheuer (2002), reporting on esterase activity in *Arthrobacter* species. As mentioned above, this enzyme is involved in the degradation of several ester containing compounds, like pesticides (Wheelock *et al.*, 2005), and its presence is common in insects (Delorme *et al.*, 1988; van Leeuwen *et al.*, 2005; Sayyed, 2010). Nothing is known about the number of pesticide degrading enzymes genes in *E. mundus*, *E. eremicus* and *E. formosa*, but it seems to vary a lot between the Hymenoptera species (Baker *et al.*, 1998; Claudianos *et al.*, 2006; Oakeshott *et al.*, 2010). This variation could perhaps be explained by symbiosis with bacteria with esterase activity, increasing the level of these kinds of enzymes.

In previous results of our group, the toxicity to abamectin of *E. mundus* adults was assessed (Fernández *et al.*, 2012). In this study the control groups and also in the groups pretreated with tetracycline the mortality was scored as “harmless (IOBC 1)” (i.e. toxicity <30%) based on IOBC criteria (Hassan, 1994). Tetracycline, at 100 ppm concentration in the food of honey for the parasitic wasps, can be categorized as no toxic for *E. mundus* adults. When *E. mundus* adults were pretreated with tetracycline at 100 ppm, to suppress their microbiota including all G+ and G- bacteria, the toxicity by abamectin increased from 63% without pretreatment to 86% with the pretreatment; so the toxicity IOBC class increased from “slightly harmful (IOBC 2)” (30-79% mortality) to “moderately harmful (IOBC 3)” (80-99% mortality), respectively. We therefore believe that our data are strong indicatives of a possible influence of *Arthrobacter* or other bacteria in the susceptibility of this parasitic wasp to pesticides and in turn that the

microbial community present in the body of the natural enemies can affect the scoring of the susceptibility for pesticides in risk assessment schemes. Based on these first results, it is of great interest to perform extra experiments investigating the mechanism behind how symbionts, like possibly *Arthrobacter* sp., degrade pesticides. So in conclusion, the presence of such symbiotic symbiosis may have great implications for the current IPM programs, owing to it can help to enhance the susceptibility of the pest populations to pesticides and reduce the negative effects of these chemical products against the populations of natural enemies.

CHAPTER 8: CONCLUSIONS

After evaluating the ecotoxicological effects of eleven modern pesticides on the parasitic wasp *E. mundus* and the predator *A. swirskii*, it can be concluded that:

- *E. mundus* pupae (laboratory studies): the insecticides flonicamid, flubendiamide, metaflumizone, methoxyfenozide, spiromesifen and spirotetramat were selective. Nevertheless, abamectin, deltamethrin and emamectin were categorized as slightly harmful due to the deleterious effects caused. The two most harmful pesticides were spinosad and sulfoxaflor, which significantly reduced the adult emergence from treated pupae.
- *E. mundus* adults (laboratory and persistence studies): flonicamid, flubendiamide, methoxyfenozide and spiromesifen were compatible with the natural enemy. Base on the duration of the harmful activity, abamectin, deltamethrin, emamectin, metaflumizone and spirotetramat could be recommended for use in IPM programs if appropriate safety deadlines are used before the natural enemy release. On the contrary, spinosad and sulfoxaflor were not compatible, although additional studies are required to determine their effects under field conditions.
- *A. swirskii* eggs (laboratory studies): all the pesticides tested, except spirotetramat, were selective. Spirotetramat gave a significant reduction on egg hatch.
- *A. swirskii* adults (laboratory and persistence studies): flonicamid, flubendiamide, metaflumizone, methoxyfenozide, spiromesifen, spirotetramat and sulfoxaflor were compatible. However, abamectin, deltamethrin, emamectin and spinosad could be recommended for use in IPM programs if appropriate safety deadlines are used before the natural enemy release.

The study of the effects caused by the different ultraviolet-absorbing barriers tested on tomato plants, *B. tabaci* and *E. mundus* reported the following conclusions:

- Direct effects of the UV-absorbing barriers (which block more than 65% of the UV light), on the host location ability from long distances (1 m) of *E. mundus* were detected, because this parasitoid used visual cues for host location. However, when this parasitic wasp was in contact with a tomato plant infested with *B. tabaci* nymphs, not any effect on its beneficial capacity was detected, proving that he uses tactile cues at short distance of the host.
- The different UV radiation conditions studied had a certain direct impact in the morphology, physiology and biochemistry of tomato plants infested or not with the TYLCV, and small alterations in some parameters were detected.
- No plant-mediated UV effects, in presence or absence of the TYLCV, were found neither in the whitefly *B. tabaci* nor in their parasitic wasp.

The compatibility of a bifenthrin treated net with the natural enemies studied provided the following conclusions:

- In laboratory assays, a high mortality rate was detected when *E. mundus* and *A. swirskii* were exposed by contact to the bifenthrin treated net for 72 hours. However, these natural enemies were not able to detect the presence of bifenthrin in a dual-choice test and no short-term mortality (72 hours) was recorded in those individuals that went through the treated net.
- In semi-field assays performed under greenhouse conditions, the beneficial capacity **of *E. mundus* was not affected.**
- Under field conditions, *A. swirskii* was compatible with this tool and the *B. tabaci* and *F. occidentalis* infestation levels were significantly lower than in the control.

The study of the bacterial community present in the parasitic wasps *E. mundus*, *E. eremicus* and *E. formosa* and its impact on exposure to abamectin insecticide has reported the following conclusions:

- Among the microbiota present in the parasitic wasps studied, two bacterial genera involved in the detoxification of pesticides, *Arthrobacter* and *Burkholderia*, were detected.
- Four *Arthrobacter* species, *A. nicotinovarans*, *A. aurescens*, *A. uratoxydans* and *A. ureafaciens*, were found in the aphelinid parasitoids.
- In the three *Arthrobacter* species studied, the presence of esterases (enzymes responsible for the hydrolysis and subsequent detoxification of different classes of pesticides, such as pyrethroids, carbamates and organophosphates) were observed.
- When *E. mundus* adults were fed *ad libitum* during one day with honey and a non-toxic concentration of the broad spectrum antibiotic tetracycline (100 ppm), the toxicity of abamectin, a pesticide with an ester bond, susceptible to be degraded by *Arthrobacter* bacteria, increased from 63% without pretreatment to 86% with the pretreatment.

CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, M.Z.; Ren, S.X.; Mandour, N.S.; Greeff, J.C.; Qiu, B.L. 2010. Prevalence of *Wolbachia* supergroups A and B in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and some of its natural enemies. *J. Econ. Entomol.*, 103(5): 1848-1859.

Ahn, J.H.; Hong, I.P.; Bok, J.I.; Kim, B.Y.; Song, J.; Weon, H.Y. 2012. Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *J. Microbiol.*, 50(5): 735-745.

Albernaz, K.C.; Carvalho, G.A.; Carvalho, B.F.; Souza, J.R. 2009. Toxicidad de pesticidas para adultos de *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae). *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 76(4): 589-595.

Alomar, O. 2003. Control biológico por conservación y gestión del hábitat. III Congreso Nacional de Entomología Aplicada. *Conferencia plenaria III Congreso Nacional de Entomología Aplicada; IX Jornadas científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada*, libro de resúmenes: 101-106.

Alyokhin, A.; Makatiani, J.; Takasu, K. 2010. Insecticide odour interference with food-searching behaviour of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) in a laboratory arena. *Biocontrol Sci. Techn.*, 20(3): 317-329.

Alzoubi, S.; Cobanoglu, S. 2008. Toxicity of some pesticides against *Tetranychus urticae* and its predatory mites under laboratory conditions. *J. Agric. & Environ. Sci.*, 3(1): 30-37.

Amor, F.; Medina, P.; Bengochea, P.; Cánovas, M.; Vega, P.; Correia, R.; García, F.; Gómez, M.; Budia, F.; Viñuela, E.; López, J. 2012. Effect of emamectin benzoate under semi-field and field conditions on key predatory biological control agents used in vegetable greenhouse. *Biocontrol Sci. Technol.*, 22(2): 219-232.

Amor, F. 2013. Compatibilidad de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) y *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae), depredadores

importantes en cultivos hortícolas protegidos, con nuevas barreras físicas selectivas y modernos plaguicidas .Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 187 pp.

Antignus, Y.; Mor, N.; Ben-Joseph, R.; Lapidot, M.; Cohen, S. 1996. UV-absorbing plastic sheets protect crops from insect pests and from virus diseases vectored by insects. *Environ. Entomol.*, 25(5): 919-924.

Antignus, Y.; Lapidot, M.; Hadar, D.; Messika, Y.; Cohen, S. 1998. Ultraviolet-absorbing screens serve as optical barriers to protect crops from virus and insect pests. *J. Econ. Entomol.*, 91: 1401-1405.

Antignus, Y. 2000. Manipulation of wavelength dependent behavior of insects an IPM tool to impede insects and insect-borne virus. *Virus Res.*, 71: 213-220.

Antignus, Y.; Nestel, D.; Cohen, S.; Lapidot, M. 2001. Ultraviolet-deficient greenhouse environment affects whitefly attraction and flight behaviour. *Environ. Entomol.*, 30(2): 394-399.

Australian Government (Australian pesticides and veterinary medicines authority). 2013. Public release summary on the evaluation of the new active constituent sulfoxaflor in the product transform insecticide. <http://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14041-prs-sulfoxaflor.pdf>. Último acceso: 5 Mayo 2015.

Babcock, J.M.; Gerwick, C.B.; Huang, J.X.; Loso, M.R.; Nakamura, G.; Nolting, S.P.; Rogers, R.B.; Sparks, T.C.; Thomas, J.; Watson, G.B.; Zhua, Y. 2011. Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide. *Pest Manag. Sci.*, 67: 328-334.

Baker, J.E.; Fabrick, J.A.; Zhu, K.Y. 1998. Characterization of esterases in malathion-resistant and susceptible strains of the pteromalid parasitoid *Anisopteromalus calandrae*. *Insect Biochem. Molec.*, 28: 1039-1050.

Bakke, I.; De Schryver, P.; Boon, N.; Vadstein, O. 2011. PCR-based community structure studies of bacteria associated with eukaryotic organisms: A simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA. *J. Microbiol. Meth.*, 84: 349-351.

Barrett, K.L.; Grandy, N.; Harrison, E.G.; Hassan, S.A.; Oomen, P. 1994. Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods. SETAC, Bruselas, 51 pp.

Barsig, M.; Malz, R. 2000. Fine structure, carbohydrates and photosynthetic pigments of sugar maize leaves under UV-B radiation. *Environ. Exp. Bot.*, 43: 121-130.

Beers, E.H.; Schmidt, R.A. 2014. Impacts of orchard pesticides on *Galendromus occidentalis*: lethal and sublethal effects. *Crop Prot.*, 56: 16-24.

Belda, J.E.; Calvo, J. 2006. Eficacia de *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) en el control biológico de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom.:Aleyrodidae) y *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thys.:Thripidae) en pimiento en condiciones de semicampo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 283-296.

Bengochea, P.; Medina, P.; Amor, F.; Cánovas, M.; Vega, P.; Correia, R.; García, F.; Gómez, M.; Budia, F.; Viñuela, E.; López, J.A. 2012. The effect of emamectin benzoate on two parasitoids, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) and *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae), used in pepper greenhouses. *Span. J. Agric. Res.*, 10(3): 806-814.

Bernard, M.B.; Cole, P.; Kobelt, A.; Horne, P.A.; Altmann, J.; Wratten, S.D.; Yen, A.L. 2010. Reducing the impact of pesticides on biological control in australian vineyards: pesticide mortality and fecundity effects on an indicator species, the predatory mite *Euseius victoriensis* (Acari: Phytoseiidae). *J. Econ. Entomol.*, 103(6): 2061-2071.

Besard, L.; Mommaerts, V.; Vandeven, J.; Cuvelier, X.; Sterk, G.; Smagghe, G. 2010. Compatibility of traditional and novel acaricides with bumblebees (*Bombus terrestris*): a first laboratory assessment of toxicity and sublethal effects. *Pest Manag. Sci.*, 66: 786-793.

Bethke, J.A.; Paine, T.D. 1991. Screen hole size and barriers for exclusion of insect pests of glasshouse crops. *J. Entomol. Sci.*, 26: 169-177.

Bielza, P. 2008. Perspective insecticide resistance management strategies against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Pest Manag. Sci.*, 64: 1131-1138.

Bielza, P.; Fernández, E.; Grávalos, C.; Izquierdo, J. 2009. Testing for non-target effects of spiromesifen on *Eretmocerus mundus* and *Orius laevigatus* under greenhouse conditions. *BioControl*, 54: 229-236.

Biondi, A.; Mommaerts, V.; Smagghe, G.; Viñuela, E.; Zappalá, L.; Desneux, N. 2012. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Manag. Sci.*, 68: 1523-1536.

Blümel, S.; Hausdorf, H. 2002. Results of the 8th and 9th IOBC Joint Pesticides Testing Programme: Persistence test with *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae). *IOBC/wprs Bull.*, 25(11): 43-51.

BOE (Boletín Oficial del Estado). 2012. Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. *BOE*, 223: 65127-65171.

Bolckmans, K.; van Houten, Y.; Hoogerbrugge, H. 2005. Biological control of whiteflies and western flower thrips in greenhouse sweet peppers with the phytoseiid predator mite *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot). *Second International Symposium on Biological Control Arthropods*, 555–565. http://www.nhm.ac.uk/resources/research-curation/projects/chalcidoids/pdf_X/BolckmHoHo2005.pdf. Último acceso: 26 de Febrero 2015.

Bonafos, R.; Serrano, E.; Auger, P.; Kreiter, S. 2007. Resistance to deltamethrin, lambda-cyhalothrin and chlorpyrifos-ethyl in some populations of *Typhlodromus pyri* Scheuten and *Amblyseius andersoni* (Chant) (Acari: Phytoseiidae) from vineyards in the south-west of France. *Crop Prot.*, 26: 169-172.

Bornscheuer, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 73-81.

Bostanian, N.J.; Akalach, M. 2006. The effect of indoxacarb and five other insecticides on *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytodeiidae), *Amblyseius fallacis* (Acari: Phytoseiidae) and nymphs of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Pest Manag. Sci.*, 62: 334-339.

Bostanian, N.J.; Hardman, J.M.; Thistlewood, H.A.; Racette, G. 2010. The response of *Neoseiulus fallacies* (Garman) and *Galendromus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae) to six reduced risk insecticides in Canada. *IOBC/wprs Bull.*, 55: 73-77.

Britz, S.J.; Adamse, P. 1994. UV-B-induced increase in specific leaf weight of cucumber as a consequence of increased starch content. *Photochem. Photobiol.*, 60(2): 116-119.

Broufas, G.D.; Pappas, M.L.; Vassiliou, G.; Koveos, D.S. 2008. Toxicity of certain pesticides to the predatory mite *Euseius finlandicus* (Acari: Phytoseiidae). *IOBC/wprs Bull.*, 35: 85-91.

Brown, J.K. 1994. Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agro-ecosystems Worldwide. *FAO Plant Prot. Bull.*, 42: 3-32.

Brown, J.K., Frohlich, D.R., Rossell, R.C. 1995. The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Ann. Rev. Entomol.*, 40: 511-534.

Brück, E.; Elbert, A.; Fischer, R.; Krueger, S.; Kühnhold, J.; Klueken, A.M.; Nauen, R.; Niebes, J.F.; Reckmann, U.; Schnorbach, H.J.; Steffens, R.; van Waetermeulen, X. 2009. Movento®, an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in agriculture: Biological profile and field performance. *Crop Prot.*, 28: 838-844.

Byrne, D.N.; Bellows, T.S. 1991. Whitefly biology. *Ann. Rev. Entomol.*, 36: 431-457.

Cahill, M.; Jarvis, W.; Gorman, K.; Denholm, I. 1996. Resolution of baseline responses and documentation of resistance to buprofezin in *Bemisia tabaci*. *Bull. Entomol. Res.*, 86: 117-122.

Callejas, C.; Ochando, M.D. 2005. Variabilidad genética en *Bemisia tabaci* (Gennadius) en mecanismos de resistencia inducida en plantas de tomate. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31: 71-77.

Calvo, F.J.; Bolckmans, K.; Belda, J.E. 2011. Control of *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in cucumber by *Amblyseius swirskii*. *BioControl*, 56: 185-192.

Calvo, F.J.; Knapp, M.; van Houten, Y.M.; Hoogerbrugge, H.; & Belda, J.E. 2015. *Amblyseius swirskii*: What made this predatory mite such a successful biocontrol agent? *Exp. Appl. Acarol.*, 65: 419-433.

Campbell, B.C.; Stephen-Campbell, J.D.; Gill, R. 1996. Origin and radiation of whiteflies: an initial molecular phylogenetic assessment. En: *Bemisia*: 1995. Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management. Editado por: Gerling, D. & Mayer, R.T. Intercept, UK, 29-52. En: Oliveira, M.R.V.; Henneberry, T.J.; Anderson, P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.*, 20: 709-723.

Caporaso, J.G.; Lauber, C.L.; Walters, W.A.; Berg-Lyons, D.; Lozupone, C.A.; Turnbaugh, P.J.; Fierer, N.; Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 4516-4522.

Carlson, G.R.; Dhadialla, T.S., Hunter, R.; Jansson, R.K.; Jany, C.S.; Lidert, Z.; Slawewski, R.A. 2001. The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist. *Pest Manag. Sci.*, 57: 115-119.

Carson, R.; Darling, L.; Darling, L. 1962. *Silent spring*. Ed. Houghton Mifflin. 381 pp.

Casida, J.E.; Quistad, G.B. 1998. Golden age of insecticide research: Past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 1-16.

Casida, J.E.; Durkin, K.A. 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 99-117.

Cass, B.N.; Mozes-Daube, N.; Iasur-Kruh, L.; Bondy, E.C.; Kelly, S.E.; Hunter, M.S.; Zchori-Fein, E. 2014. Bacterial endosymbionts in field-collected samples of *Trialeurodes* sp. nr. *abutiloneus* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Res. Microbiol.*, 165: 77-81.

Chapman, R.F. 1982. The insects: structure and function. Ed. Hodder and Stoughton Educational. 919 pp.

Chau, A.; Heinz, K.M.; Davies, F.T. 2005. Influences of fertilization on population abundance, distribution and control of *Frankliniella occidentalis* on chrysanthemum. *Entomol. Exp. Appl.*, 117(1): 27-29.

Cheon, G.S.; Paik, C.H.; Kim, S.S. 2008. Selective toxicity of three acaricides to the predatory mite *Neoseiulus womersleyi* and its prey *Tetranychus urticae* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). *Korean J. Pestic. Sci.*, 12: 249-255.

Chiel, E.; Messika, Y.; Steinberg, S.; Antignus, Y. 2006. The effect of UV-absorbing plastic sheet on the attraction and host location of three parasitoids: *Aphidius colemani*, *Diglyphus isaea* and *Eretmocerus mundus*. *BioControl*. 51: 65-78.

Chiel, E.; Zchori-Fein, E.; Inbar, M.; Gottlieb, Y.; Adachi-Hagimori, T.; Kelly, S.E.; Asplen, M.K.; Hunter, M.S. 2009. Almost there: transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. *PLoS ONE*, 4(3): e4767.

Chyzik, R.; Dobrinin, S.; Antignus, Y. 2003. Effect of a UV-deficient environment on the biology and flight activity of *Myzus persicae* and its hymenopterous parasite *Aphidius matricariae*. *Phytoparasitica*, 31: 467-477.

Clark, J.M.; Scott, J.G.; Campos, F.; Bloomquist, J.R. 1994. Resistance to avermectins: extent, mechanisms, and management implications. *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 1-30.

Claudianos, C.; Ranson, H.; Johnson, R.M.; Biswas, S.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R.; Feyereisen, R.; Oakeshott, J.G. 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 615-636.

Cloyd, R.A.; Galle, C.L.; Keith, S.R. 2006. Compatibility of three miticides with the predatory mites *Neoseiulus californicus* McGregor and *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae). *Hortscience*, 41(3): 707-710.

Colomer, I.; Aguado, P.; Medina, P.; Heredia, R.M.; Fereres, A.; Belda, J.E.; Viñuela, E. 2011. Field trial measuring the compatibility of methoxyfenozide and flonicamid with *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) and *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) in comercial pepper greenhouse. *Pest Manag. Sci.*, 67: 1237-1244

Compant, S.; Nowak, J.; Coenye, T.; Clement, C.; Barka, E.A. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 607-626.

Corby-Harris, V.; Maes, P.; Anderson, K.E. 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS ONE*, 9(4): e95056.

Cote, K.W.; Lewis, E.E.; Schultz, P.B. 2002. Compatibility of acaricide residues with *Phytoseiulus persimilis* and their effects on *Tetranychus urticae*. *HortScience*, 37(6): 906-909.

Dáder, B.; Gwynn-Jones, D.; Moreno, A.; Winters, A.; Fereres, A. 2014. Impact of UV-A radiation on the performance of aphids and whiteflies and on the leaf chemistry of their host plants. *J. Photoch. Photobio. B.*, 138: 307-316.

Dáder, B.; Legarrea, S.; Moreno, A.; Plaza, M.; Carmo-Sousa, M.; Amor, F.; Viñuela, E.; Fereres, A. 2015. Control of insect vectors and plant viruses in protected crops by novel pyrethroid-treated nets. *Pest. Manag. Sci.*, 71: 1397-1406.

De Barro, P.J.; Hart, P.J. 2001. Antibiotic curing of parthenogenesis in *Eretmocerus mundus* (Australian parthenogenic form). *Entomol. Exp. Appl.*, 99: 225-230.

De Barro, P.J.; Liu, S-S; Boykin, L.M.; Dinsdale, A.B. 2011. *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. *Ann. Rev. Entomol.*, 56: 1-19.

De Liñán, C. 2014. Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales. Ed. Agrotécnicas, Madrid, 812 pp.

Degnan, P.H.; Yub, Y.; Sisneros, N.; Wing, R.A.; Moran, N.A. 2009. *Hamiltonella defensa*, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(22): 9063-9068.

Delgado, A.M. 2010. El control integrado de plagas en cultivos hortícolas. *Phytoma*, 218: 24-28.

Delorme, R.; Fournier, D.; Chaufaux, J.; Cuany, A.; Bride, J.M.; Auge, D.; Berge, A.B. 1998. Esterase metabolism and reduced penetration are causes of resistance to deltamethrin in *Spodoptera exigua* HUB (Noctuidea, Lepidoptera). *Pestic. Biochem. Phys.*, 32: 240-246.

Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 81-106.

Díaz, B.M.; Nebreda, M.; Salas, F.; Moreno, A.; García, M.; Fereres, A. 2004. Mallas impregnadas con insecticidas: un nuevo método para el control de plagas de cultivos hortícolas. *Bol. San. Veg. Plagas*, 30: 623-632.

Díaz, B.M.; Fereres, A. 2007. Ultraviolet-blocking materials as a physical barrier to control insect pests and pathogens in protected crops. *Pest Technol.*, 1(2): 85-95.

Diffey, B.L. 2002. Sources and measurements of ultraviolet radiation. *Methods*, 28: 4-13.

Döker, İ.; Pappas, M.L.; Samaras, K.; Triantafyllou, A.; Kazak, C.; Broufas, G.D. 2014. Compatibility of reduced-risk insecticides with the non-target predatory mite *Iphiseius degenerans* (Acari: Phytoseiidae). *Pest Manag. Sci.*, 71(9): 1267-1273.

DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea). 2015. Reglamento de ejecución (UE) 2015/1295 de la comisión de 27 de julio de 2015 por el que se aprueba la sustancia activa sulfoxaflor, con arreglo al Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y se

modifica el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) no 540/2011 de la Comisión. *DOUE*, 199: 8-11.

Doukas, D.; Payne, C.C. 2007a. Effects of UV-blocking films on the dispersal behavior of *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). *J. Econ. Entomol.*, 100: 110-116.

Doukas, D.; Payne, C.C. 2007b. Greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) dispersal under different UV-light environments. *J. Econ. Entomol.*, 100: 389-397.

Doukas, D.; Payne, C.C. 2007c. The use of ultraviolet-blocking films in insect pest management in the UK; effects on naturally occurring arthropod pest and natural enemy populations in a protected cucumber crop. *Ann. Appl. Biol.*, 151: 221-231.

Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C.; Quince, C.; Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27: 2194-2200.

Eilenberg, J.; Hajek, A.; Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4): 387-400.

El-Laithy, A.Y.M.; Fouly, A.H. 1992. Life table parameters of two phytoseiid predators *Amblyseius scutalis* (Athias-Henriot) and *A. swirskii* Athias –Henriot in Egypt. *J. Appl. Entomol.*, 113: 8-12.

Elsawi, S.A.; Abou-Awad, B.A. 1992. Starvation and fertilization affecting reproduction in *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot and *A. gossipi* El-Badry (Acari.:Phytoseiidae). *J. Appl. Entomol.*, 113: 239-243.

Engel, P.; Martinson, V.G.; Moran, N.A. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(27): 11002-11007.

Engel, P.; Moran, N.A. 2013. The gut microbiota of insects –diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(5): 699-735.

EPA (Environmental Protection Agency, United States). 2013. Pesticide news story: the EPA's final decision on the new active ingredient sulfoxaflor. http://www.epa.gov/oppfead1/cb/csb_page/updates/2013/sulfoxaflor-decision.html.

Último acceso: 5 Mayo 2015.

EPA (Environmental Protection Agency, United States). 2015. Conventional reduced risk pesticide program. <http://www2.epa.gov/pesticide-registration/conventional-reduced-risk-pesticide-program>. Último acceso: 23 Noviembre 2015.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2015. EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests as approved by EPPO Council in September 2013. <http://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.htm>. Último acceso: 26 de Febrero 2015.

FAOSTAT. 2015. Crop production data. <http://faostat3.fao.org/home/E>. Último acceso: 17 de Febrero 2015.

Fauna Europaea. 2015a. Sistemática *Bemisia tabaci*. http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=54175. Último acceso: 18 de Febrero 2015.

Fauna Europaea. 2015b. Sistemática *Eretmocerus mundus*. http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=68018. Último acceso: 24 de Febrero 2015.

Fauna Europaea. 2015c. Distribución *Eretmocerus mundus*. http://www.faunaeur.org/distribution_table.php. Último acceso: 24 de Febrero 2015.

Fauna Europaea. 2015d. Sistemática *Amblyseius swirskii*. http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=244950. Último acceso: 25 de Febrero 2015.

Fereres, A.; Biurrun, R.; Moreno, A.; Díaz, B.M.; Nebreda, M. 2003. Impact of ultraviolet-absorbing plastic films on insect vectors of virus diseases infecting crisp lettuce. *IOBC/wprs Bull.*, 26: 95-99.

Fernández, M.M.; Medina, P.; Del Estal, P.; Viñuela, E. 2010a. Testing side-effects of pesticides on the most protected life stage of *Eretmocerus mundus*, parasitoid of the whitefly *Bemisia tabaci* in the laboratory. *IOBC/wprs Bull.*, 55: 101-107.

Fernández, M.M. 2010b. Conservación del hábitat del parasitoide *Eretmocerus mundus* Mercet mediante el uso de métodos selectivos para el control del vector de virosis en hortícolas *Bemisia tabaci* (Gennadius): plaguicidas respetuosos y barreras físicas selectivas. Trabajo Fin de Máster Recursos Fitogenéticos. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 80 pp.

Fernández, M.M.; Amor, F.; Bengochea, P.; Velázquez, E.; Medina, P.; Ferreres, A.; Viñuela, E. 2012. Effects of the insecticides methoxyfenozide and abamectin to adults of the whitefly natural enemies *Eretmocerus mundus* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae), *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) and *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae) under laboratory conditions. *IOBC/wprs Bull.*, 82: 1-7.

Ferragut, F.; Pérez Moreno, I.; Iraola, V.; Escudero, A. 2010. Ácaros depredadores en las plantas cultivadas. Ed. Ediciones Agrotécnicas, Madrid, 202 pp.

Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 507-33.

Fiscus, E.L.; Booker, F.L. 1995. Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity? *Photosynth. Res.*, 43: 81-92.

Floate, K.D.; Kyei-poku, G.K.; Coghlin, P.C. 2006. Overview and relevance of *Wolbachia* bacteria in biocontrol research. *Biocontrol Sci. Techn.*, 16(8): 767-788.

García García, D.; Rojas Mogollón, M.A.; Sánchez Nieves, J. 2006. Cultured microbiological content of the intestinal tract and stored pollen of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biol. Colomb.*, 11(1): 123-129.

Garcia, P. 2011. Sublethal effects of pyrethroids on insect parasitoids: what we need to further know. En: Pesticides – Formulations, Effects, Fate. Editado por: Stoytcheva, M. InTech, Rijeka, 477-494.

Garzón, A.; Medina, P.; Amor, F.; Viñuela, E.; Budia, F. 2015a. Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol

agents *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). *Chemosphere*, 132: 87-93.

Garzón, A. 2015b. Influence of new integrated pest management strategies on aphidophagous predators in horticultural crops. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 173 pp.

Gentz, M.C.; Murdoch, G.; King, G.F. 2010. Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective reduced-risk pest management. *Biol. Control*, 52(3): 208-215.

Gerling, D.; Fried, R. 2000. Biological studies with *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) in Israel. *IOBC-wprs Bull.*, 23(1):117-123.

Gerling, D.; Alomar, O.; Arnó, J. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids. *Crop Prot.*, 20: 779-799.

Gibson, C.M.; Hunter, M.S. 2010. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecol. Lett.*, 13: 223-234.

Gilliam, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honeybees. *FEMS Microbiol. Lett.*, 155: 1-10.

Gómez-Menor, J. 1943. Contribución al conocimiento de los aleyrodidos de España (Hem. Homoptera), 1a nota. “*EOS*” *Rev. Esp. Ent.*, 19: 173-209.

González-Núñez, M.; Bahena, F.; Viñuela, E. 1998. Desarrollo de un método de semi-campo para el estudio de los efectos secundarios de los productos fitosanitarios sobre el parasitoide *Opius concolor* Szèpligeti. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24: 661-668.

González-Zamora, J.E.; Gallardo, J.M.; García, M.M. 1997. Toxicity of different pesticides on pupae of *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitizing *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *IOBC/wprs Bull.*, 20: 114-120.

González Zamora, J.E.; Gallardo, J.M. 1999. Desarrollo y capacidad reproductiva de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) en pimiento a tres temperaturas. *Bol. San. Veg. Plagas*, 25: 3-11.

Gottlieb, Y.; Zchori-Fein, E.; Faktor, O.; Rosen, D. 1998. Phylogenetic analysis of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in the genus *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Mol. Biol.*, 7(4): 393-396.

Gradish, A.E.; Scott-Dupree, C.D.; Shipp, L.; Harris, C.R.; Ferguson, G. 2011. Effect of reduced risk pesticides on greenhouse vegetable arthropod biological control agents. *Pest Manag. Sci.*, 67: 82-86.

Grammatikopoulos, G.; Kyparissis, A.; Drilias, P.; Petropoulou, Y.; Manetas, Y. 1998. Effects of UV-B radiation on cuticle thickness and nutritional value of leaves in two Mediterranean evergreen sclerophylls. *J. Plant Physiol.*, 153: 506-512.

Guisado Díaz, M. 2014. Compatibilidad del depredador de mosca blanca *Macrolophus caliginosus* (Wagner) (Heteroptera: Miridae) con mallas fotoselectivas y nuevos insecticidas. Trabajo Fin de Carrera. E.T.S.I. Agrónomos. UPM. Madrid.

Hassan, S.A. 1994. Activities of the IOBC/WPRS Working Group “Pesticides and Beneficial Organisms. *IOBC/wprs Bull.*, 17(10): 1-5.

Hassan, S.A. 1998. Standard laboratory methods to test the side-effects of pesticides (initial and persistent) on *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae). En: *Ecotoxicology: Pesticides and biological organisms*. Editado por: Haskell, P.T. & McEwen, P. Chapman & Hall, London, 71-79.

Hayatsu, M.; Mizutani, A.; Hashimoto, M.; Sato, K.; Hayano, K. 2001. Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Arthrobacter* sp. RC100. *FEMS Microbiol. Lett.*, 201: 99-103.

Hewa-Kapuge, S.; McDougall, S.; Hoffmann, A.A. 2003. Effects of methoxyfenozide, indoxacarb and other insecticides on the beneficial egg parasitoid

Trichogramma nr. *brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under laboratory and field conditions. *J. Econ. Entomol.*, 96(4): 1083-1090.

Hollósy, F. 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron.*, 33: 179-197.

Hougard, J.M.; Duchon, S.; Zaim, M.; Guillet, P. 2002. Bifenthrin: An useful pyrethroid insecticide for treatment of mosquito nets. *J. Med. Entomol.*, 39(3): 526-533.

Hunter, M.S. 1999. The influence of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* on the oviposition behaviour and sex-specific developmental requirements of autoparasitoid wasps. *J. Evol. Biol.*, 12: 735-741.

Hussain, D.; Akram, M.; Iqbal, Z.; Ali, A.; Saleem, M. 2010. Effects of some insecticides on *Trichogramma chilonis* Ishii (Trichogrammatidae: Hymenoptera): Immature and adult survival. *J. Agric. Res.*, 48(4): 531-537.

Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; Omura, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.*, 21: 526-531.

Immaraju, J.A.; Paine, T.D.; Bethke, J.A.; Robb, K.L.; Newman, J.P. 1992. Western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) resistance to insecticides in coastal California greenhouses. *J. Econ. Entomol.*, 85(1): 9-14.

Ínce, I.A.; Demirbağ, Z.; Kati, H. 2014. *Arthrobacter pityocampae* sp. nov., isolated from *Thaumetopoea pityocampa* (Lep., Thaumetopoeidae). *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 64(10): 3384-3389.

IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). 2015. Clasificación de los insecticidas según su modo de acción. <http://www.irac-online.org/modes-of-action/> Último acceso: 5 Mayo 2015.

Ishaaya, I.; Kontsedalov, S.; Horowitz, A.R. 2002. Enamectin, a novel insecticide for controlling field crop pests. *Pest Manag. Sci.*, 58: 1091-1095.

Ismail, M.S.; Soliman, M.F.; Naggar, M.H.; Ghallab, M.M. 2007. Acaricidal activity of spinosad and abamectin against twospotted spider mite. *Exp. Appl. Acarol.*, 43: 129-135.

Jacas, J.; Viñuela, E. 1994. Analysis of a laboratory method to test the effects of pesticides on adult females of *Opius concolor* (Hymn.: Braconidae), a parasitoid of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Dip.: Tephritidae). *Biocontrol Sci. Technol.*, 4: 147-154.

Jacas, J.A.; Urbaneja, A. 2008. Origen de las plagas e historia del control biológico. En: Control biológico de plagas agrícolas. Editado por: Jacas, J.A. & Urbaneja, A. Phytoma-España, Valencia, 3-14.

Jansen, J.P. 1996. Side effects of insecticides on *Aphidius rhopalosiphii* (Hym.: Aphidiidae) in laboratory. *Entomophaga*, 41(1): 37-43.

Jansen, J.P. 2010. Beneficial arthropods and pesticides: building selectivity lists for IPM. *IOBC/wprs Bull.*, 55: 23-47.

Jansen, M.A.K. 2002. Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiol. Plantarum*, 116: 423-429.

Jayakumar, M.; Amudha, P.; Kulandaivelu, G. 2003. Changes in growth and yield of *Phaseolus mungo* L. induced by UV-A and UV-B enhanced radiation. *J. Plant Biol.*, 46(1): 59-61.

Jeyaprakash, A., Hoy, M.A.; Allsopp, M.H. 2003. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *J. Invertebr. Pathol.*, 84: 96-103.

Jones, D.; Collins, M.D. Irregular, Nonsporing, Gram-positive Rods. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G., editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1986. Vol 2: 999-1103. Williams & Wilkins. Baltimore. En: García García, D.; Rojas Mogollón, M.A.; Sánchez Nieves, J. 2006. Cultured microbiological

content of the intestinal tract and stored pollen of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biol. Colomb.*, 11(1): 123-129.

Jones, W.A.; Wolfenbarger, D.A.; Kirk, A.A. 1995. Response of adult parasitoids of *Bemisia tabaci* (Hom.: Aleyrodidae) to leaf residues of selected cotton insecticides. *Entomophaga*, 40(2): 153-162.

Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Dirección general de la producción agraria. 1994. Plagas y enfermedades de los principales cultivos hortícolas de la provincia de Almería: Control racional. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, 260 pp.

Kadur, G.; Swapan, B.; Sunita, K.; Sanjeev, Y.; Arjun, T.; Sanjay, B.; Abhinav, R.; Mohanty, P. 2007. Growth enhancement of soybean (*Glycine max*) upon exclusion of UV-B and UV-B/A components of solar radiation: characterization of photosynthetic parameters in leaves. *Photosynth. Res.*, 94: 299-306.

Kakani, V.G.; Reddy, K.R.; Zhao, D.; Sailaja, K. 2003. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agr. Forest Meteorol.*, 120: 191-218.

Kawada, H.; Ohashi, K.; Dida, G.O.; Sonye, G.; Njenga, S.M.; Mwandawiro, C. 2014. Insecticidal and repellent activities of pyrethroids to the three major pyrethroid-resistant malaria vectors in western Kenya. *Parasit. Vectors*, 7: 208.

Khalil, R.R.; Bassiouny, F.M.; El-DougDoug, K.A.; Abo-Elmaty, S.; Yousef, M.S. 2014. A dramatic physiological and anatomical changes of tomato plants infecting with tomato yellow leaf curl geminivirus. *J. Agric. Technol.*, 10(5): 1213-1229.

Kikuchi, S.; Hayatsu, M.; Hosokawa, T.; Nagayama, A.; Tago, K.; Fukatsu, T. 2012. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(22): 8618-8622.

Kim, S.S.; Seo, S.G.; Park, J.D.; Kim, S.G.; Kim, D.I. 2005. Effects of selected pesticides on the predatory mite, *Amblyseius cucumeris* (Acari: Phytoseiidae). *J. Entomol. Sci.*, 40(2): 107-114.

Koch, H.; Schmid-Hempel, P. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(48): 19288-19292.

Kogan, M. 1998. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Ann. Rev. Entomol.*, 43: 243-270.

Koppert Biological Systems. 2015a. Ficha técnica Bemipar (*Eretmocerus mundus*). <http://www.koppert.es/productos/productos-contraplagas-enfermedades/productos/detalle/bemipar-7>. Último acceso: 24 de Febrero 2015.

Koppert Biological Systems. 2015b. Ficha técnica Swirski-Mite (*Amblyseius swirskii*). <http://www.koppert.es/plagas/moscas-blancas/productos-contramoscas-blancas/detalle/swirski-mite/>. Último acceso: 26 de Febrero 2015.

Kozich, J.J.; Westcott, S.L.; Baxter, N.T.; Highlander, S.K.; Schloss, P.D. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 5112-5120.

Krizek, D.T.; Mirecki, R.M.; Britz, S.J. 1997. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cucumber. *Physiol. Plantarum*, 100: 886-893.

Krizek, D.T.; Britz, S.J.; Mirecki, R.M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiol. Plantarum*, 103: 1-7.

Kuhlmann, F.; Müller, C. 2009. Development-dependent effects of UV radiation exposure on broccoli plants and interactions with herbivorous insects. *Environ. Exp. Bot.*, 66: 61-68.

Kuhlmann, F.; Müller, C. 2010. UV-B impact on aphid performance mediated by plant quality and plant changes induced by aphids. *Plant Biology*, 12: 676-684.

Kuhlmann, F.; Müller, C. 2011. Impacts of ultraviolet radiation on interactions between plants and herbivorous insects: a chemo-ecological perspective. *Prog. Bot.*, 72: 305-347.

Kumar, P.; Poehling, H.M. 2006. UV-blocking plastic films and nets influence vectors and virus transmission on greenhouse tomatoes in the humid tropics. *Environ. Entomol.*, 35(4): 1069-1082.

Kumar, P.; Whitten, M.; Thoeming, G.; Borgemeister, C.; Poehling, H.M. 2008. Effects of bio-pesticides on *Eretmocerus warrae* (Hym., Aphelinidae), a parasitoid of *Bemisia tabaci* (Hom., Aleyrodidae). *J. Appl. Entomol.*, 132: 605-613.

Lacasa, A.; Llorens Climent, J.M. 1996. Trips de cultivos hortícolas: *Frankliniella occidentalis* (Pergande). En: Trips y su control biológico (I). Ed. Pisa Ediciones, Alicante, 135-153.

Lee, H-S; Gillespie, D.R. 2011. Life tables and development of *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) at different temperatures. *Exp. Appl. Acarol.*, 53: 17-27.

Lefebvre, M.; Bostanian, N.J.; Thistlewood, H.M.A.; Mauffette, Y.; Racette, G. 2011. A laboratory assessment of the toxic attributes of six 'reduced risk insecticides' on *Galendromus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae). *Chemosphere*, 84: 25-30.

Lefebvre, M.; Bostanian, N.J.; Mauffette, Y.; Racette, G.; Thistlewood, H.A.; Hardman, J.M. 2012. Laboratory-based toxicological assessments of new insecticides on mortality and fecundity of *Neoseiulus fallacis* (Acari: Phytoseiidae). *J. Econ. Entomol.*, 105(3): 866-871.

Legarrea, S.; Fereres, A.; Weintraub, P.G.; Palevsky, E.; Gerson, U.; Simoni, S. 2009. Compatibility of *Amblyseius swirskii* with UV-absorbing nets. *IOBC/wprs Bull.*, 50: 41-43.

Legarrea, S.; Karnieli A.; Fereres A.; Weintraub P.G. 2010. Comparison of UV-absorbing nets in pepper crops: spectral properties, effects on plants and pest control. *Photochem. Photobiol.*, 86: 324-330.

- Legarrea, S.; Weintraub, P.G.; Plaza, M.; Viñuela, E.; Fereres, A. 2012a. Dispersal of aphids, whiteflies and their natural enemies under photoselective nets. *BioControl*, 57(4): 523-532.
- Legarrea, S.; Díaz, B.M; Plaza, M.; Barrios, L.; Morales, I.; Viñuela, E.; Fereres, A. 2012b. Diminished UV radiation reduces the spread and population density of *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) in lettuce crops. *Hort. Sci.*, 39(2): 74-80.
- Legarrea, S.; Velázquez, E.; Aguado, P.; Fereres, A.; Morales, I.; Rodríguez, D.; Del Estal, P.; Viñuela, E. 2014. Effects of a photoselective greenhouse cover on the performance and host finding ability of *Aphidius ervi* in a lettuce crop. *BioControl*, 59(3): 265-278.
- Licciardi, S.; Assogba-Komlan, F.; Sidick, I.; Chandre, F.; Hougard, J.M.; Martin, T. 2008. A temporary tunnel screen as an eco-friendly method for small scale farmers to protect cabbage crops in Benin. *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 27 (3/4): 152-158.
- Littell, R.C.; Henry, P.R.; Ammerman, C.B. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.*, 76: 1216-1231.
- Liu, L.X.; Xu, S.M.; Woo, K.C. 2005. Solar UV-B radiation on growth, photosynthesis and the xanthophyll cycle in tropical acacias and eucalyptus. *Environ. Exp. Bot.*, 54: 121-130.
- Liu, P.; Liu, Y.; Liu, Q.; Liu, J. 2010. Photodegradation mechanism of deltamethrin and fenvalerate. *J. Environ. Sci.*, 22(7): 1123-1128.
- Liu, T-X.; Stansly, P.A. 1995. Toxicity and repellency of some biorational insecticides to *Bemisia argentifolii* on tomato plants. *Entomol. Exp. Appl.*, 74: 137-143.
- Liu, T.X. 2004. Toxicity and efficacy of spiromesifen, a tetrone acid insecticide, against sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on melons and collards. *Crop Prot.*, 23: 505-513.

Liu, T.X.; Zhang, Y.M.; Peng, L.N.; Rojas, P.; Trumbles, J.T. 2012. Risk assessment of selected insecticides on *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *J. Econ. Entomol.*, 105(2): 490-496.

Llorens Climent, J.M.; Garrido Vivas, A. 1992. Homóptera III. Moscas blancas y su control biológico. Ed. Pisa, Italia, 203 pp.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2014. Guía de Gestión Integrada de Plagas en el olivar. [http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/GUIAOLIVAR_\(2\)_tcm7-348111.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/GUIAOLIVAR_(2)_tcm7-348111.pdf). Último acceso: 26 de Febrero 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015a. Anuario de estadística. http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2013/AE_2013_Completo.pdf. Último acceso: 18 de Febrero 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015b. Producción Integrada. Estadísticas. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/estadisticas/estadistica-produccion-integrada.aspx>. Último acceso: 18 de Febrero 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015c. Lista Comunitaria de sustancias activas incluidas, excluidas y en evaluación Comunitaria y lista de sustancias básicas. http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/Lista_Sustancias_activas_aceptadas_excluidas.pdf. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015d. Registro de productos fitosanitarios, Vertimec® (Abamectina). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/16784.pdf>. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015e. Registro de productos fitosanitarios, Decis Protech® (Deltametrina). <http://www.magra>

ma.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/23545.pdf. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015f. Registro de productos fitosanitarios, Affirm® (Emamectina). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25353.pdf>. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015g. Registro de productos fitosanitarios, Teppeki® (Flonicamida). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/24526.pdf>. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015h. Registro de productos fitosanitarios, Fenos® (Flubendiamida). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25279.pdf>. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015i. Registro de productos fitosanitarios, Alverde® (Metaflumizona). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25414.pdf>. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015j. Registro de productos fitosanitarios, Runner® (Metoxifenocida). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/23764.pdf>. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015k. Registro de productos fitosanitarios, Spintor 480 SC® (Spinosad). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/22839.pdf>. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015l. Registro de productos fitosanitarios, Oberon SC 240® (Spiromesifen). <http://www.magr>

ama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/24010.pdf. Último acceso: 5 Mayo 2015.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2015m. Registro de productos fitosanitarios, Movento® (Spirotetramat). <http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25298.pdf>. Último acceso: 5 Mayo 2015.

Malais, M.H. ; Ravensberg, W.J. 2006. Conocer y reconocer. Las plagas de cultivos protegidos y sus enemigos naturales. Ed. Koppert B.V. & Reed Business Information, Países Bajos, 288 pp.

Manzanares Bartolomé, G. 2012. Ecotoxicology of new pesticides to the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). Trabajo Fin de Carrera. E.T.S.I. Agrónomos. UPM. Madrid.

Maroto, J. V. 2000. Elementos de Horticultura General. Editorial Mundi-Prensa. 424 pp.

Martin, T.; Assogba-Komlan, F.; Houndete, J.; Hougard, J.M.; Chandre, F. 2006. Efficacy of mosquito netting for sustainable small holders' cabbage production in Africa. *J. Econ. Entom.*, 99(2): 450-454.

Martin, T.; Chandre, F.; Chabi, J.; Guillet, P.F.; Akogbeto, M.; Hougard, J.M. 2007. A biological test to quantify pyrethroid in impregnated nets. *Trop. Med. Int. Health*, 12(2): 245-250.

Martin, T.; Assogba-Komlan, F.; Sidick, I.; Ahle, V.; Chandre, F. 2010. An acaricide-treated net to control phytofagous mites. *Crop Prot.*, 29: 470-475.

Martin, T.; Kamal, A.; Gogo, E.; Saidi, M.; Delétré, E.; Bonafos, R.; Simon, S.; Ngouajio, M. 2014. Repellent effect of alphacypermethrin-treated netting against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.*, 107(2): 684-690.

Martínez-González, M.A.; De Irala, J.; Faulin Fajardo, F.J. 2001. Bioestadística amigable. Ed. Díaz de Santos, Madrid, 501 pp.

Martinson, V.G.; Danforth, B.N.; Minckley, R.L.; Rueppell, O.; Tingek, S.; Moran, N.A. 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol. Ecol.*, 20: 619-628.

McMurtry, J.A.; Croft, B.A. 1997. Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Ann. Rev. Entomol.*, 42: 291-321.

Medina, P.; Budia, F.; Tirry, L.; Smagghe, G.; Viñuela, E. 2001. Compatibility of spinosad, tebufenozide and azadirachtin with eggs and pupae of the predator *Chrysoperla carnea* (Stephens) under laboratory conditions. *Biocontrol Sci. Techn.*, 11: 597-610.

Medina, P.; Budia, F.; Del Estal, P.; Adán, A.; Viñuela, E. 2003. Side effects of six insecticides on different developmental stages of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *IOBC/wprs Bull.*, 26(5): 33-40.

Medina, P.; Adán, A.; Del Estal, P.; Budia, F.; Viñuela, E. 2008. Integración del control biológico con otros métodos de control. En: Control biológico de plagas agrícolas. Editado por: Jacas, J.A. & Urbaneja, A. Phytoma-España, Valencia, 469-476.

Meeus, I.; Parmentier, L.; Billiet, A.; Maebe, K.; Van Nieuwerburgh, F.; Deforce, D.; Wäckers, F.; Vandamme, P.; Smagghe, G. 2015. 16s rRNA amplicon sequencing demonstrates that indoor-reared bumblebees (*Bombus terrestris*) harbor a core subset of bacteria normally associated with the wild host. *PLoS ONE*, 10(4): e0125152.

Mercet, R.G. 1931, Notas sobre Aphelinidos (Hym. Chalc.) 4a nota. *Eos. Revista Española de Entomología. Madrid*, 7: 395-410.

Messelink, G.J.; van Maanen, R.; van Steenpaal, S.E.F.; Janssen, A. 2008. Biological control of thrips and whiteflies by a shared predator: two pests are better than one. *Biol. Control*, 44: 372-379.

Miles, M.; Dutton, R. 2003. Testing the effects of spinosad to predatory mites in laboratory, extended laboratory, semi-field and field studies. *IOBC/wprs Bull.*, 26(5): 9-20.

Minard, G.; Mavingui, P.; Moro, C.L. 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit. Vectors.*, 6: 146. doi:10.1186/1756-3305-6-146.

Moens, J.; De Clercq, P.; Tirry, L. 2011. Side effects of pesticides on the larvae of the hoverfly *Episyrphus balteatus* in the laboratory. *Phytoparasitica*, 39: 1-9.

Moens, J.; Tirry, L.; De Clercq, P. 2012. Susceptibility of cocooned pupae and adults of the parasitoid *Microplitis mediator* to selected insecticides. *Phytoparasitica*, 40: 5-9.

Mohr, K.I.; Tebbe, C.C. 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (*Apoidea*) at an oilseed rape field. *Environ. Microbiol.*, 8(2): 258-272.

Momen, F.M.; El-Saway, S.A. 1993. Biology and feeding behaviour of the predatory mite *Amblyseius swirskii* (Acari: phytoseiidae). *Acarologia*, 34(3): 199-204.

Mommaerts, V.; Smagghe, G. 2011. Side-effects of pesticides on the pollinator *Bombus*: an overview. En: Pesticides of the modern world- Pests control and pesticides exposure and toxicity assessment. Editado por: Stoytcheva, M. InTech, Rijeka, 507–552.

Moore, D.J.; Miller, D.N. 2006. Laboratory evaluations of insecticide product efficacy for control of *Cimex lectularius*. *J. Econ. Entomol.*, 99(6): 2080-2086.

Morita, M.; Ueda, T.; Yoneda, T.; Koyanagi, T.; Haga, T. 2007. Flonicamid, a novel insecticide with a rapid inhibitory effect on aphid feeding. *Pest Manag. Sci.*, 63: 969-973.

Mothur software. Version 1.3.1.1. http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP. Último acceso: 4 Marzo 2014.

Muñiz, M.; Nombela, G. 2001. Differential variation in development of the B- and Q- biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on sweet pepper at constant temperatures. *Environ. Entomol.*, 30(4): 720-727.

Nadimi, A.; Kamali, K.; Arbabi, M.; Abdoli, F. 2011. Study on persistence tests of miticides abamectin and fenproximate to predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acarina: Phytoseiidae). *Afr. J. Agric. Res.*, 6(2): 338-342.

Naranjo, S.E. 2001. Conservation and evaluation of natural enemies in IPM systems for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.*, 20: 835-852.

Nauen, R.; Konanz, S. 2005. Spiromesifen as a new chemical option for resistance management in whiteflies and spider mites. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer*, 58(3): 485-502.

Nauen, R.; Schnorbach, H.J.; Elbert, A. 2005. The biological profile of spiromesifen (Oberon®)-a new tetrionic acid insecticide/acaricide. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer*, 58 (3): 417-440.

Nauen, R.; Reckmann, U.; Thomzik, J.; Thielert, W. 2008. Biological profile of spirotetramat (Movento®) – a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. *Bayer CropSci. J.*, 61(2): 245-278.

Nauen, R.; Stumpf, N.; Elbert, A.; Zebitz, C.P.W.; Kraus, W. 2011. Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Pest Manag. Sci.*, 57(3): 253-261.

Oakeshott, J.G.; Johnson, R.M.; Berenbaum, M.R.; Ranson, H.; Cristino, A.S.; Claudianos, C. 2010. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol. Biol.*, 19(1): 147-163.

Ohshiro, K.; Kakuta, T.; Nikaidou, N.; Watanabe, T.; Uchiyama, T. 1999. Molecular cloning and nucleotide sequencing of organophosphorus insecticide hydrolase gene from *Arthrobacter* sp. strain B-5. *J. Biosci. Bioeng.*, 87(4): 531-534.

OJEC (Official Journal of the European Communities). 1991. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991, concerning the placing of plant protection products on the market. *OJEC*, 230: 1-32.

OJEC (Official Journal of the European Communities). 2000. Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. *OJEC*, 169: 1-112.

OJEU (Official Journal of the European Union). 2008. Commission regulation (EC) No 404/2008 of 6 May 2008 amending Annex II to Council Regulation (EEC) No 2092/91 on organic production of agricultural products as concerns the authorisation of spinosad, potassium bicarbonate and copper octanoate and the use of ethylene. *OJEU*, 120: 8-10.

OJEU (Official Journal of the European Union), 2009a. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009, establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *OJEU*, 309: 71-86.

OJEU (Official Journal of the European Union). 2009b. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009, concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *OJEU*, 309: 1-50.

Olivares Fernández, J. 2012. Toxicity evaluation of pesticides in the predator *Orius laevigatus* (Fieber). Trabajo Fin de Carrera. E.T.S.I. Agrónomos. UPM. Madrid.

Oliveira, M.R.V.; Henneberry, T.J.; Anderson, P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.*, 20: 709-723.

Oliver, K.M.; Russel, J.A.; Moran, N.A.; Hunter, M.S. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(4): 1803-1807.

Ortega Arenas, L.D.; Fu Castillo, A.A.; Lourençao, A.L.; Rodríguez Hernández, C.; Gomes Quevedo Fugi, C.; García Valente, F.; Arredondo Bernal, H.C.; Lara Reyna, J.; Djair Vendramim, J.; Avilés González, M.C.; Nava Camberos, U.; Carapia Ruiz, V.E.

2008. Moscas blancas: temas selectos sobre su manejo. Ed. Mundi-Prensa, México, 120 pp.

Paoletti, E. 2005. UV-B and Mediterranean forest species: Direct effects and ecological consequences. *Environ. Pollut.*, 137: 372-379.

Park, H-H; Shipp, L.; Buitenhuis, R. 2010. Predation, development, and oviposition by the predatory mite *Amblyseius swirkii* (Acari: Phytoseiidae) on tomato russet mite (Acari: Eriophyidae). *J. Econ. Entomol.*, 103 (3): 563-569.

Paul, N.D.; Gwynn-Jones, D. 2003. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends Ecol. Evol.*, 18(1): 48-55.

Paul, N.D.; Moore, J.P.; McPherson, M.; Lambourne, C.; Croft, P.; Heaton, J.C.; Wargent, J.J. 2012. Ecological responses to UV radiation: interactions between the biological effects of UV on plants and on associated organisms. *Physiol. Plantarum*, 145: 565-581.

Pereira Lopes, A.M. 2003. Distribución y dinámica poblacional de *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) en los cultivos de tomate de Portugal: relación con la incidencia del virus TYLCV. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 333 pp.

Picó, B.; Díez, M.J.; Nuez, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus - a review. *Sci. Hortic-Amsterdam*, 67: 151-196.

Potter, C. 1952. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. *Ann. Appl. Biol.*, 39: 1-28.

Price, P.W.; Bouton, C.E.; Gross, P.; McPherson, B.A.; Thompson, J.N.; Weis, A.E. 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 11: 41-65.

- Provost, C. ; Coderre, D.; Lucas, E.; Bostanian, N.J. 2003. Impact of lambda-cyhalothrin on intraguild predation among three mite predators. *Physiol. Ecol.*, 32(2): 256-263.
- Rahman, T.; Spafforda, H.; Broughton, S. 2011. Compatibility of spinosad with predaceous mites (Acari) used to control *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Pest Manag. Sci.*, 67: 993-1003.
- Rao, Q.; Wang, S.; Su, Y.L.; Bing, X.L.; Liu, S.S.; Wang, X.W. 2012. Draft genome sequence of “Candidatus *Hamiltonella defensa*” an endosymbiont of the whitefly *Bemisia tabaci*. *J. Bacteriol.*, 194(13): 3558.
- Raviv, M.; Antignus, Y. 2004. UV radiation effects on pathogens and insect pests of greenhouse-grown crops. *Photochem. Photobiol.*, 79(3): 219-226.
- Reche Mármol, J. 2012. Manual práctico de la horticultura protegida. Ed. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, 445 pp.
- Robledo Camacho, A.; van der Blom, J.; Sánchez Martínez, J.A.; Torres Giménez, S. 2009. Control biológico en invernaderos hortícolas. Ed. Coexphal-FAECA, Almería, 176 pp.
- Roditakis, E.; Fytrou, N.; Staurakaki, M.; Vontas, J.; Tsagkarakou, A. 2014. Activity of flonicamid on the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) and its natural enemies. *Pest Manag. Sci.*, 70: 1460-1467.
- Rodrigues, J.R.; Miranda, N.R.C.; Rosas, J.D.F.; Maciel, C.M.; Torres, L.M. 2002. Side-effects of fifteen insecticides on predatory mites (Acari: Phytoseiidae) in apple orchards. *IOBC/wprs Bull.*, 25(11): 53-61.
- Rodríguez, M.D.; Moreno, R.; Téllez, M.M.; Rodríguez, M.P.; Fernández, R. 1994. *Eretmocerus mundus* (Mercet), *Encarsia lutea* (Masi) y *Encarsia transvena* (Timberlake) (Hym: Aphelinidae) parasitoides de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) en los cultivos hortícolas protegidos almerienses. *Bol. San. Veg. Plagas*, 20: 695-702.

Rodríguez-Reina, J.M.; García-Marí, F.; Ferragut, F. 1992. Actividad depredadora de varios ácaros fitoseidos sobre distintos estados de desarrollo del trips de las flores *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Bol. San. Veg. Plagas*, 18: 253-263.

Rozema, J.; van de Staaij, J.; Björn, L.O.; Caldwell, M. 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol. Evol.*, 12(1): 22-28.

Russell, R.J.; Scott, C.; Jackson, C.J.; Pandey, R.; Pandey, G.; Taylor, M.C.; Coppin, C.W.; Liu, J.W.; Oakeshott, J.G. 2011. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evol. Appl.*, 4: 225-248.

Sáenz De Cabezón Irigaray, F. J.; Zalom, F. G. 2007. Selectivity of acaricide exposure on *Galendromus occidentalis* reproductive potential. *Biocontrol Sci. Techn.*, 17(5): 541-546.

Salgado, V.L. 1998. Studies on the mode of action of Spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 60: 91-102.

Salgado, V.L.; Hayashi, J.H. 2007. Metaflumizone is a novel sodium channel blocker insecticide. *Vet. Parasitol.*, 150: 182-189.

Sánchez-Campos, S.; Navas-Castillo, J.; Camero, R.; Soria, C.; Díaz, J.A.; Moriones, E. 1999. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology*, 89(11): 1038-1043.

Santos, I.; Almeida, J.M.; Salema, R. 1993. Plants of *Zea mays* L. developed under enhanced UV-B radiation. I. Some ultrastructural and biochemical aspects. *J. Plant Physiol.*, 141: 450-456.

Sattar, S.; Farmanullah; Saljoqi, A.R.; Arif, M.; Sattar, H.; Qazi, J.I. 2011. Toxicity of some new insecticides against *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under laboratory and extended laboratory conditions. *Pakistan J. Zool.*, 43(6): 1117-1125.

Sayyed, A.H.; Pathan, A.K.; Faheem, U. 2010. Cross-resistance, genetics and stability of resistance to deltamethrin in a population of *Chrysoperla carnea* from Multan, Pakistan. *Pestic. Biochem. Phys.*, 98: 325-332.

Schleifer, K.H. Gram-Positive Cocci. In: Sneath, P.H.A.; Miar, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G., editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1986. Vol 2: 999-1103. Williams & Wilkins. Baltimore. In: García García, D.; Rojas Mogollón, M.A.; Sánchez Nieves, J. 2006. Cultured microbiological content of the intestinal tract and stored pollen of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biol. Colomb.*, 11(1): 123-129.

Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T.; Hall, J.R.; Hartmann, M.; Hollister, E.B.; Lesniewski, R.A.; Oakley, B.B.; Parks, D.H.; Robinson, C.J.; Sahl, J.W.; Stres, B.; Thallinger, G.G.; Van Horn, D.J.; Weber, C.F. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 7537-7541.

Schneider, M.I.; Smagghe, G.; Viñuela, E. 2003. Susceptibility of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) adults to several insect growth regulators and spinosad by different exposure methods. *IOBC/wprs Bull.*, 26(5): 111-122.

Schneider, M., Smagghe, G., and Viñuela, E. 2004. Comparative effects of several insect growth regulators and spinosad on the different developmental stages of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*. *IOBC/wprs Bull.*, 27(5): 13-19.

Schnorbach, J.; Elbert, A.; Laborie, B.; Navacerrada, J.; Bangels, E.; Gobin, B. 2008. Movento®, an ideal tool for integrated pest management in pome fruit, citrus and vegetables. *Bayer CropSci. J.*, 61(2): 377-402.

Schuster, D.J.; Stansly, P.A. 2000. Response of two lacewings species to biorational and broad-spectrum insecticides. *Phytoparasitica*, 28(4): 297-304.

Semeniuk, P.; Goth, R.W. 1980. Effects of ultraviolet irradiation on local lesion development of potato virus S on *Chenopodium quinoa* 'Valdivia' leaves. *Environ. Exp. Bot.*, 20: 95-98.

Shapir, N.; Mongodin, E.F.; Sadowsky, M.J.; Daugherty, S.C.; Nelson, K.E.; Wackett, L.P. 2007. Evolution of catabolic pathways: Genomic insights into microbial *s*-triazine metabolism. *J. Bacteriol.*, 189(3): 674-682.

Shipp, J.L.; Wang, K.; Ferguson, G. 2000. Residual toxicity of avermectin b1 and pyridaben to eight commercially produced beneficial arthropod species used for control of greenhouse pests. *Biol. Control*, 17: 125-131.

Shoemaker, D.D.; Machado, C.A.; Molbo, D.; Werren, J.H.; Windsor, D.M.; Herre, E.A. 2002. The distribution of *Wolbachia* in fig wasps: correlations with host phylogeny, ecology and population structure. *Proc. R. Soc. Lond.*, 269: 2257-2267.

Smacchi, E.; Gobbetti, M.; Rossi, J.; Fox, P. 2000. Purification and characterization of an extracellular esterase from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *Lait*, 80(2): 255-265.

Smaghe, G.; Gomez, L.E.; Dhadialla, T.S. 2013. The bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. *Adv. Insect Physiol.*, 43: 163-249.

Snowdon, J.A.; Cliver, D.O. 1996. Microorganisms in honey. *Int. J. Food Microbiol.*, 31: 1-26.

Sood, P.; Nath, A. 2002. Bacteria associated with *Bactrocera* sp. (Diptera: Tephritidae)-isolation and identification. *Pest Manag. Econ. Zool.*, 10(1): 1-9.

Sparks, T.C.; Watson, G.B.; Loso, M.R.; Geng, C.; Babcock, J.M.; Thomas, J.D. 2013. Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pestic. Biochem. Phys.*, 107: 1-7.

Stach, J.E.M.; Maldonado, L.A.; Ward, A.C.; Goodfellow, M.; Bull, A.T. 2003. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environ. microbial.*, 5(10): 828-841.

Sterk, G.; Hassan, S.A.; Baillod, M.; Bakker, F.; Bigler, F.; Blümel, S.; Bogenschütz, H.; Boller, E.; Bromand, B.; Brun, J.; Calis, J.N.M.; Coremans-Pelseneer, J.; Duso, C.; Garrido, A.; Grove, A.; Heimbach, U.; Hokkanen, H.; Jacas, J.; Lewis, G.B.; Moreth, L.; Polgar, L.; Roversti, L.; Samsoe-Petersen, L.; Sauphanor, B.; Schaub,

A.; Stäubli, A.; Tuset, J.J.; Vainio, A.; van de Veire, M.; Viggiani, G.; Viñuela, E.; Vogt, H. 1999. Results of the seventh joint pesticides testing programme carried out by the IOBC/wprs-Working Group “Pesticides and Beneficial Organisms”. *BioControl*, 44: 99-117.

Sterk, G.; Heuts, F.; Merck, N.; Bock, J. 2003. Sensitivity of non-target arthropods and beneficial fungal species to chemical and biological plant protection products: results of laboratory and semi-field trials. En: *Proceedings of the First International Symposium on Biological Control of Arthropods*, Honolulu, 2002, USDA Forest Service, 306–313.

Stouthamer, R.; Luck, R.F.; Hamilton, W.D. 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 2424-2427.

Strid, Å.; Chow, W.S.; Anderson, J.M. 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth. Res.*, 39: 475-489.

STSC. 1897. Statgraphics user’s guide, Version 5.1. Graphic software system, STSC, Rockville, MD, USA.

Su, Q.; Oliver, K.M.; Pan, H.; Jiao, X.; Liu, B.; Xie, W.; Wang, S.; Wu, Q.; Xu, B.; White, J.A.; Zhou, X.; Zhang, Y. 2013. Facultative symbiont *Hamiltonella* confers benefits to *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), an invasive agricultural pest worldwide. *Environ. Entomol.*, 42(6): 1265-1271.

Sugiyama, K.; Katayama, H.; Saito, T. 2011. Effect of insecticides on the mortalities of three whitefly parasitoid species, *Eretmocerus mundus*, *Eretmocerus eremicus* and *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 46: 311-317.

Takagi, K.; Hamaguchi, H.; Nishimatsu, T.; Konno, T. 2007. Discovery of metaflumizone, a novel semicarbazone insecticide. *Vet. Parasitol.*, 150: 177-181.

Takken, W. 2002. Do insecticide-treated bednets have an effect on malaria vectors? *Trop. Med. Int. Health*, 7(12): 1022-1030.

Téllez, M.M.; Lara, L.; Stansly, P.H.; Urbaneja, A. 2003. *Eretmocerus mundus* (Hym.: Aphelinidae), parasitoide autóctono de *Bemisia tabaci* (Hom.: Aleyrodidae): Primeros resultados de eficacia en judía. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 511-521.

Teramura, A.H. 1983. Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiol. Plant.*, 58: 415-427.

Thomazoni, D.; Soria, M.F.; Kodama, C.; Carbonar, V.; Fortunato, R.P.; Degrande, P.E., Valter, V.A. 2009. Selectivity of insecticides for adult workers of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Rev. Colomb. Entomol.*, 35(2): 173-176.

Tirello, P.; Pozzebon, A.; Duso, C. 2013. The effect of insecticides on the non-target predatory mite *Kampimodromus aberrans*: laboratory studies. *Chemosphere*, 93: 1139-1144.

Tohnishi, M.; Nakao, H.; Furuya, T.; Seo, A.; Kodama, H.; Tsubata, K.; Fujioka, S.; Kodama, H.; Hirooka, T.; Nishimatsu, T. 2005. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests. *J. Pestic. Sci.*, 30(4): 354-360.

Tomlin, C.D.S. 2009. The pesticide manual. A world compendium. Ed. BCPC, Hampshire, 1457 pp.

Tsai, J.H.; Wang, K. 1996. Development and reproduction of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on five host plants. *Environ. Entomol.*, 25(4): 810-816.

Tzeng, C.C.; Kao, S.S. 1995. Toxicity of insecticides to *Eretmocerus orientalis* and *Encarsia transversa* – parasitoids of silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii*). *Plant Prot. Bull.*, 37(3): 271-279.

Tzeng, C.C.; Kao, S.S. 1999. Toxicity of nine insecticides to *Eretmocerus orientalis* adults – a parasitoid of silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii*). *Plant Prot. Bull.*, 41: 83-86.

Ulrich, R.G.; Buthala, D.A.; Klug, M.J. 1981. Microbiota associated with the gastrointestinal tract of the common house cricket, *Acheta domestica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(1): 246-254.

Urbaneja, A.; Jacas, J.A. 2008. Tipos de control biológico y métodos para su implementación. En: *Control biológico de plagas agrícolas*. Editado por: Jacas, J.A. & Urbaneja, A. *Phytoma-España*, Valencia, 15-24.

Urbaneja, A.; Sánchez, E. & Stansly, P. A. 2007. Life history of *Eretmocerus mundus*, a parasitoid of *Bemisia tabaci* on tomato and sweet pepper. *BioControl*, 52: 25-39.

Urbaneja, A.; Stansly, P.A. 2004. Host suitability of different instars of the whitefly *Bemisia tabaci* 'biotype Q' for *Eretmocerus mundus*. *BioControl*, 49: 153-161.

van de Veire, M.; Cornelis, W.; Tirry, L. 2001. Development of a laboratory test method to determine the duration of pesticide-effects on predatory mites. *IOBC/wprs Bull.*, 24(4): 61-66.

van de Veire, M.; Tirry, L. 2003. Side effects of pesticides on four species of beneficials used in IPM in glasshouse vegetable crops: "worst case" laboratory tests. *IOBC/wprs Bull.*, 26(5): 41-50.

van de Veire, M.; Viñuela, E.; Bernardo, U.; Tirry, L.; Adan, A.; Viggiani, G. 2004. Duration of the toxicity of abamectin and spinosad on the parasitic wasp *Encarsia formosa* Gahan in Northern and Southern Europe. *IOBC/wprs Bull.*, 27(6): 21-30.

van der Blom J. 2002. La introducción artificial de la fauna auxiliar en cultivos agrícolas. *Bol. San. Veg. Plagas*, 28: 107-118.

van der Blom, J. 2007. Control de plagas en hortalizas protegidas: Almería, el año de la transición. *Horticultura*, 200: 36-43.

van Leeuwen, T.; van Pottelberge, S.; Tirry, L. 2005. Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Manag. Sci.*, 61: 499-507.

van Lenteren, J.C.; Noldus, L.P.J.J. 1990. Whitefly-Plant relationships: behavioural and ecological aspects, pp 47-89. En: *Whiteflies: their bionomics, pest status and managemet*. Editado por: Gerling, D. Intercept Ltd., UK, 47-89.

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

Vasanthakumar, A.; Handelsman, J.; Schloss, P.D.; Bauer, L.S., Raffa, K.F. 2008. Gut microbiota of an invasive subcortical beetle, *Agrilus planipennis* Fairmaire, across various life stages. *Environ. Entomol.*, 37(5): 1344-1353.

Verdaguer, D.; Llorens, L.; Bernal, M.; Badosa, J. 2012. Photomorphogenic effects of UVB and UVA radiation on leaves of six Mediterranean sclerophyllous woody species subjected to two different watering regimes at the seedling stage. *Environ. Exp. Bot.*, 79: 66-75.

Vet, L.E.M.; Dicke, M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 141-172.

Vincent, C.; Weintraub, P.G.; Hallman, G.J.; Fleurat-Lessard, F. 2009. Insects management with physical methods in pre- and post-harvest situations. En: Integrated Pest Management: Concepts, tactics, strategies and case studies. Editado por: Radcliffe, E.B.; Hutchison, W.D. & Cancelado, R.E. Cambridge University Press, Reino Unido, 309-323.

Viñuela, E. 2005. La lucha biológica, pieza clave de la agricultura sostenible. En: El control biológico de plagas y enfermedades. Editado por: Jacas, J.; Caballero, P. & Avilla, J. Publicaciones de la Universitat Jaume I, Castelló de la Plana, 15-30.

Weintraub, P.G. 2009. Physical control: An important tool in Pest Management Programs. En: Biorational Control of Arthropod Pests, Application and Resistance Management. Editado por: Ishaaya, I. & Horowitz, A.R. Springer, 317-324.

Werren, J.H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 587-609.

Wheelock, C.E.; Shan, G.; Ottea, J. 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J. Pestic. Sci.*, 30(2): 75-83.

WHO (World Health Organization). 2014a. World malaria report 2014. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-no-pro

files.pdf. Último acceso: 14 Septiembre 2015.

WHO (World Health Organization). 2014b. WHO recommended insecticide products for treatment of mosquito nets for malaria vector control. http://www.who.int/whopes/Insecticides_ITN_Malaria_Nov2014.pdf?ua=1. Último acceso: 14 Septiembre 2015.

WHO (World Health Organization). 2015. WHO recommended long-lasting insecticidal nets. http://www.who.int/whopes/Long-lasting_insecticidal_nets_September_2015.pdf?ua=1. Último acceso: 14 Septiembre 2015.

Williams, T.; Valle, J.; Viñuela, E. 2003. Is the naturally derived insecticide spinosad compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Sci. Techn.*, 13: 459-475.

Yalpani, N.; Enyedi, A.J.; León, J.; Raskin, I. 1994. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta*, 193: 372-376.

Yu, H.; Wang, Z.; Liu, L.; Xia, Y.; Cao, Y.; Yin, Y. 2008. Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. *Curr. Microbiol.*, 56: 391-396.

Yu, S.J. 1996. Insect Glutathione S-Transferases. *Zool. Stud.*, 35(1): 9-19.

Zaim, M.; Aitio, A.; Nakashima, N. 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med. Vet. Entom.*, 14: 1-5.

Zhu, Y.; Loso, M.R.; Watson, G.B.; Sparks, T.C.; Rogers, R.B.; Huang, J.X.; Gerwick, B.C.; Babcock, J.M.; Kelley, D.; Hegde, V.B.; Nugent, B.M.; Renga, J.M.; Denholm, I.; Gorman, K.; DeBoer, G.J.; Hasler, J.; Meade, T.; Thomas, J.D. 2011. Discovery and characterization of sulfoxafloor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 2950-2955.