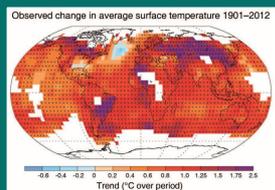
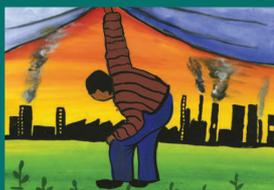
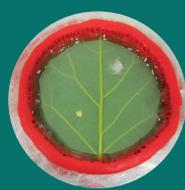


Tesis Doctoral

Universidad de Málaga

Cambio climático y control biológico de plagas: Efecto de las condiciones abióticas en las interacciones entre enemigos naturales presentes en el agro-ecosistema del aguacate.

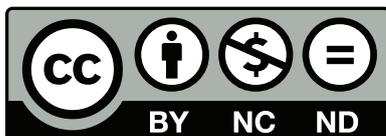




SPICUM
servicio de publicaciones

AUTOR: Celeste Guzmán

EDITA: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Cambio climático y control biológico de plagas:
efecto de las condiciones abióticas en las interacciones entre
enemigos naturales presentes en el agro-ecosistema del aguacate.

Portada: Fotos de parcela de aguacates, arenas experimentales, flor y polen de *Carpobrotus edulis* y ácaros fitoseidos (*Euseius stipulatus* y *E. scutalis*) realizadas por C.Guzmán. Dibujo realizado por Anoushka Bhari de 8 años (Kenia) para el concurso internacional de pintura dedicado al cambio climático “Paint for the Planet”, dentro del programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Gráfica tomada de IPCC 2013 (cambios observados en el promedio de la temperatura de la superficie terrestre 1901-2012)

Diseño de portada: dmg Diseño Gráfico. David Mieres de Juan



Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga
Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL

Cambio climático y control biológico de plagas: efecto de las condiciones abióticas en las interacciones entre enemigos naturales presentes en el agro-ecosistema del aguacate.

Memoria presentada por la Licenciada en Biología Celeste Guzmán para optar al grado de Doctor.

Directora de tesis: Dra. Marta Montserrat Larrosa

Málaga, 2014



Marta Montserrat Larrosa, científica titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”.

CERTIFICA: que la memoria titulada “Cambio climático y control biológico de plagas: efecto de las condiciones abióticas en las interacciones entre enemigos naturales presentes en el agro-ecosistema del aguacate” que presenta la licenciada Celeste Guzmán para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste, y tenga los efectos que corresponda extendiendo el presente informe.
Málaga, diciembre de 2013.

Fdo: Marta Montserrat Larrosa



Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias

Antonio de Vicente Moreno, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga.

CERTIFICA: que Dña. Celeste Guzmán, licenciada en Biología, ha realizado el trabajo que lleva como título “Cambio climático y control biológico de plagas: efecto de las condiciones abióticas en las interacciones entre enemigos naturales presentes en el agro-ecosistema del aguacate” recogido en esta memoria, del cuál he sido tutor académico.

Y para que así conste, y tenga los efectos que corresponda extendiendo el presente informe.
Málaga, diciembre de 2013.

Fdo: Antonio de Vicente Moreno



Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias

Dr. **Juan José Borrego García**, director del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga.

ACREDITA: que la Tesis Doctoral titulada “Cambio climático y control biológico de plagas: efecto de las condiciones abióticas en las interacciones entre enemigos naturales presentes en el agro-ecosistema del aguacate” que presenta Dña. Celeste Guzmán para optar al título de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Marta Montserrat Larrosa, científica titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para que así conste, y tenga los efectos que corresponda extendiendo el presente informe.
Málaga, diciembre de 2013.

Fdo: Juan José Borrego García

Los trabajos realizados en la presente tesis doctoral han sido realizados en las instalaciones del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora y fueron financiados con una beca pre-doctoral asignada al Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía, P08-AGR-3694 titulado “Optimización del cultivo sostenible del aguacate (*Persea americana* Mill) en Andalucía”, y por el proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia, AGL2011-30538-C03-03, titulado “Ingeniería de redes tróficas en aguacate y cítricos: mejora del control biológico y efectos de las condiciones ambientales en interacciones tri-tróficas de relevancia”

Los resultados descritos en esta tesis doctoral han sido publicados y presentados en las siguientes revistas científicas y congresos nacionales e internacionales:

- Montserrat M., Guzman C., Sahun R. M., Belda J.E & Hormaza J.I (2013) Pollen supply promotes, but high temperatures demote, predatory mite abundance in avocado orchards . *Agriculture Ecosystems & Environment* 164: 155-161.
- C. Guzmán, E. Aguilar-Fenollosa, R.M Sahún & M. Montserrat Interacciones entre dos especies de ácaros depredadores en aguacate en un escenario de cambio climático. Comunicación Oral. Ponente: C. Guzmán. Congreso: VIII Congreso Nacional de Entomología Aplicada y XIV Jornadas científicas de la SEEA. Mataró (España), octubre 2013
- Autores: C. Guzmán, E. Aguilar-Fenollosa, E. Wong, Boyero J.R., Vela J.M., Sahún R.M. y M. Montserrat.. When climate matters: environmental warming governs predatory mite species dominance in avocado agro-ecosystems. Comunicación oral. Ponente: M. Montserrat .3rd International Entomophagous Insects Conference, Orford (Québec) Canadá, junio 2013
- Autores: C. Guzmán, E. Aguilar-Fenollosa, R.M Sahún, M. Montserrat. Environmental warming influences the relative competitive ability between two natural enemies sharing a common prey. Póster. 4th International Symposium on Biological Control of Arthropods. Pucón (Chile), marzo 2013.
- Autores: C. Guzmán, E. Aguilar-Fenollosa, I. Torres-Campos, R.M Sahún, J.A. Jacas, M. Montserrat. Environmental conditions affect competitive and predatory interactions among natural enemies. Implications for pest biological control in a changing climate. Comunicación oral invitada. Ponente M. Montserrat. 4th International Symposium on Biological Control of Arthropods. Pucón (Chile), marzo 2013
- Autores: Guzmán C., Aguilar-Fenollosa E., Sahún R.M, Jacas J.A y Montserrat M. Efecto de las condiciones ambientales en la habilidad competitiva de dos enemigos naturales en aguacate. Comunicación Oral. Ponente: C. Guzmán. VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada y XIII Jornadas científicas de la SEEA. Baeza (España), octubre 2011

- Guzmán C., Sahún y Montserrat M. ¿Puede el calentamiento global obstaculizar el control biológico de las plagas? El ejemplo del agro-ecosistema del aguacate en el sur-este español. Comunicación Oral. Ponente: M. Montserrat. VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada y XIII Jornadas científicas de la SEEA, Baeza (España), octubre 2011

A mi familia

Indice

- Introducción general	15
- Objetivos	30
- Capítulo 1: El polen promueve, pero las altas temperaturas restringen, la abundancia de ácaros depredadores en cultivos de aguacate.	35
- Introducción capítulos 2,3 y 4	57
- Capítulo 2: Efecto de las condiciones abióticas sobre parámetros relacionados con la eficacia biológica de <i>E. stipulatus</i> y <i>E. scutalis</i>	69
- Capítulo 3: Efecto de las condiciones abióticas en la depredación intragremial entre <i>E. stipulatus</i> y <i>E. scutalis</i> .	85
- Capítulo 4: Estudio de la capacidad competitiva de <i>E. stipulatus</i> y <i>E. scutalis</i> en función de las condiciones abióticas.	97
- Capítulo 5: Interacción entre agro-ecosistemas y su efecto en la dinámica depredador-presa: una aproximación molecular.	117
- Conclusiones	157
- Bibliografía	161
- Anexos	181

Introducción general

i. Introducción general

i.1. El cambio climático

Según el Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático “el calentamiento del sistema climático es inequívoco, como evidencian ya los aumentos observados del promedio mundial de la temperatura del aire y del océano, el deshielo generalizado de nieves y hielos y el aumento del promedio mundial del nivel del mar” (IPCC 2007, Hughes 2000). El promedio de temperatura global se ha incrementado 0.74°C entre 1906 y 2005 (IPCC 2007). En Europa la temperatura es 1.4°C mayor que en la era pre-industrial (EAA 2007). Las predicciones proyectan un incremento de la temperatura global entre $1.8\text{-}4.0^{\circ}\text{C}$ durante este siglo, aunque algunos modelos predicen incluso un incremento mayor, entre $1.1\text{-}6.4^{\circ}\text{C}$.

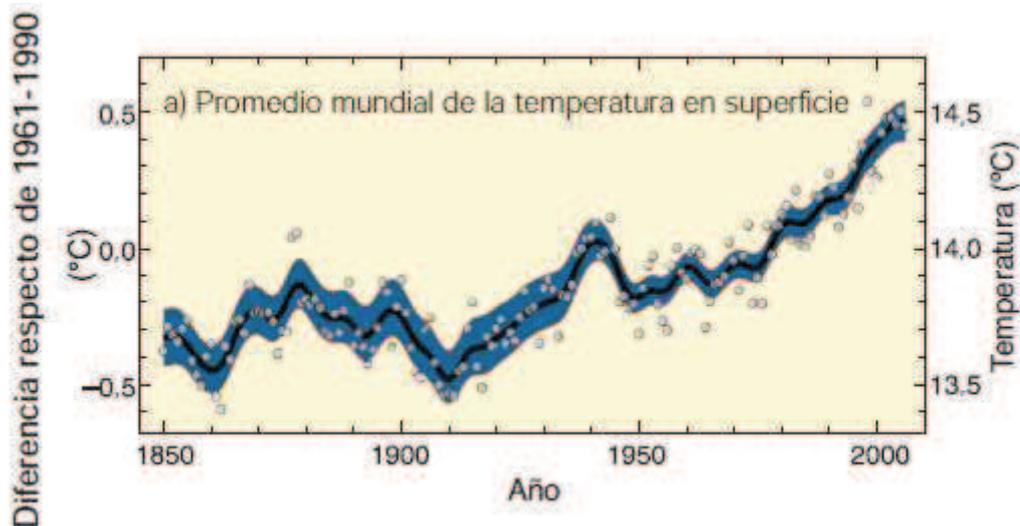


Figura i.1. Variación observada del promedio mundial de las temperaturas en superficie. Las diferencias han sido calculadas respecto de los promedios correspondientes durante el período 1961-1990. Los círculos expresan los valores anuales mientras que las curvas alisadas representan los valores promediados decenalmente. Las áreas sombreadas representan los intervalos de incertidumbre estimados a partir de un análisis completo de las incertidumbres. Figura tomada de IPCC (2007).

La mayor parte del incremento observado del promedio mundial de temperatura desde mediados del siglo XX (Fig. i.1) se debe muy probablemente al aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI) emitidas por causas antropogénicas, emisiones que han aumentado un 70% entre 1970 y 2004 (IPCC 2007). En la figura i.2 se puede observar el incremento de la temperatura continental a nivel mundial durante el período 1906-2005, junto a los resultados obtenidos mediante ajustes de datos a modelos climáticos que contemplan causas naturales (variación en la

radiación solar, actividad volcánica y variación de la composición de la atmósfera) y a modelos que incluyen tanto causas naturales como debidas a la acción del hombre (emisión de GEI y gases fluorados). En esta figura se observa un mejor ajuste de los datos experimentales a los modelos que incluyen causas naturales y causas debidas a la acción del hombre, que a aquellos que solo incluyen causas naturales.

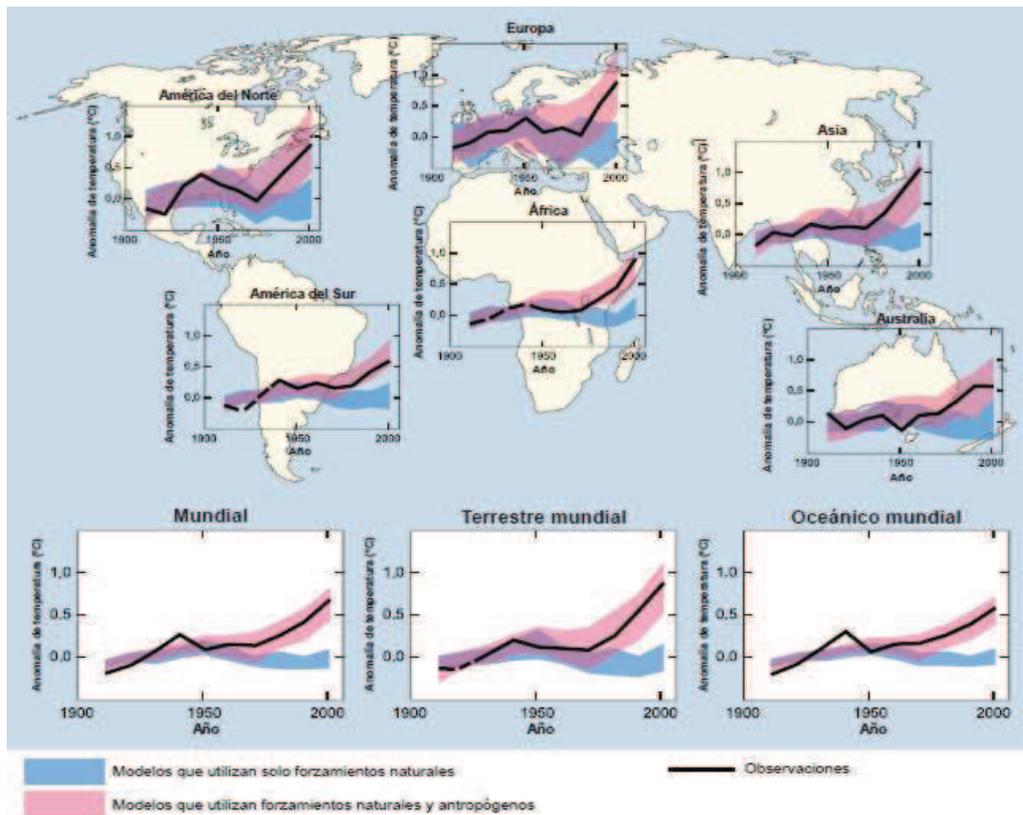


Figura i.2. Cambios experimentados por la temperatura a nivel mundial y continental en el período 1906-2005 (línea negra), comparados con los resultados de modelos del clima que contemplan forzamientos naturales (franja azul) o forzamientos naturales y antropogénicos (franja rosa). Nótese un mejor ajuste de las observaciones a los modelos que incluyen causas naturales y causas antropogénicas, que a los que solo incluyen causas naturales. Figura obtenida de IPCC 2007.

Cabe destacar que en el último informe presentado por el IPCC (2013) los expertos reafirman la responsabilidad del hombre en el cambio climático, y afirman que existe una probabilidad de al menos el 95% de que el aumento de las temperaturas a partir de los años 50 haya sido provocado por el ser humano.

En cuanto a las precipitaciones, desde 1900 éstas aumentaron notablemente en algunas regiones (Europa septentrional, Asia septentrional y central, partes orientales del norte de América del Sur y del Norte), aunque también descendieron en el

Mediterráneo, sur de África y ciertas partes del sur de Asia (IPCC 2007). En el último informe (IPCC 2013) los expertos advierten que las regiones más húmedas tendrán en el futuro más precipitaciones, lo que aumentará el riesgo de inundaciones, mientras que las zonas más áridas sufrirán períodos más intensos y prolongados de sequía.

Además, en los dos últimos informes (IPCC 2007, 2013) se predice un incremento en la intensidad, frecuencia y duración de eventos extremos tales como olas de calor y de frío, sequías severas, huracanes e inundaciones (IPCC 2007).

i.1.1. Efectos del cambio climático en los sistemas naturales y agrícolas

El cambio en las condiciones climáticas regionales o locales, especialmente el aumento de las temperaturas, está teniendo numerosas consecuencias sobre los sistemas naturales en todos los continentes. En efecto, en la literatura encontramos evidencias de que el cambio climático está alterando la fenología, distribución, diversidad y composición de las especies en comunidades de plantas (Morecroft and Keith 2009), aves (Fiedler 2009), mamíferos (Humphries 2009), insectos (Pelini et al. 2009), en ecosistemas marinos pelágicos y planctónicos (Edwards 2009) y en arrecifes de coral (Attrill 2009).

El efecto de los cambios en el clima, en las concentraciones de CO₂, en la disposición de nitrógeno en el suelo, y demás consecuencias derivadas del cambio climático sobre la biología y ecología de las especies y sobre las múltiples interacciones que se dan entre ellas está siendo ampliamente estudiado. En una reciente revisión de Tylianakis et al. (2008) se resumen datos de 688 publicaciones que muestran evidencias de efectos causados por el cambio climático en la intensidad y/o dirección de las interacciones bióticas, como la competencia (planta-planta, animal-animal), parasitismo, mutualismo (planta-polinizador), depredación etc. Como ejemplos, la relación mutualista entre plantas y sus polinizadores puede verse afectada negativamente si el cambio climático produce desfases fenológicos entre el periodo de floración de las plantas y la actividad de los polinizadores (Memmott et al. 2007); La relación competitiva entre especies puede verse modificada debido a las diferentes respuestas de los individuos a un cambio en el clima, que pueden, por ejemplo, favorecer el balance competitivo hacia las especies mejor adaptadas (lo cual también se describe en el capítulo 4 de esta tesis); Las especies invasoras, cuyo establecimiento se vea favorecido por el incremento de las temperaturas, pueden alterar la estructura y la composición de las comunidades, ya que si, por ejemplo, en este nuevo ambiente éstas son competitivamente superiores en la explotación de los recursos que las especies nativas,

es muy probable que las excluyan, y sustituyan, en el hábitat (Snyder & Evans 2006). En esta revisión se destaca la existencia de una gran variabilidad entre los estudios en cuanto a la magnitud y dirección de los efectos del cambio climático sobre las interacciones, por lo que concluyen que son necesarios estudios del efecto del cambio climático sobre las interacciones teniendo en cuenta contextos bióticos y abióticos, para poder predecir de manera fiable los efectos del cambio climático sobre las comunidades y ecosistemas.

En los sistemas agrícolas manejados por control biológico de plagas, el cambio climático puede tener diversos efectos sobre los enemigos naturales. Estos efectos son complejos, pudiendo según el caso particular, ser positivos o negativos para el control biológico de plagas, e incluso ser difíciles de determinar. Por ejemplo, un caso en el que el control biológico podría verse favorecido por el cambio climático fue el estudiado por Coll & Hughes (2007). Los autores determinaron que en un ambiente de alto contenido en CO₂ las plantas de guisante contenían menos nitrógeno, por lo que las larvas de *Helicoverpa armigera* que se alimentaban de ellas presentaban un tamaño menor. Así, el depredador de estas larvas *Oechalia schellenbergii* resultó más efectivo al ser la presa más vulnerable debido a su menor tamaño. Sin embargo, en general, se espera que el incremento de las temperaturas repercuta negativamente en el control biológico de plagas. Por un lado, la mayoría de enemigos naturales involucrados son artrópodos, que al ser organismos ectotermos sin capacidad para regular su temperatura corporal, son altamente dependientes de, y susceptibles a, los cambios ambientales. En efecto, la temperatura ambiental es un importante factor que influye en la tasa de conversión del alimento en biomasa, ya que determina la cinética de las reacciones bioquímicas de la fisiología de los ectotermos (Sabelis 1985). Estos organismos, por tanto, dependen de las condiciones abióticas del entorno para el funcionamiento de su metabolismo, para su desarrollo, su capacidad de movimiento y su velocidad, su tasa de depredación, etc. En consecuencia, la intensidad con la que los individuos interaccionan entre los ellos puede verse modificada si varían las condiciones abióticas del entorno, lo que, dentro de un contexto de plagas y enemigos naturales interaccionando en un cultivo, podría acabar perjudicando el control biológico (Montserrat et al 2013a). Por otro lado, el incremento de las temperaturas puede generar pasillos climáticos que favorezcan la llegada de nuevas especies plaga exóticas (IPCC 2007).

Otro factor abiótico que puede influir en el control biológico de las plagas es la disponibilidad de agua y la humedad relativa del ambiente (Stireman et al. 2005). Por

ejemplo, las condiciones cálidas y secas que se dieron en mayo del año 1993 en Eslovaquia determinaron que el parasitoide *Trichogramma* no fuera capaz de parasitar ningún huevo de *Ostrinia nubilalis*, el taladro del maíz (Cagan et al. 1998). Otro ejemplo lo encontramos en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral, donde se analizó el efecto de las condiciones abióticas (altas temperaturas y bajas humedades relativas) en el control biológico de *O. persea* en aguacate.

i.2. Control biológico de plagas:

El control biológico puede definirse como el uso que realiza el hombre de un organismo para reducir la densidad de población de otro organismo (Bale et al. 2008). En el control biológico de artrópodos se utilizan parasitoides, patógenos y depredadores (i.e, enemigos naturales) para regular la población de una especie plaga (DeBach 1964). Hablamos de regular y no de erradicar, ya que en sistemas con control biológico la plaga y sus enemigos naturales conviven, pero a una densidad de población de plaga por debajo del umbral de daño del cultivo (Bale et al. 2008). Al aumentar las poblaciones de los niveles tróficos superiores (parasitoides, depredadores) disminuyen consecuentemente las poblaciones de herbívoros, lo que provoca una cascada trófica que resulta en el aumento de la densidad del productor primario, el cultivo. Este es el mecanismo de regulación de las poblaciones de herbívoros conocido como “desde arriba hacia abajo” (*top-down control*) (Hairston et al. 1960, Oksanen et al. 1981), y que se da tanto en sistemas naturales como agrícolas.

Existen diversos tipos de control biológico, aunque en la literatura existe cierta variabilidad en la categorización de los tipos (Van Driesche et al. 2007, Bale et al. 2008, Jacas & Urbaneja 2008). En esta tesis se han reordenado los tipos de control biológico definidos en la literatura en base a los siguientes criterios: En función de la *procedencia* de los enemigos naturales podemos definir el control biológico clásico y el neoclásico. En el clásico una plaga de origen exótico es controlada mediante enemigos naturales también exóticos, procedentes del lugar de origen de la plaga. En el neoclásico, la plaga exótica es controlada por los enemigos naturales autóctonos del lugar donde la nueva plaga se ha introducido; Dependiendo de la *manera de aumentar* los enemigos naturales en el cultivo se diferencian el control biológico de conservación y el control biológico augmentativo. El de conservación se basa en mecanismos de manejo del hábitat que mejoren la abundancia o actividad de los enemigos naturales autóctonos. Estos

mecanismos consisten, por ejemplo, en proporcionar a los enemigos naturales recursos como alimento alternativo o refugio frente a condiciones adversas (Landis et al. 2000). En el aumentativo, los enemigos naturales (sean autóctonos o exóticos) son liberados en masa en los cultivos, siendo necesario que los agentes de control biológico estén disponibles comercialmente. Según la *manera de liberar* los enemigos naturales, el control biológico aumentativo se puede dividir a su vez en inoculativo, si los enemigos se introducen periódicamente, una o más veces al año, con la finalidad de que sean sus descendientes los que controlen la plaga; y en inundativo, con introducciones masivas de enemigos naturales que actúen rápidamente, sin necesidad de esperar nuevas generaciones.

En base a la ventaja de la omnivoría de algunas especies de enemigos naturales, hoy en día una estrategia de control biológico de conservación en auge consiste en suministrar alimento alternativo, i.e. un alimento distinto a la presa con el que el depredador sea capaz de desarrollarse y reproducirse. Esta estrategia tiene dos objetivos, por un lado mantener las poblaciones de depredadores en períodos de escasez de plagas y por otro, promover la abundancia de los depredadores y el control biológico a través de la competencia aparente que se genera entre la plaga y el alimento alternativo (Montserrat et al. 2013b). En la competencia aparente (Holt 1977) la presencia de una especie (el alimento alternativo) provoca una disminución de la abundancia de la otra especie (la plaga, en este contexto) al aumentarse las poblaciones del depredador que comparten. De esta forma aunque la depredación *per capita* en la plaga sea menor, la depredación total en la plaga aumenta debido a este aumento en el número total de individuos en la población de depredadores. El alimento alternativo puede ser desde otra presa animal hasta sustancias de origen vegetal (Overmeer 1985) como polen, néctar, melaza o frutos.

Existen ejemplos del uso de polen como alimento alternativo como estrategia para aumentar las poblaciones de ácaros fitoseidos omnívoros en épocas en las que la plaga es escasa o está ausente (Addison 2000, Nomikou et al. 2002, González-Fernández et al 2009, Pozzebon et al. 2009, Maoz et al. 2011, Montserrat et al. 2013b). El suplemento de polen puede realizarse a través de la aplicación directa en el cultivo mediante la pulverización de polen comercial disuelto en agua (Montserrat et al. 2013b), mediante aplicadores electrostáticos (Maoz et al. 2011) o bien mediante el suministro natural de polen ofrecido por algunas especies presentes en la cubierta vegetal de cultivos, por ejemplo de cítricos (Aguilar-Fenollosa et al. 2011), u ofrecido por plantas intercaladas

en cultivos, por ejemplo plantas de maíz (González-Fernández et al. 2009) u otras gramíneas (Maoz et al. 2011), en cultivos de aguacate.

i.3. Área de estudio

El área en la cual se centraron los estudios detallados en esta tesis doctoral se localiza en el sureste español, concretamente en la provincia de Málaga, en los municipios de Vélez-Málaga y Algarrobo, región que junto a otros 29 municipios recibe el nombre de Axarquía (derivado de la palabra árabe *šarqiyyah* que significa "región oriental"). Debido a su climatología y a la propicia calidad de su suelo, en esta zona se dan las características necesarias para la obtención de una notable producción agrícola. En la Axarquía hay 7.311 Ha de cultivos herbáceos de huerta e invernadero, principalmente tomate, pepino, melón y pimiento. La mayor extensión, con 37.226 Ha, corresponde a cultivos leñosos como cítricos, olivo, vid, almendro y especies subtropicales como mango, aguacate, chirimoyo y papaya, entre otros (Fundación MADECA 2013).

i.3.1. El cambio climático en el área de estudio.

El impacto del cambio climático será diferente de unas regiones a otras. En el sur de Europa, uno de los impactos regionales proyectados es el empeoramiento de las condiciones ambientales hacia un aumento de las temperaturas y una disminución de las precipitaciones, con riesgos elevados de sequía (IPCC 2007).

En el área de nuestro estudio se analizó la existencia de una posible tendencia al incremento de las temperaturas utilizando datos mensuales de temperatura (máxima, mínima y media) recogidos desde 1980 a 2008 en la estación climática de la Estación Experimental La Mayora (Montserrat et al. 2013a). Los resultados sugirieron que, en efecto, en la zona de estudio existe una tendencia al incremento de las temperaturas medias de verano y primavera (Fig. i.3), en concordancia a las predicciones del IPCC, tendencia que según estas predicciones continuará en el futuro.

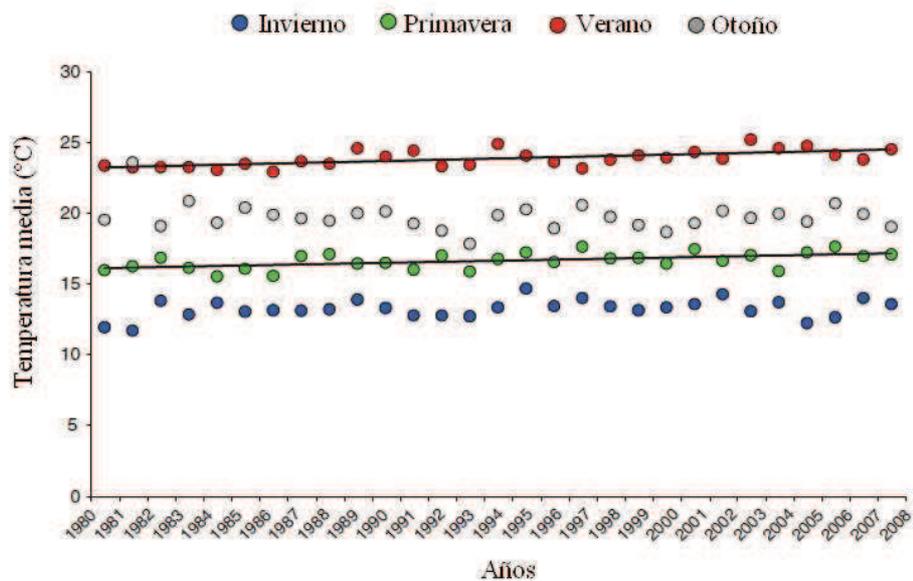


Figura i.3. Temperaturas medias estacionales (invierno = diciembre+enero+febrero; primavera = marzo+abril+mayo; verano = junio+julio+agosto; otoño = septiembre+octubre+noviembre) desde 1980 a 2008. En negro se representa la regresión lineal (solo las significativas) llevada a cabo con los datos de temperatura como variable dependiente y el tiempo como variable independiente. Figura modificada a partir de Montserrat et al. 2013a.

i.4. El agro-ecosistema del aguacate

i.4.1. El cultivo

El aguacate (*Persea americana* Mill., Lauraceae) es una especie leñosa originaria de América Central que fue introducida en España durante el siglo XVI (González-Fernández et al. 2009). La primera referencia bibliográfica que cita la presencia del aguacate en Málaga data de 1789, en forma de árboles dispersos por la costa en jardines domésticos y huertos familiares. Sin embargo no es hasta el año 1955 cuando aparecen las referencias al aguacate como cultivo. Estas primeras plantaciones se realizaron en la localidad granadina de Almuñécar, en la finca Rancho California, promovidas por Roger Magdahl y Luis Sarasola, quienes poseían amplios conocimientos del cultivo en otras zonas del mundo como Chile o Israel, y tuvieron la idea de llevar a cabo plantaciones de aguacate en la zona costera de Málaga y Granada, al comprobar el óptimo desarrollo de los árboles dispersos ya existentes (Díaz Robledo 1997). Actualmente España es el primer productor europeo de aguacate y el quinto a nivel mundial. Esta producción, de gran importancia económica, se da principalmente en las zonas costeras de Málaga (67%) y Granada (29%), con una media de 9.132 Ha cultivadas entre 2007 y 2010, lo que convierte a la costa andaluza en el único lugar de la

Europa continental con una producción comercial significativa de aguacate. En la campaña 2011/2012 se obtuvieron un total de 70.188 toneladas de las cuales se exportaron 45.547 toneladas (Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía 2009, 2012, 2013). Estos cultivos de aguacate (Fig. i.4) se diferencian de otros cultivos que abastecen a los mercados europeos por su buena situación fitosanitaria. González-Fernández et al. (2009) plantearon que una de las posibles razones por la cual este cultivo se ha mantenido libre de plagas comunes a otros frutales del sureste español podría ser porque las hojas, semillas, raíces (Armstrong 1964) y frutos (Platt-Aloia et al. 1983) contienen idioblastos (Fig. i.5, de Platt & Thompson, 1992), unas células especializadas que acumulan alcaloides y terpenos con actividad insecticida e inhibitoria del crecimiento (Rodríguez-Saoana et al. 1997, 1998, 2000).



Figura i.4. Parcela experimental de aguacate de la variedad Hass, situada en la Estación Experimental La Mayora, Algarrobo-Costa, Málaga.

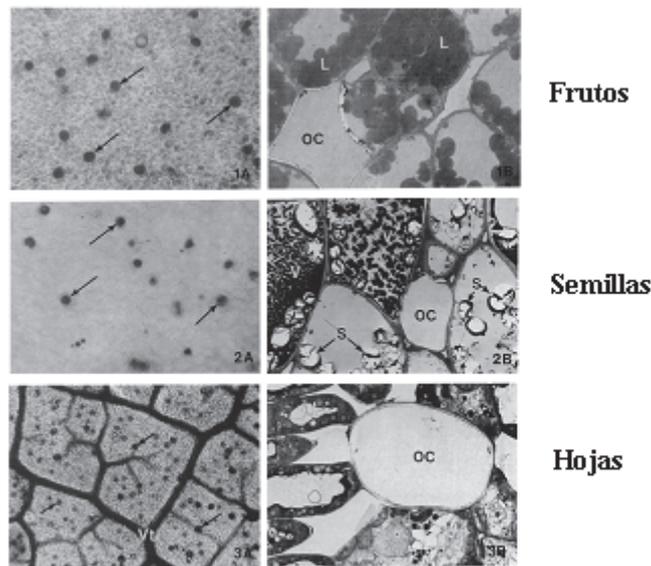


Figura i.5. Idioblastos (señalados con flechas en las fotografías de la izquierda, y con OC “oil cell” en las de la derecha), células especializadas que acumulan alcaloides y terpenos en los frutos, semillas, hojas y raíces del aguacate. Foto obtenida de Platt & Thompson, 1992.

i.4.2. La plaga

En el año 2004 se detectó por primera vez en la región productora de aguacate del sur de España la presencia del ácaro cristalino, *Oligonychus perseae* (Tuttle, Baker & Abbatiello) (Vela et al. 2007), una especie plaga muy especializada en aguacate. El aguacate y el ácaro cristalino son originarios de Mesoamérica y es posible que compartan una larga relación coevolutiva, lo que podría explicar que los mecanismos de defensa constitutivos del aguacate no afecten al herbívoro. *Oligonychus perseae* construye nidos de tela semi-circulares en el envés de las hojas, principalmente a lo largo de los nervios (Aponte & McMurtry 1997) (Fig. i.6b), dentro de los cuales las hembras ovipositan y se desarrollan los estadios juveniles (Fig. i.6c). Los individuos salen de los nidos para reforzar sus paredes, para construir nuevos nidos, o para defecar, actividad que nunca llevan a cabo en el interior (Saito 1985), por lo que existe un constante tráfico de individuos desde dentro hacia fuera de los nidos, y viceversa. Estos ácaros se alimentan en una etapa inicial succionando el contenido de las células de la epidermis inferior y del tejido parenquimático exterior, y en etapas posteriores el daño puede extenderse de forma generalizada hacia las células del mesófilo e incluso del parénquima en empalizada. Dicho daño provoca manchas necróticas circulares que

pueden ocupar hasta el 90% del área foliar (Aponte & McMurtry 1997), disminuyendo la eficiencia fotosintética del árbol y afectando consecuentemente la producción de frutos. En cuanto a su biología, *O. perseae* presenta 5 etapas de desarrollo: huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto. Cada hembra puede fundar entre 6 y 12 nidos en función de la temperatura, siendo más elevado el número medio de nidos construidos a 20°C, en comparación con los construidos a 30°C, 25°C y 15°C. En cada nido las hembras son capaces de ovipositar hasta 15 huevos, número que desciende al aumentar la temperatura (Aponte & McMurtry, 1997).

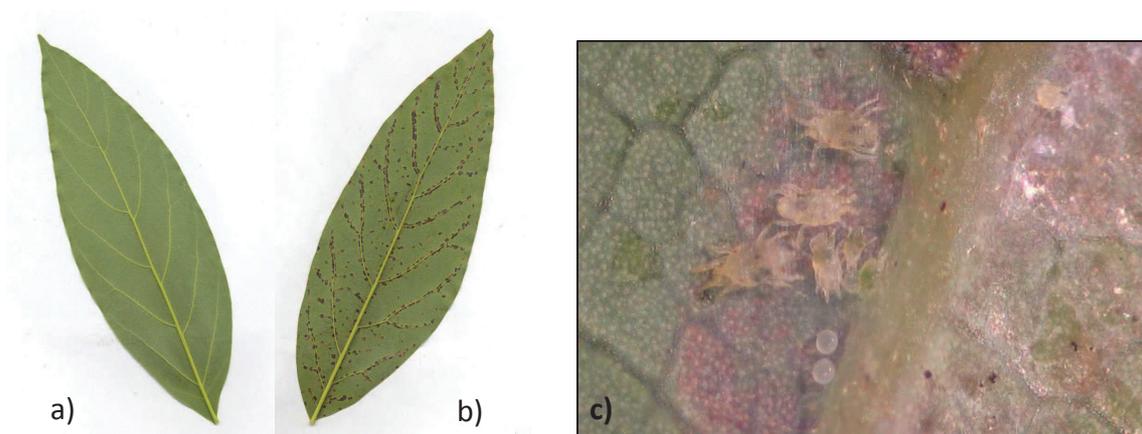


Figura i.6. Hoja de aguacate sana (a). Hoja afectada por ácaro cristalino (b). Nido de ácaro cristalino con hembras, juveniles y huevos (c).

i.4.3. Los enemigos naturales

En los cultivos de aguacate de nuestra zona de estudio y en los de otras zonas de la provincia de Málaga se han identificado varias especies de ácaros fitoseidos depredadores, miembros de la familia *Phytoseiidae* (J.R. Boyero, J.L Vela & E.M. Wong, datos sin publicar). Esta familia comenzó a estudiarse hace más de 30 años tras el descubrimiento de su importante papel regulador en las poblaciones de ácaros fitófagos, siendo en la actualidad piezas fundamentales en el control de plagas de numerosos cultivos en todo el mundo, especialmente en frutales y cultivos de invernadero (Ferragut & Escudero 1997). En el año 1986 esta familia incluía 1500 especies descritas. Sin embargo este número continúa en aumento por el descubrimiento de nuevas especies en África, Asia y América del Sur y Central, de forma que en el año 2004 se conocían 2250 especies (De Moraes et al. 2004).

Las especies de fitoseidos más abundantes que se han encontrado en asociación con el ácaro cristalino en nuestra zona de estudio son *Euseius stipulatus* (Athias-Henriot), *Euseius scutalis* (Athias-Henriot) y *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Fig. i.7 a., b. y c., respectivamente) (Consejería de Agricultura y Pesca 2006). *Euseius stipulatus* se encuentra en Algeria, Grecia, Turquía, Italia, España, antigua Yugoslavia (Bouras & Papadoulis 2005), Siria (Barbar 2013) y Hungría (Szabó et al. 2013). Es una especie omnívora que además de presa animal también se alimenta de polen de distintas especies de plantas (Ferragut & Escudero 1997, Bouras & Papadoulis 2005, González-Fernández et al. 2009). Esta especie no puede penetrar dentro de los nidos del ácaro cristalino y ataca a los individuos que merodean por fuera (Montserrat et al. 2008). *Euseius scutalis* ha sido encontrada en el norte de África (Marruecos y Algeria), en Oriente Medio (Líbano, Israel, Irán, Jordania, Egipto y Turquía), en el sur de España y en India (Bonfour & McMurty 1987, Satar et al. 2013). Esta especie es depredadora de ácaros tetraníquidos, tenuipálpidos (Bonfour & McMurty 1987) y huevos y juveniles de mosca blanca (Nomikou et al. 2001), y en el cultivo del aguacate, de los distintos estadios del ácaro cristalino que merodean por fuera de los nidos (Maoz et al. 2011). Al igual que su especie hermana *E. stipulatus*, *E. scutalis* también se alimenta de polen de diversas especies, con el que ambas especies obtienen su mayor potencial reproductivo (McMurty & Croft 1997). La capacidad de estas dos especies de explotar el polen como una fuente de alimento alternativo se considera una ventaja, ya que permite que sus poblaciones se mantengan a altas densidades en los cultivos en épocas en las que la plaga es escasa o está ausente (Overmeer 1985, Bouras & Papadoulis 2005, González-Fernández et al. 2009). La tercera especie de ácaro fitoseido, *Neoseiulus californicus*, es un depredador específico de ácaros tetraníquidos que usa el primer par de patas anteriores para rasgar la tela de seda de los nidos del ácaro cristalino y penetrar en su interior (Montserrat et al. 2008). A diferencia de las dos especies de *Euseius*, esta especie se halla disponible comercialmente para realizar tratamientos de control biológico mediante sueltas controladas.

Aunque las tres especies colonizan los agro-ecosistemas del aguacate su distribución en el espacio no es la misma (comunicación personal J.R. Boyero, J.M Vela & E.Wong, IFAPA Churriana, Málaga, 2009): *Euseius stipulatus* y *N. californicus* son las especies dominantes en cultivos de aguacate cercanos a la costa, donde las condiciones climáticas de verano son suaves, mientras que *E. scutalis* domina en los

cultivos de interior, donde las condiciones abióticas son más severas (altas temperaturas y bajas humedades relativas).

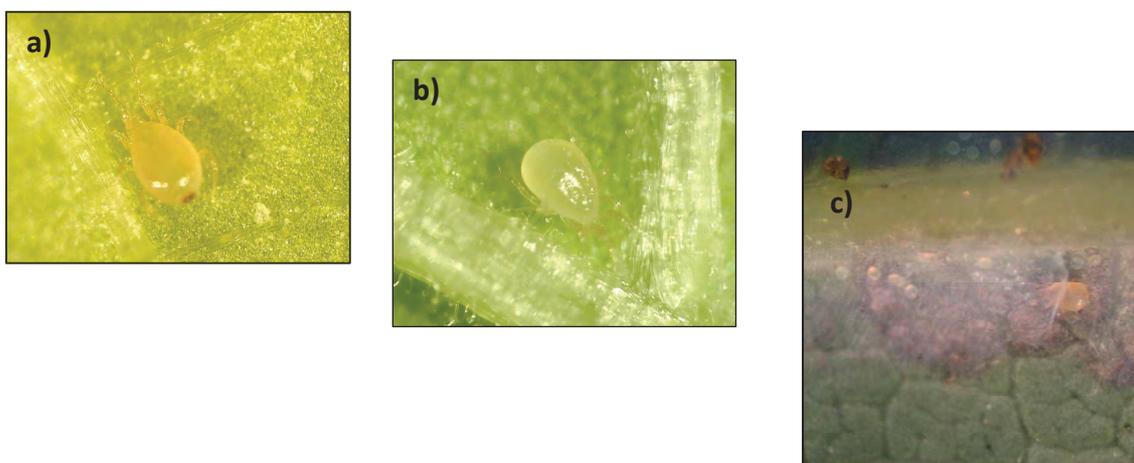


Figura i.7. *Euseius stipulatus* (a) y *E. scutalis* (b) merodeando por la hoja. *Neoseiulus californicus* (c) en el interior de un nido de *O. perseae*.

i.4.4. La dinámica de las poblaciones

La dinámica poblacional de las especies que componen el agro-ecosistema del aguacate fue estudiada durante la primavera y el verano de 4 años consecutivos (2006 al 2009) mediante recuentos quincenales en una parcela experimental con clima costero situada en la finca experimental La Mayora (Montserrat et al. 2013a)

Del seguimiento de las poblaciones se observó, por un lado, que la dinámica poblacional del ácaro cristalino *O. perseae* se caracteriza por ser monotónica (con un único máximo anual), con un crecimiento exponencial que comienza a principios de verano, seguido de un decrecimiento exponencial a finales de verano (Fig. i.8c). Por otro lado, la dinámica poblacional de los ácaros fitoseidos muestra dos máximos, uno en primavera, en ausencia de poblaciones significativas del ácaro cristalino, y otro en verano, cuando el ácaro cristalino es abundante. Los autores determinaron que la dinámica poblacional de los fitoseidos en primavera se correspondía con la abundancia de polen en la atmósfera (Fig. i.8b), siendo el de olivo, *Olea europea*, el más abundante (77% del total de mayo) (González-Fernández et al. 2009). La hipótesis que plantearon los autores fue que los fitoseidos respondían numéricamente a la abundancia de polen porque se estaban alimentando del que se depositaba sobre la superficie de las hojas de aguacate. La identificación de las especies de fitoseidos de las muestras recogidas durante los dos máximos poblacionales apoyó esta hipótesis, ya que el 81% de los

individuos del primer máximo poblacional eran *E. stipulatus*, la especie omnívora y polinófaga, y solo un 2% eran *N. californicus*, la especie depredadora (nótese que *E. scutalis*, debido a su distribución, no se halló presente en este muestreo de un cultivo costero). Además se llevaron a cabo experimentos de laboratorio que demostraron que *E. stipulatus* es capaz de reproducirse alimentándose exclusivamente de polen de olivo (González-Fernández et al. 2009). También se determinó experimentalmente que en la atmósfera del interior de los cultivos de aguacate hay polen de olivo en suspensión, y que sobre las hojas del aguacate se depositaba polen de varias especies anemófilas, entre ellas de olivo (González-Fernández et al. 2009)

Por otro lado, en verano, el segundo máximo poblacional de los fitoseidos se correlacionó con el máximo poblacional de *O. perseae* (Fig. i.8c), lo que indica que la población de enemigos naturales respondió numéricamente a la presencia del ácaro cristalino. La determinación de que la especie más abundante en verano fue *N. californicus* (50%) seguida de *E. stipulatus* (34%) (González-Fernández et al. 2009) apoya esta conclusión. Hay que destacar que esta segunda respuesta numérica de los fitoseidos en verano se observó en los años 2006 y 2007 (Fig. i.8c), pero no se dio en 2008 y 2009 (en la Fig. i.8c nótese en estos años la ausencia del segundo máximo de fitoseidos tras el máximo de *O. perseae*) debido a que las condiciones ambientales de ambos años fueron más severas que en años anteriores, presentando veranos de altas temperaturas y bajas humedades relativas (Fig. i.8a), que mermaron el crecimiento poblacional en los depredadores (Montserrat et al 2013a).

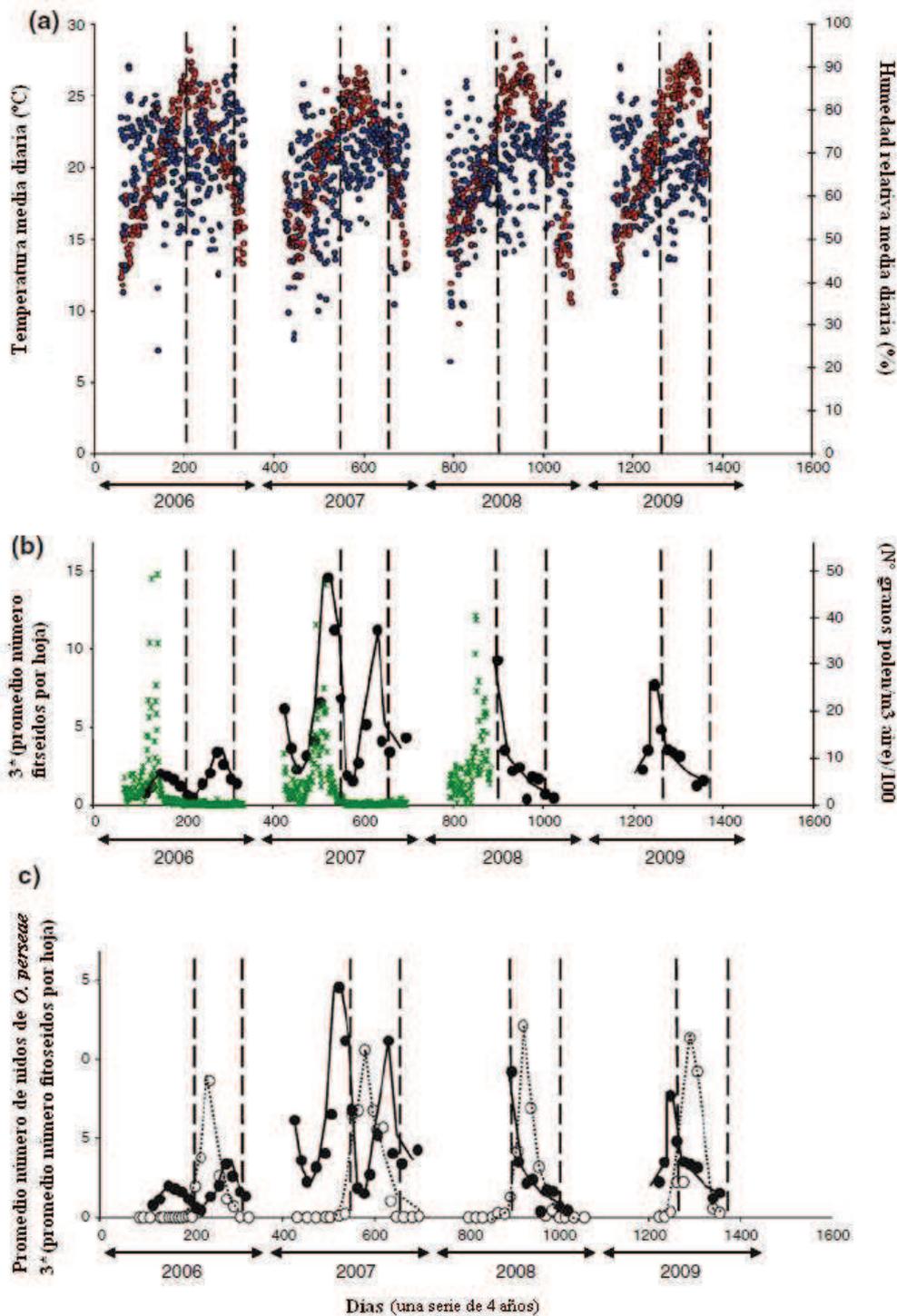


Figura i.8. a) Temperatura media diaria (puntos rojos) y HR diaria (puntos azules) registradas en primavera y verano durante 4 años (2006-2009). b) Dinámica poblacional de los ácaros fitoseidos (puntos negros) y granos de polen presentes en la atmósfera (cruces verdes) registrados durante la primavera y verano de 3 años consecutivos. c) Dinámica poblacional de los ácaros fitoseidos (puntos negros) y del ácaro cristalino *O. perseae* durante el mismo periodo que en a). Las líneas verticales delimitan los periodos en los que hay presencia de *O. perseae* en los árboles de aguacate. Nótese en a) los espacios en blanco dentro de la nube de puntos de los años 2008 y 2009 que denotan días de altas temperaturas y bajas humedades relativas, no presentes en 2006 y 2007. Figura modificada a partir de Montserrat et al. 2013a.

i.5. Objetivos:

Bajo un escenario de cambio climático como el actual es necesario mejorar la comprensión de cómo influyen las condiciones abióticas en las comunidades que nos rodean. Este conocimiento es fundamental cuando además hablamos de sistemas agrícolas cuya producción depende del buen funcionamiento de la comunidad que la habita. La comunidad del agro-ecosistema del aguacate, compuesta por un bajo número de especies, presenta esta relativa simplicidad como una ventaja para su utilización como modelo de estudio. En concreto nos centramos en las especies de ácaros fitoseidos depredadores *E. stipulatus* y *E. scutalis* y sus interacciones, por ser dos especies hermanas, muy similares en su biología y ecología, que explotan los mismos recursos, el ácaro cristalino y polen, y que se distribuyen en el área de estudio según un patrón de segregación espacial.

El objetivo general de esta tesis doctoral es el de profundizar en el conocimiento de cómo las condiciones abióticas afectan a los individuos y a las interacciones entre ellos, y cómo estos efectos se traducen a nivel poblacional y de comunidad. Este objetivo general se divide en varios sub-objetivos específicos, que son:

1. Determinar, con un ejemplo real, en qué medida las condiciones abióticas pueden influir en el éxito de las estrategias de control biológico de plagas. Este objetivo se aborda en el capítulo 1 de la presente tesis.

2. Determinar si las condiciones abióticas pueden influir en la estructura de las comunidades, a través de sus efectos en los individuos y en la intensidad de las interacciones entre ellos. Este objetivo se aborda en los capítulos 2, 3 y 4.

2.a. Evaluar el efecto de las condiciones abióticas a nivel de individuo, tanto sobre parámetros relacionados con su eficacia biológica (capítulo 2) como sobre la intensidad con la que los individuos de las dos especies de *Euseius* interactúan (capítulo 3).

2.b. Evaluar el efecto de las condiciones abióticas en las poblaciones: cómo se traducen los efectos a nivel de individuo en las poblaciones, i.e. cuando se incluye la interacción de competencia intra-específica (capítulo 4).

2.c. Evaluar el efecto de las condiciones abióticas en las comunidades: cómo se traducen los efectos a nivel de individuo en las comunidades, i.e. cuando, además de la competencia intra-específica, se incorpora la competencia inter-específica, o la depredación intragremial (capítulo 4).

3. Por último, añadido a los objetivos generales y específicos de la tesis, en el capítulo 5 se incluye un estudio cuyo objetivo general es la puesta a punto de un método molecular que permita demostrar de manera experimental que *E. stipulatus* se alimenta del polen de olivo que se deposita sobre las hojas de los árboles del agro-ecosistema del aguacate proveniente de los olivares que lo circundan.

Capítulo 1

Montserrat M., Guzman C., Sahun R. M., Belda J.E & Hormaza J.I (2013)
Pollen supply promotes, but high temperatures demote, predatory mite abundance in avocado orchards.
Agriculture Ecosystems & Environment 164: 155-161

1. El polen promueve, pero las altas temperaturas restringen, la abundancia de ácaros depredadores en cultivos de aguacate.

1.1 Introducción:

Existen diversos estudios que documentan cambios en la distribución de las especies en vertebrados, invertebrados y plantas que se han asociado con el calentamiento global (Letcher 2009). Sin embargo hay pocos estudios que hayan abordado los efectos del cambio climático en comunidades como las representadas en el control biológico de plagas (CBP). Escenarios en los que los organismos se verán cada vez más expuestos a altas temperaturas serán relevantes para el futuro del CBP, ya que la mayoría de los enemigos naturales utilizados como agentes de biocontrol son artrópodos, y por tanto muchos de los procesos relacionados con su supervivencia, reproducción y otros parámetros relacionados con su eficacia biológica dependen de las condiciones abióticas (Beveridge et al. 2010). Además la sensibilidad a la temperatura se intensifica al subir de nivel trófico (Voigt et al. 2003), un efecto amplificador “desde abajo hacia arriba” que suele darse en redes tróficas sometidas a algún tipo de perturbación (Cagnolo et al. 2002). Por lo tanto, si el calentamiento global tiene un efecto negativo en la eficacia, o en los parámetros del ciclo de vida de los enemigos naturales, las cascadas tróficas podrían amortiguarse, lo que perjudicaría el control biológico de las plagas. De hecho, estudios recientes han establecido una relación directa entre una detención en el control de poblaciones de herbívoros y las severas condiciones abióticas que se dieron en algunos agro-ecosistemas (Montserrat et al. 2013a, Stavrinides et al. 2010).

En las zonas costeras de Málaga y Granada (Andalucía, España) el aguacate (*Persea americana* Mill., *Lauraceae*) es el tercer cultivo no cítrico más abundante, tras el almendro y el olivo (MARM, 2011). El cultivo del aguacate en Andalucía permaneció libre de plagas hasta la llegada en 2004 del ácaro cristalino *Oligonychus perseae* (Tuttle, Baker & Abatiello) (*Acari:Tetranychidae*) (Vela et al. 2007). Todos los estadios de esta especie de tetraníquido habitan dentro de densos nidos de seda construidos en el envés de las hojas de aguacate, donde causan manchas necróticas derivadas de su alimentación. Los nidos protegen a los individuos del ataque de algunos de sus enemigos naturales y de las condiciones climáticas adversas (Montserrat et al. 2008). En estos cultivos de aguacate costeros se han encontrado dos especies de ácaros fitoseidos en asociación con el ácaro cristalino (González-Fernández et al. 2009):

Euseius stipulatus (Athias-Henriot), un ácaro omnívoro que ataca presas y además se alimenta de polen (Ferragut et al. 1987) y *Neoseiulus californicus* (McGregor), un ácaro especialista en tetraníquidos. Ambas especies depredan al ácaro cristalino (Montserrat et al. 2008, González-Fernández et al. 2009) y son buenos candidatos a tener en cuenta en estrategias de control biológico de *O. perseae*, aunque solo *N. californicus* se encuentra disponible comercialmente. Como ya se comentó en la introducción general de esta tesis, la dinámica poblacional de los ácaros fitoseidos del cultivo del aguacate en España muestra dos máximos, uno en primavera y otro en verano. En primavera, cuando las poblaciones de *O. perseae* son aún poco abundantes, las poblaciones de fitoseidos aumentan porque los individuos se alimentan del polen atmosférico (mayoritariamente de olivo) depositado en la superficie de las hojas de aguacate, mientras que en verano, las poblaciones de fitoseidos responden numéricamente a la abundancia del ácaro cristalino (González-Fernández et al. 2009, Montserrat et al. 2013a). En base a esta dinámica de la comunidad, se diseñó una estrategia de control de esta plaga que consistió en mantener disponible polen de maíz como alimento alternativo para *E. stipulatus* en el cultivo de aguacate, sembrando plantas de maíz en el interior de las parcelas (González-Fernández et al. 2009). Los resultados fueron alentadores, ya que aquellos árboles de aguacate más cercanos a la fuente de polen de maíz albergaron más ácaros fitoseidos y menos ácaros herbívoros (González-Fernández et al. 2009). Sin embargo las diferencias entre tratamientos no se mantuvieron en el tiempo porque las plantas de maíz dejaron de producir polen.

El objetivo de este estudio fue mejorar la actuación en campo de los dos ácaros depredadores, *E. stipulatus* y *N. californicus*, ambos enemigos naturales del ácaro cristalino *O. perseae*. En el caso de *E. stipulatus*, no disponible comercialmente, se pretendió aumentar de forma indirecta sus poblaciones prolongando la presencia de polen en el sistema a través de la aplicación de polen comercial sobre los árboles de aguacate a principios de verano. La mejora de la actuación de *N. californicus* se basó en sueltas controladas de este ácaro a mediados de verano, cuando las poblaciones de la plaga empiezan a aumentar. Nuestras expectativas fueron que la combinación de ambas especies de depredadores, sumado a la aplicación de alimento alternativo, intensificaría los efectos observados en trabajos previos (González-Fernández et al. 2009). Sin embargo, debido a resultados inesperados, también se intentó determinar si las condiciones abióticas de verano, muy cálidas y secas, podrían haber sido factores determinantes de la dinámica de la comunidad observada.

1.2 Material y Métodos

Las crías de *E. stipulatus* se iniciaron en 2007 a partir de aprox. 300 individuos recolectados en el área de estudio. Las unidades de cría (Fig. 1.1a) se mantuvieron en una cámara de condiciones controladas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ de temperatura, $65 \pm 5\%$ de humedad relativa y 16:8 h de luz:oscuridad. Consistieron en una esponja (30 x 20 x 5 cm) recubierta con algodón y con una lámina de plástico (27 x 17 cm) encima, que se colocó en el interior de una bandeja (8 l., 42.5 x 26 x 7.5 cm) con agua. Tres plantas de judía (*Phaseolus vulgaris*) de 6-10 hojas de edad se colocaron verticalmente con sus tallos en contacto con tres de las paredes de la esponja, las raíces en contacto con el agua de la bandeja y la parte aérea en contacto entre ellas formando una estructura tridimensional similar a una tienda, donde los ácaros podían desplazarse fácilmente de una planta a la otra. En algunas hojas se añadieron unas hebras de algodón que sirvieron como lugar de oviposición. Los ácaros fueron alimentados *ad libitum* dos veces por semana con polen de *Carpobrotus edulis* esparcido sobre las hojas mediante un pincel (Fig 1.1b). Cuando fue necesario, se realizaron nuevas arenas transfiriendo a las nuevas unidades de cría bien los algodones con huevos o directamente los adultos (150 individuos aprox.). El polen de *C. edulis* se obtuvo de los estambres de flores masculinas que fueron sometidos a un proceso de secado en estufa a 37°C durante 48h y posteriormente tamizados en dos tamices (de distinto diámetro de luz: el primero de 0.25 mm y el segundo de 0.075 mm) (para más detalles ver anexo I). Los individuos de *N. californicus* utilizados en los experimentos de campo fueron suministrados por Koppert Biological Systems, Holanda.

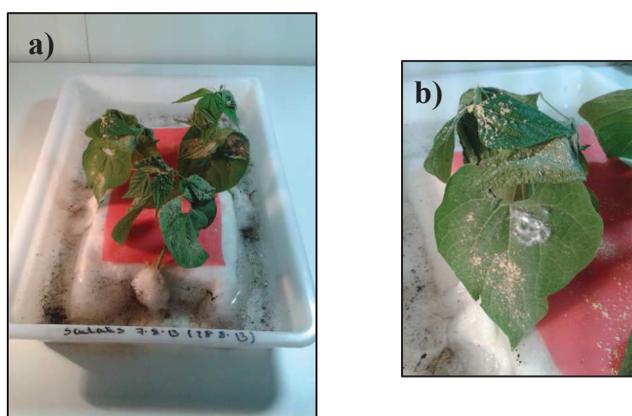


Figura 1.1. Cría de *E. stipulatus* (a) y detalle de hoja de judía (b) con polen de *C. edulis* y algodón.

1.2.1. Polen comercial como alimento alternativo

El objetivo de este experimento fue determinar si el polen comercial de abeja disuelto en agua es un alimento adecuado para el ácaro omnívoro *E. stipulatus*. Se eligió polen comercial de abeja por la facilidad con la que se consigue y por su bajo precio. Este polen se adquirió en un comercio local en forma de gránulos, y se determinó que estaba compuesto en un 60–80% por polen de especies del género *Cistus* (cistáceas). El resto pertenecía a polen de varias especies de boragináceas, rosáceas y fabáceas. Los experimentos se llevaron a cabo en cámara de condiciones controladas (600 l) a $25 \pm 1^\circ$ C, $65 \pm 5\%$ HR y 16:8 luz:oscuridad. Las arenas experimentales consistieron en discos de plástico (3.5 cm Ø) situados sobre una capa de algodón situada en el interior de recipientes de plástico con agua (100 ml, 6.7 cm alto, 5.1 cm de diámetro inferior, y 6.5 cm de diámetro superior). Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos:

- i) arenas con polen comercial de abeja (N = 12): Se disolvieron aprox. 40 gránulos de polen en 100 ml de agua y se colocó una gota de esta solución sobre cada arena.
- ii) Arenas con polen de maíz (N = 10) como control positivo, ya que en estudios previos de campo (González-Fernández et al. 2009) se vio una respuesta numérica de la población de fitoseidos a la presencia de polen de maíz, que derivó en un descenso de la abundancia de la plaga.
- iii) arenas sin alimento, como control negativo (N = 12).

En cada arena se situó una hembra grávida de *E. stipulatus* (10–15 días de edad) mediante un pincel. Tras 24, 48, y 78 h se contó el número de huevos depositados por cada hembra. Para asegurarnos que el resultado se debió solo a efectos del tratamiento, en los análisis solo se utilizó el promedio de huevos ovipositados durante el segundo y tercer día. El número de huevos/día se analizó mediante ANOVA de un factor, con tipo de polen como factor principal. La comparación de medias a posteriori se realizó con el test de Tukey HSD.

1.2.2. Aplicación de polen y suelta controlada de *N. californicus*:

Este experimento se diseñó para evaluar si la combinación de la aplicación de alimento alternativo a principio de verano con sueltas artificiales de *N. californicus* a mediados de verano resultaría en un mejor control del ácaro cristalino debido a un incremento en el número total de sus depredadores. Experimentos preliminares de laboratorio determinaron, por un lado, que se creaban fácilmente acúmulos de polen sobre las hojas

de aguacate tras la pulverización de 2 g/l de polen comercial disuelto en agua a una distancia de 1.5 m (Fig. 1.2). Por otro lado se observó que la mayoría de los granos de polen pulverizados no reventaron (Fig. 1.3.), por lo que el polen aplicado sería adecuado para el consumo por parte de los fitoseidos, los cuales perforan con su boca los granos de polen uno a uno, succionando su contenido (Flechtmann & McMurtry 1992).



Figura 1.2. Acúmulos de polen comercial sobre hoja de aguacate tras la pulverización de una solución de 2 g/l de polen disuelto en agua a una distancia de 1.5 m

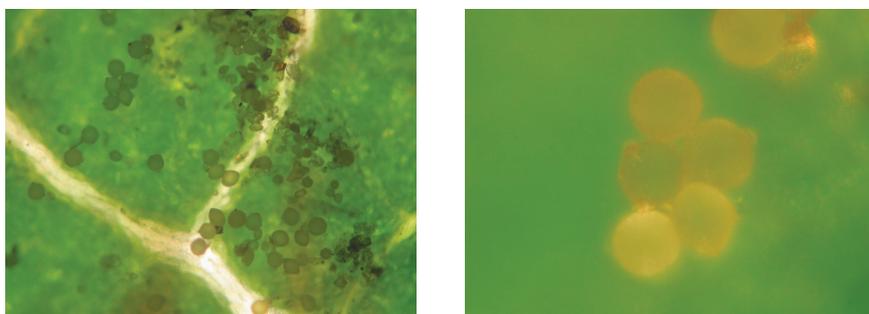


Figura 1.3 Granos de polen en la superficie de las hojas de aguacate tras su disolución y pulverización. Puede observarse que mantuvieron su forma, por lo que se encontraban en buen estado para la alimentación de los ácaros fitoseidos.

Los experimentos de campo se llevaron a cabo en una parcela de aguacate de la variedad Hass, de 2 ha de superficie y situada en el IHSM La Mayora (Málaga, España), durante dos años consecutivos (2009 y 2010) desde principios de junio a finales de septiembre. La parcela experimental se dividió en 5 bloques de este a oeste (Fig. 1.3).

Cada bloque contenía 5 grupos de tres árboles adyacentes, separados entre sí por otros árboles de aguacate. A cada grupo de tres árboles por bloque se le asignó de forma aleatoria uno de los siguientes tratamientos:

- a) Polen: Se aplicó por árbol una solución de 14 g de polen (del mismo lote descrito anteriormente) disuelto en 7 l. de agua mediante una carretilla de pulverizar provista de depósito de 100 l y de una bomba de pistón que se reguló a 20 kg de presión para realizar el tratamiento.
- (b) Agua: Se aplicaron 7 l de agua sobre cada árbol usando el mismo mecanismo que en el tratamiento (a), como control del tratamiento de aplicación de polen.
- (c) Suelta de *N. californicus*: Se liberaron un número determinado de individuos de *N. californicus* por árbol (ver más abajo).
- (d) Polen + *N. californicus*: Se pulverizó la misma cantidad de solución con polen que en (a) y además se liberó la misma cantidad de depredadores que en el tratamiento (c).
- (e) control: No se aplicó ningún tratamiento en los árboles.

Los muestreos de cada tratamiento se llevaron a cabo únicamente en el árbol situado en el centro de los tres de cada grupo (Fig. 1.4).

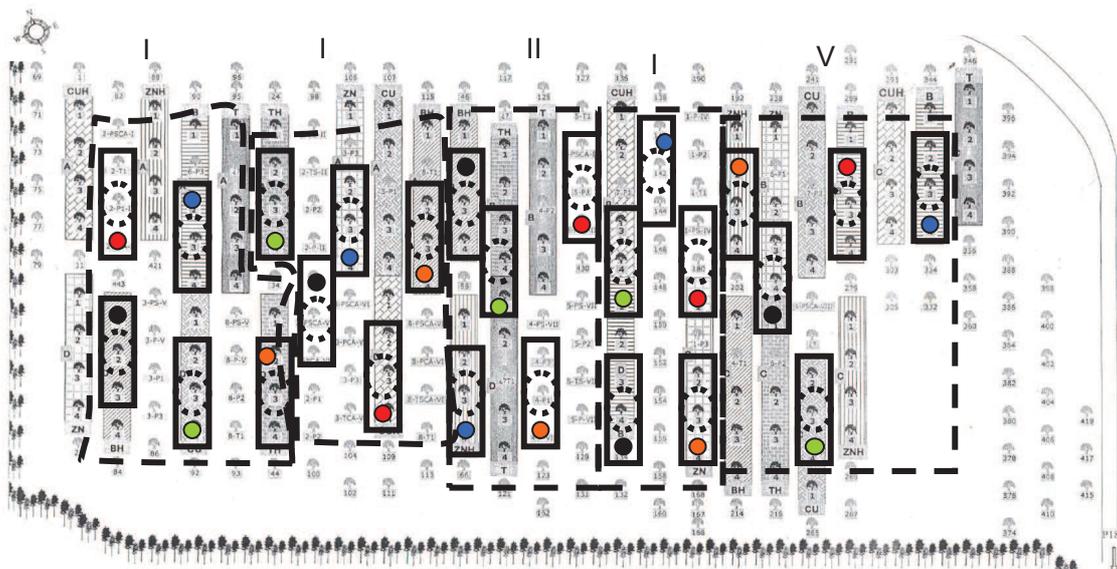


Figura 1.4. Mapa de la parcela P-20 de aguacates donde se llevaron a cabo los experimentos de campo detallados en este capítulo. Se diferencian los cinco bloques (I-V) con línea discontinua; en cada bloque se trataron cinco grupos de tres árboles (enmarcados en un rectángulo), cada grupo con un tratamiento diferente (a-e, ver texto arriba) y en cada grupo de árboles se muestreó únicamente el árbol central (círculo coloreado)

Antes del comienzo de los experimentos se determinó la abundancia de los ácaros fitoseidos y del ácaro cristalino en el mes de mayo, momento en el cual la cantidad de polen en el ambiente es máxima, para comprobar que la abundancia de fitoseidos era alta, y la de plaga era baja, como se esperaba. A finales de mayo de 2009 hubo un

promedio de 1.16 ± 0.08 fitoseidos/hoja y 0.048 ± 0.017 nidos de ácaro cristalino/hoja. En 2010 estos promedios fueron de 1.42 ± 0.99 y 0.336 ± 0.172 , respectivamente. Debido a que la abundancia de polen empieza a descender a finales de mayo, el primer tratamiento de aplicación de polen y su control se realizó en la primera semana de junio. Las aplicaciones posteriores de polen se llevaron a cabo en función de la abundancia de ácaros fitoseidos que se iba determinando en campo. Como regla general, los tratamientos con polen se aplicaron cuando la población de depredadores disminuyó de forma considerable entre dos fechas consecutivas de muestreo. En 2009 y 2010 se realizó otra aplicación de polen en junio y en 2010 se realizó además otra en julio. Los ácaros depredadores *N. californicus* se liberaron en campo en unas bolsitas de papel que contenían aprox. 250 individuos que se colgaron de las ramas de los árboles de aguacate. El momento de liberación se fue determinando en función de las densidades de *O. perseae* halladas en campo. En 2009 se liberaron aprox. 1000 individuos por árbol a finales de junio. Debido a que en 2009 los resultados no fueron buenos, en 2010 se decidió liberar un mayor número de individuos, llevándose a cabo dos sueltas, una de 1500 individuos en la primera semana de junio y otra de 3500 tres semanas más tarde.

En 10 hojas a 150 cm. de altura por árbol se contó el número de nidos ocupados de *O. perseae* en el margen superior del segundo nervio del envés de la hoja (UML2 de aquí en adelante) y el número de fitoseidos por hoja. Para tener en cuenta una posible variabilidad dentro de cada árbol las hojas se seleccionaron cubriendo todo el perímetro de la copa. El recuento se realizó *in situ* con una lupa (Ruper 8x) cada dos semanas, comenzando la primera semana de junio y finalizando la última de septiembre. Las dos especies de fitoseidos no se identificaron en cada muestreo porque *E. stipulatus* y *N. californicus* son morfológicamente muy similares y su identificación es solo posible a nivel microscópico. El promedio de nidos (presa de aquí en adelante) en el UML2 y el promedio de fitoseidos (depredadores de aquí en adelante) por hoja y árbol (N = 10 hojas, 25 árboles) se calculó en cada fecha de muestreo de cada año. El promedio acumulado de presa y depredadores por árbol y año se ajustó a una función de regresión no linear logística, definida como:

$$N_{(t)} = \frac{kN_0}{N_0 + (k - N_0)e^{-rt}}$$

donde $N(t)$ es el promedio acumulado de presa o de depredadores /hoja/árbol en cada tiempo t ; k se definió como el tamaño máximo de población acumulada/hoja/árbol tanto de presa como de depredador; r se definió como la tasa de “crecimiento acumulado” de cada población; t es el tiempo (días); y N_0 el número inicial de depredadores y de presa, fijado en 0,1 y 0,001 para los depredadores y la presa, respectivamente, porque los muestreos comenzaron a principios de junio, cuando los ácaros fitoseidos están presentes mientras que la abundancia del ácaro cristalino es negligible.

El punto de inflexión de la curva, i.e. el tiempo en el cual la tasa de crecimiento acumulado pasa de ser positiva a ser negativa, fue calculada como:

$$t_i = \frac{\ln(k - N_0 / N_0)}{r}$$

Se obtuvieron, por lo tanto, 5 valores estimados de k , r y t_i para la población de depredadores y la de presa por tratamiento (5 tratamientos) y año (2 años). El valor de k se usó como valor aproximado de la abundancia total de presa, o de los depredadores, a lo largo de la temporada. El valor de r se interpretó como la rapidez con la que las poblaciones alcanzaron su valor acumulativo máximo en cada temporada. El valor t_i se utilizó para estimar el tiempo en el que la contribución de los depredadores o de las presas al valor acumulado fue máxima (la contribución al valor acumulado cuando $t > t_i$ es menor que cuando $t < t_i$). Los valores obtenidos de k , r y t_i se analizaron con un MANOVA de tres factores, con año (2009 y 2010), especie (depredador o presa) y tratamiento (5 tratamientos) como variables explicativas. Cuando el MANOVA fue significativo, cada una de las variables dependientes fue analizada por separado mediante un ANOVA de tres factores, para determinar cual de ellas causaba el efecto.

1.2.3 Efectos bióticos y abióticos en la dinámica de las poblaciones:

Para determinar si las condiciones abióticas tuvieron un efecto en la dinámica poblacional de los depredadores y de la presa, primero se calculó, para cada árbol y año, la llamada “tasa de crecimiento del intervalo” $r_{i,t,t+\tau}$ de los depredadores y de la presa, usando la siguiente ecuación:

$$r_{i,t,t+\tau} = \frac{1}{\tau} \ln\left(\frac{N_{t+\tau}}{N_t}\right)$$

donde τ es la duración de cada intervalo (días), i.e. el número de días entre dos muestreos consecutivos, y N_t y $N_{t+\tau}$ son los tamaños de la población en el tiempo t y $t+\tau$, respectivamente. Posteriormente se calculó el promedio de la “tasa de crecimiento del intervalo”/árbol (N=25 árboles) para los depredadores y para la presa, para obtener así un único valor para ambos de $r_{t,t+\tau}$ por intervalo. Por otro lado se obtuvieron datos diarios del promedio de temperatura y humedad relativa de una estación agro-climática (situada a una altura de 2m del suelo) perteneciente a la Junta de Andalucía, y localizada cerca del área de estudio (a unos 15 km de distancia lineal). Para cada valor de $r_{t,t+\tau}$ se obtuvo un valor correspondiente de temperatura y de humedad relativa calculando el promedio de los valores diarios de temperatura y humedad relativa durante el intervalo.

La variación del promedio de la “tasa de crecimiento del intervalo” de los depredadores y de la presa durante el periodo de muestreo fue analizada mediante modelos de regresión no lineal (Proc NLR, SPSS Inc.). Las variables predictivas usadas en el análisis fueron (a) el promedio de la temperatura de cada intervalo ($T_{t,t+\tau}$) y (b) el promedio de la humedad relativa de cada intervalo ($RH_{t,t+\tau}$). En el modelo se incluyeron los términos del primer y segundo orden de las dos variables porque en general la temperatura y la humedad relativa tienen efectos no lineales en los parámetros del ciclo de vida de los artrópodos; (c) el promedio de la abundancia de presa por intervalo ($Presa_{t,t+\tau}$), para incluir posibles efectos causados por la depredación o por la competencia intra-específica en el análisis de la “tasa de crecimiento del intervalo” de los depredadores y de la presa, respectivamente (d) el promedio de la abundancia de depredadores por intervalo ($Depr_{t,t+\tau}$), para incluir posibles efectos causados por la depredación o por la competencia intra-específica en el análisis de la “tasa de crecimiento del intervalo” de la presa y los depredadores, respectivamente. Primero en los análisis solo se incluyeron los efectos bióticos, i.e. depredación y competencia intra-específica y su interacción, para averiguar cuanta variación en $r_{t,t+\tau}$ podían explicar. Segundo solo se incluyeron en los efectos abióticos, i.e. la temperatura, la humedad relativa y su interacción. Por último se analizaron modelos completos incluyendo efectos bióticos y abióticos. Todos los análisis de regresión se realizaron con el procedimiento *backwards stepwise*.

1.3. Resultados

1.3.1 Polen comercial como alimento alternativo

El número de huevos depositados por los ácaros depredadores fue diferente en función del tratamiento ($F_{2,31} = 25,63$; $P < 0,001$). El test de Tukey HSD reveló que la tasa de oviposición de los depredadores alimentados con polen comercial de abeja (0,96 huevos/día) no fue significativamente diferente de la de aquellos alimentados con polen de maíz (1,15 huevos/día) ($P = 0,58$). Ambos tratamientos sí fueron significativamente diferentes del control, donde no había alimento y las hembras no ovipositaron.

1.3.2. Aplicación de polen y suelta controlada de *N. californicus*:

El MANOVA solo fue significativo para los factores principales “año” y “especie” y su interacción (tabla 1.1). Cuando k , r , y t_i se analizaron por separado para determinar qué variable causaba el efecto, los resultados mostraron, por un lado, que el número máximo acumulado de depredadores y de presa al final de la temporada no varió entre tratamientos, aunque el número de presa fue mucho menor en 2010 que en 2009 (Tabla 1.2, resultados para k). Por otro lado, el análisis reveló que los depredadores alcanzaron su tamaño máximo de población acumulada mucho antes que la presa (Tabla 1.2, resultados para t_i), i.e. $40,02 \pm 1,57$ y $70,06 \pm 1,23$ días desde el comienzo del experimento, respectivamente. Por último los resultados revelaron que la tendencia de la “tasa de crecimiento acumulado” de los depredadores y de presa fue opuesta dependiendo del tratamiento (tabla 2, resultados para r , interacción “especie x tratamiento”). El análisis gráfico mostró que el valor de r fue más alto para los depredadores y más bajo para la presa en tratamientos en los que había polen en comparación con el resto de tratamientos (Fig. 1.5).

Tabla 1.1. Resultado del MANOVA de tres factores, con k (tamaño de población máximo acumulado), r (tasa de crecimiento acumulado de las poblaciones) y t_i (tiempo en el que se dio la máxima contribución al número acumulado) como variables dependientes, y año (2009 y 2010), especie (depredador o presa) y tratamiento (cinco tratamientos) como variables explicativas.

Factor	Wilks λ	F	g.l	P
Intercepto	0.0047	5546.81	3; 78	<0.0001
Año (1)	0.4747	28.79	3; 78	<0.0001
Especie (2)	0.1418	157.31	3; 78	<0.0001
Tratamiento (3)	0.8671	0.95	12; 206.676	n.s.
(1) x (2)	0.7538	8.49	3; 78	<0.0001
(1) x (3)	0.9218	0.54	12; 206.676	n.s.
(2) x (3)	0.8369	1.20	12; 206.676	n.s.
(1) x (2) x (3)	0.8975	0.72	12; 206.676	n.s.

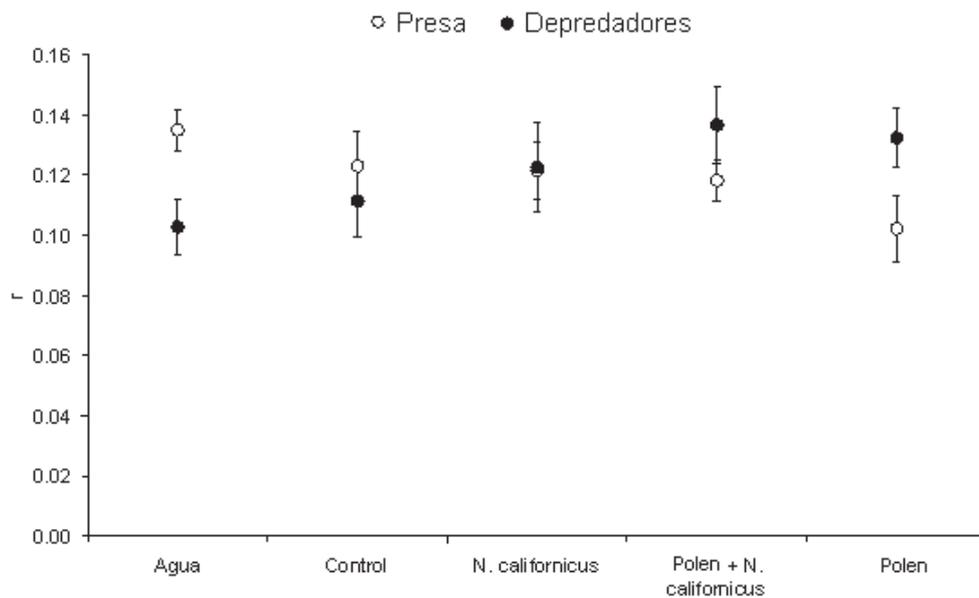


Figura 1.5. Tasa de crecimiento acumulada (r) de depredadores y presa en los distintos tratamientos

Tabla 1.2 Resultados de los tres ANOVA de tres factores, con k (tamaño de población máximo acumulado), r (tasa de crecimiento acumulado de las poblaciones) y t_i (tiempo en el que se dio la máxima contribución al número acumulado) como variables dependientes, y año (2009 y 2010), especie (depredador o presa) y tratamiento (cinco tratamientos) como variables explicativas.

Variable dependiente	R^2	F	P	g.l	Variables predictivas	F	P
k	0.691	9.407	<0.001	19;80	Intercepto	899.71	<0.001
					Año (1)	13.47	<0.001
					Especie (2)	133.88	<0.001
					Tratamiento (3)	0.83	n.s.
					(1) x (2)	26.09	<0.001
					(1) x (3)	0.32	n.s.
					(2) x (3)	0.09	n.s.
					(1) x (2) x (3)	0.08	n.s.
r	0.691	9.407	<0.001	19;80	Intercepto	1471.97	<0.001
					Año (1)	15.87	<0.001
					Especie (2)	0.04	n.s.
					Tratamiento (3)	0.38	n.s.
					(1) x (2)	0.28	n.s.
					(1) x (3)	0.70	n.s.
					(2) x (3)	3.06	0.021
					(1) x (2) x (3)	1.44	n.s.
t_i	0.691	9.407	<0.001	19;80	Intercepto	3377.62	<0.001
					Año (1)	5.30	0.024
					Especie (2)	159.96	<0.001
					Tratamiento (3)	1.24	
					(1) x (2)	0.003	
					(1) x (3)	0.95	
					(2) x (3)	0.89	
					(1) x (2) x (3)	0.39	

1.3.3 Efectos bióticos y abióticos en la dinámica poblacional:

Cuando solo se incluyeron los efectos bióticos en los análisis de regresión, solo la abundancia de presa explicó de manera significativa la variación en el promedio de la “tasa de crecimiento del intervalo” tanto en depredadores como en la presa (Tablas 1.3 y 1.4). El signo del parámetro indicó que la competencia intra-específica tuvo un efecto negativo en la tasa de crecimiento de la presa.

Cuando en el análisis se incluyeron solo los efectos abióticos, y cuando se realizó el análisis completo con todos los efectos, únicamente el primer y segundo orden de la temperatura explicaron de forma significativa la variación en el promedio de la tasa de crecimiento del intervalo, tanto en depredadores como en la presa (Tablas 1.3 y 1.4). Al resolver las ecuaciones de los análisis de regresión se obtuvo que en los depredadores la tasa de crecimiento del intervalo del depredador sería negativa cuando la temperatura del intervalo sea superior a 24.7°C , mientras que para la presa esta temperatura debería ser mayor a 25.6°C . En la figura 1.6 se aprecia que cuando el promedio de la temperatura del intervalo estaba por debajo de dichos valores, i.e. durante la primera mitad del verano, los ácaros fitoseidos fueron abundantes y la población de ácaro cristalino aumentó. Sin embargo, cuando el promedio de la temperatura del intervalo se situó por encima de sus respectivos valores críticos, las poblaciones de los depredadores y las de la presa comenzaron a disminuir de forma drástica.

Tabla 1.3. Resultado de los modelos de regresión no lineal de los efectos bióticos y/o abióticos en la variación del promedio de la tasa de crecimiento del intervalo de la presa. Primero solo se incluyeron en los análisis las variables bióticas y sus interacciones; segundo solo se incluyeron las variables abióticas y sus interacciones; y por último se analizó el modelo completo incluyendo variables bióticas y abióticas. Todos los análisis de regresión se hicieron con el método *backwards stepwise*.

Modelo	R ²	F	P	g.l	Variables predictivas	Parámetros estimados	F/t	P
Solo efectos bióticos	0,420	6,148	0,0098	2;17	Intercepto	0.039	2.548	0.021
					Presa $t,t+\tau$ (1)	-0.087	-2.449	0.025
					Depredadores $t,t+\tau$ (2)	No incluido		
					(1) x (2)	0.070	2.173	0.044
Solo efectos abióticos	0,441	6,696	0,0072	2;17	Intercepto	-2.368	-2.142	0.047
					$T_{t,t+\tau}$	0.223	2.307	0.034
					$T_{t,t+\tau}^2$	-0.0051	-2.443	0.026
					$RH_{t,t+\tau}$	No incluido		
					$RH_{t,t+\tau}^2$	No incluido		
					$T_{t,t+\tau} \times RH_{t,t+\tau}$	No incluido		
Efectos modelo completo	0,441	6,696	0,0072	2;17	Intercept	-2.368	-2.142	0.047
					$T_{t,t+\tau}$	0.223	2.307	0.034
					$T_{t,t+\tau}^2$	-0.0051	-2.443	0.026
					$RH_{t,t+\tau}$	No incluido		
					$RH_{t,t+\tau}^2$	No incluido		
					$T_{t,t+\tau} \times RH_{t,t+\tau}$	No incluido		
					Presa $t,t+\tau$ (1)	No incluido		
					Depredadores $t,t+\tau$ (2)	No incluido		
(1) x (2)	No incluido							

Tabla 1.4. Resultado de los modelos de regresión no lineal de los efectos bióticos y/o abióticos en la variación del promedio de la tasa de crecimiento del intervalo del **depredador**. Primero solo se incluyeron en los análisis las variables bióticas y sus interacciones; segundo solo se incluyeron las variables abióticas y sus interacciones; y por último se analizó el modelo completo incluyendo variables bióticas y abióticas. Todos los análisis de regresión se hicieron con el método *backwards stepwise*.

Modelo	R ²	F	P	g.l	Variables predictivas	Parámetros estimados	F/t	P
Solo efectos bióticos	0,255	6,152	0,023	1;18	Intercepto	0,039	2,548	0,021
					Presas _{t,t+τ} (1)	-0,0057	-2,480	0,023
					Depredadores _{t,t+τ} (2)	No incluido		
					(1) x (2)	No incluido		
Solo efectos abióticos	0,576	11,548	0,0007	2;17	Intercepto	-1.040	-1,932	0,070
					T _{t,t+τ}	0.1014	2,153	0,046
					T _{t,t+τ} ²	-0.0024	-2,361	0,030
					RH _{t,t+τ}	No incluido		
					RH _{t,t+τ} ²	No incluido		
					T _{t,t+τ} x RH _{t,t+τ}	No incluido		
					Intercept	-1.040	-1,932	0,070
Efectos modelo completo	0,576	11,548	0,0007	2;17	T _{t,t+τ}	0.1014	2,153	0,046
					T _{t,t+τ} ²	-0.0024	-2,361	0,030
					RH _{t,t+τ}	No incluido		
					RH _{t,t+τ} ²	No incluido		
					T _{t,t+τ} x RH _{t,t+τ}	No incluido		
					Presas _{t,t+τ} (1)	No incluido		
					Depredadores _{t,t+τ} (2)	No incluido		
(1) x (2)	No incluido							

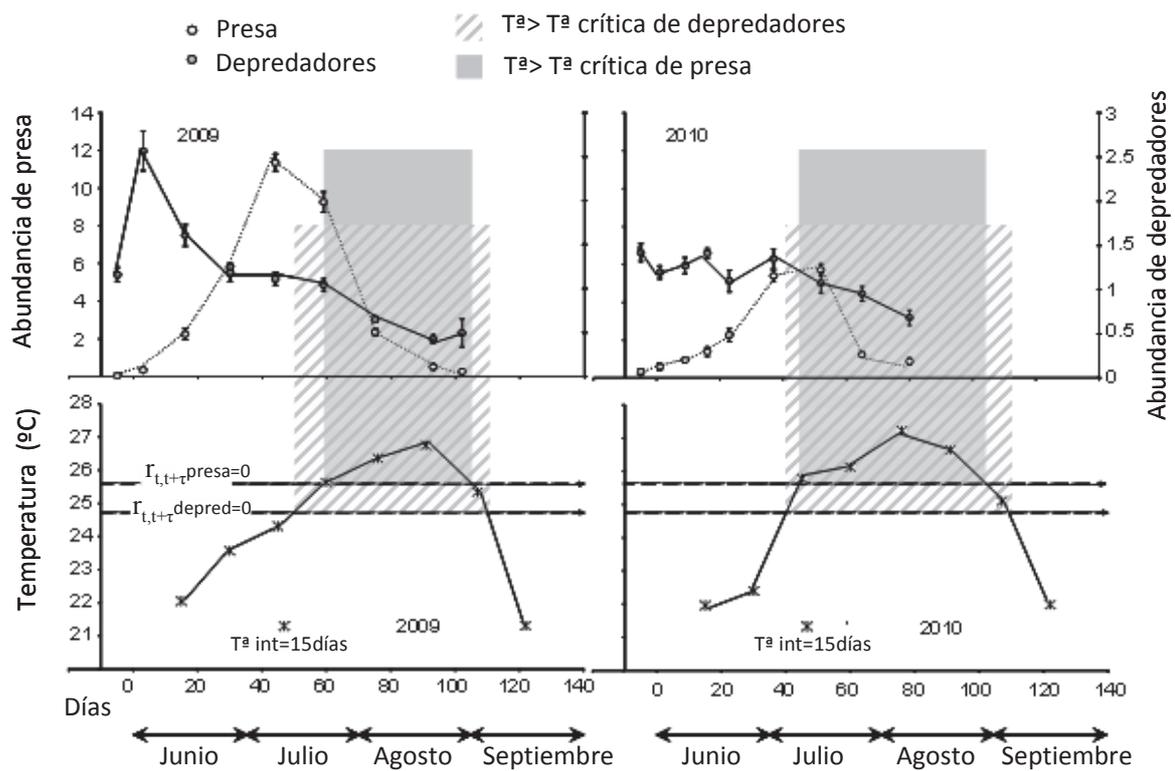


Figura 1.6 Dinámica de las poblaciones de los depredadores y de la presa (paneles superiores - ver leyenda) durante 2009 (izquierda) y 2010 (derecha). En los paneles inferiores se representan el promedio de las temperaturas de cada intervalo, para los mismos periodos. Las líneas horizontales de las gráficas inferiores representan los valores críticos de temperatura (i.e. los valores a partir de los cuales la tasa de crecimiento de población se espera que sea negativa), estimados a partir de las regresiones no lineares. Las áreas sombreadas de las gráficas superiores representan los periodos de tiempo en los que la temperatura promedio de intervalo fue superior a los valores críticos para los depredadores y la presa (leyenda)

1.4 Discusión

1.4.1 El polen promoviendo la abundancia de los depredadores

Nuestros resultados sugieren que los ácaros depredadores respondieron numéricamente a la aplicación de polen en los árboles. Esta respuesta se detectó a través de un crecimiento acumulado de depredadores más rápido en aquellos árboles en los que se había suministrado polen (Fig. 1.5), lo que indica que en estos árboles la contribución al número acumulado en el tiempo t del número de depredadores del tiempo $t+1$ fue mayor en árboles en los que se aplicó polen que en aquellos donde no se aplicó polen. Nuestros resultados también sugieren que esa respuesta numérica de los depredadores tiene un efecto opuesto en la tasa de crecimiento de las poblaciones del ácaro cristalino (Fig. 1.5).

El uso de alimento alternativo para mejorar el control de plagas tiene varios objetivos: por un lado, suministrar alimento a los depredadores para promover la persistencia de los enemigos naturales en el campo cuando las poblaciones de la plaga son bajas. El aumento de la persistencia de los depredadores debida a la presencia de alimento alternativo cuando la presa no es abundante ha sido estudiada en ácaros depredadores (Nomikou et al. 2002, Pozzebon et al. 2009), insectos depredadores como chinches o escarabajos (Sánchez et al. 2003, Berkvens et al. 2008, Lucas et al. 2009, Frank et al. 2011), parasitoides (Vollhardt et al. 2010) y arañas (Kuusk & Ekblom 2010). Por otro lado, la coexistencia entre el alimento alternativo y la plaga puede favorecer la abundancia de depredadores y el control de ésta a través de la competencia aparente (Holt 1977), lo cual se ha observado en varios estudios (González-Fernández et al. 2009, Messelink et al. 2010, Nomikou et al. 2010, Aguilar-Fenollosa et al. 2011, Maoz et al. 2011). Sin embargo también se ha encontrado que la presencia de alimento o presa alternativa no causa ningún efecto (Brown & Mathews 2008) o causa un efecto negativo (Musser & Shelton 2003, Desneux & O'Neil 2008, Spellman et al. 2006) sobre el control biológico de plagas. Además, cuando los enemigos naturales pueden potencialmente verse involucrados en interacciones tróficas, como la depredación intragremial o el canibalismo, la presencia de alimento alternativo puede reducirlas.

En nuestro sistema, el efecto numérico de la presencia de polen sobre los depredadores se dio solamente durante la primera mitad de verano y no se tradujo en un incremento de la abundancia total de la población de depredadores, ni en un mejor control del ácaro cristalino. De hecho, el número máximo acumulado tanto de

depredadores como de presa al final de la temporada no presentó diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los dos años (ver Tabla 1.2, resultados para k). Además, la contribución máxima de la abundancia de depredadores al número acumulado ocurrió mucho antes que la de la presa ($t_i = 40,02 \pm 1,57$ y $70,06 \pm 1,23$ días desde el principio del experimento, respectivamente) indicando que la población de depredadores no aumentó cuando la presa estuvo presente, i.e. durante la segunda mitad del verano. Este resultado contradice observaciones previas en las que los depredadores respondieron numéricamente a la abundancia del ácaro cristalino (González-Fernández et al. 2009), lo que sugiere que en los años 2009 y 2010 es probable que la dinámica de la comunidad depredador-presa estuviera regida por factores, diferentes a la presencia de alimento alternativo y la abundancia de presa.

1.4.2. El clima restringiendo la abundancia de depredadores

El análisis del efecto de las condiciones abióticas sobre la tasa de crecimiento de las poblaciones de depredadores y de la presa sugiere que las altas temperaturas durante la segunda mitad del verano fueron fundamentales para la dinámica de ambas poblaciones. Los términos de primer y segundo orden de la temperatura fueron los únicos parámetros que explicaron de forma significativa la variabilidad en la tasa de crecimiento de depredadores y de la presa. Las regresiones no lineales nos permitieron estimar el promedio de la temperatura del intervalo a partir de la cual la tasa de crecimiento de depredadores y presa sería negativa. Estos valores fueron $24.^\circ\text{C}$ y 25.6°C para depredadores y presa, respectivamente. A pesar de que los análisis de regresión no-lineal nos indicaron que las condiciones abióticas fueron factores primordiales en la dinámica de la comunidad en los dos años de este estudio, estos valores de temperatura críticos deben tomarse con cautela, ya que sólo tienen sentido como una herramienta descriptiva, y no tienen poder predictivo. Esto es debido al carácter arbitrario de los datos que se analizaron. Por un lado, los valores de la temperatura y la humedad relativa que se usaron como variables explicativas en los análisis de regresión fueron promedios de intervalos de dos semanas, definidos según las fechas de muestreo. Por otro lado, este estudio incluye datos de dos años que fueron cálidos y secos. Si se hubieran incluido datos climáticos más benignos, los cuales estarían probablemente asociados a valores más altos de $r_{t,t+\tau}$, es posible que se hubieran obtenido valores críticos de temperatura más altos, ya que la amplitud de la curva que relaciona $r_{t,t+\tau}$ con la

temperatura hubiera sido más grande. De hecho, este es el caso que se dio en un estudio previo que incluyó cuatro años de dinámica de poblaciones, en los que las condiciones de verano de dos de los años fueron más benignas que las de los otros dos (Montserrat et al. 2013a). Sin embargo, estos análisis ofrecen una excelente herramienta descriptiva para evaluar, en sistemas específicos, el efecto de las condiciones abióticas en la dinámica de comunidades enteras. Así, la figura 1.6 muestra claramente que tanto las poblaciones de depredadores como las de la presa empiezan a decrecer cuando el promedio de la temperatura del intervalo se encuentra por encima de sus respectivos valores críticos.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los niveles tróficos superiores son menos tolerantes a altas temperaturas que los niveles tróficos inferiores (Voigt et al. 2003), y ofrecen un ejemplo de fracaso en el control biológico de las plagas causado de forma directa por las condiciones abióticas. Los efectos negativos de las altas temperaturas sobre los enemigos naturales, y por tanto sobre el control biológico de plagas, se han observado en otros sistemas agrícolas (Stavrínides et al. 2010). Además, en la literatura se encuentran numerosos estudios en los que las altas temperaturas afectaron negativamente a parámetros relacionados con la eficacia biológica de especies utilizadas como agentes de control biológico, incluidas las dos especies estudiadas en este trabajo. Varios de los parámetros del ciclo de vida de *E. stipulatus* y de *N. californicus* se ven afectados negativamente por las altas temperaturas (Ferragut et al. 1987, El-Taj & Jung 2012) y por las humedades relativas bajas (Ghazy et al. 2012, Guzmán & Montserrat en preparación), aunque en el caso de *N. californicus* el efecto de la humedad relativa difiere entre razas (Walzer et al. 2007).

Las predicciones del cambio climático describen escenarios en los que los enemigos naturales se verán cada vez más expuestos a temperaturas extremas. En la región Mediterránea estos escenarios se verán empeorados por un aumento de los periodos de sequías severas. La combinación de altas temperaturas con bajas humedades relativas será perjudicial para las poblaciones de ácaros depredadores, ya que en ácaros fitoseidos los estadios de desarrollo más jóvenes, como el de huevo, son muy vulnerables a la desecación (DeCourcy-Williams et al. 2004, Ferrero et al. 2010). Por lo tanto, es probable que los futuros escenarios de cambio climático proporcionen oportunidades a los herbívoros para escapar del control de los depredadores, aun cuando las altas temperaturas también les afecten, como ocurrió en nuestro sistema durante 2010 (Fig. 1.5). De esta manera, se espera que las explosiones de las poblaciones de las plagas

(*outbreaks*) ocurran cuando la temperatura del ambiente se encuentre entre los valores críticos de los depredadores y los valores críticos de las plagas.

1.5. Conclusiones

En este estudio hemos demostrado que las condiciones abióticas pueden ser cruciales para el éxito del control biológico de plagas, sobretodo en áreas más sensibles al calentamiento global, como las regiones templadas y mediterráneas. La extinción de especies, tanto a nivel global como local, puede evitarse si las poblaciones emigran hacia hábitats más favorables, si los organismos superan las condiciones de estrés a través de plasticidad fenotípica, o si las poblaciones se someten a procesos de evolución adaptativa (Berg et al. 2010, Hoffmann & Sgrò 2011). Sin embargo, debido a la velocidad y magnitud del cambio climático, es posible que la respuesta de muchas poblaciones para contrarrestar los efectos negativos del incremento de las temperaturas no sea la adecuada. Creemos que en el futuro el éxito de las estrategias de control biológico estará limitado por la capacidad de los enemigos naturales de responder de forma adaptativa a los rápidos cambios del clima (Hoffmann & Sgrò 2011).

Introducción capítulos 2, 3 y 4.

ii. Introducción de los capítulos 2, 3 y 4

ii.1. Antecedentes

En el escenario de cambio climático actual, y según las predicciones del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC 2007), se espera para este siglo un aumento paulatino de las temperaturas y un incremento en la frecuencia de episodios de condiciones extremas de altas temperaturas. Dado que las condiciones abióticas median en muchos parámetros relacionados con la eficacia biológica de las especies (e.g. supervivencia, longevidad, reproducción), y en cómo los individuos interactúan entre sí (e.g. tasa de depredación, habilidad competitiva) (Dunson & Travis 1991, Gilman et al. 2010; Beveridge et al. 2010), estos cambios en el clima pueden por tanto generar cambios en la dinámica y estructura de las comunidades. Por ello, uno de los retos más importantes de la ecología actual es predecir el efecto que el cambio climático tendrá sobre las especies y las comunidades (Hughes 2000, Voigt et al. 2003, Gilman et al. 2010). Una herramienta de estudio que permite abordar dicho objetivo es el uso de “módulos comunitarios”, i.e un número bajo de especies (de tres a seis) vinculadas en una estructura específica de interacciones (Holt 1997), con los que comunidades complejas se simplifican a comunidades (teóricas o experimentales) más manejables. Así, los módulos comunitarios ofrecen un marco conceptual para entender la influencia del cambio climático sobre las interacciones entre especies y de esta forma acercarnos un poco más al conocimiento de la respuesta que tendrían las comunidades enteras al cambio climático (Gilman et al. 2010).

En los módulos comunitarios estudiados en los capítulos 3 y 4 de esta tesis doctoral las dos especies de ácaros fitoseidos interactúan entre sí a través de la competencia por explotación de un recurso alimenticio y/o de la depredación. Ambas interacciones son fundamentales en la determinación de la estructura y composición de las comunidades (Chase et al. 2002, HilleRisLambers & Dieckmann 2003).

ii.1.1. Competencia por explotación

La competencia por explotación de un recurso limitado (Fig. ii.1) es una interacción que se da entre individuos de la misma especie (competencia intraespecífica) o entre individuos de diferentes especies (competencia interespecífica), en la cual el crecimiento y supervivencia de los individuos se ve afectado negativamente.

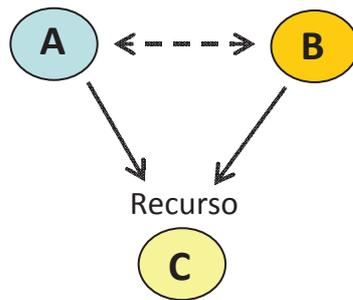
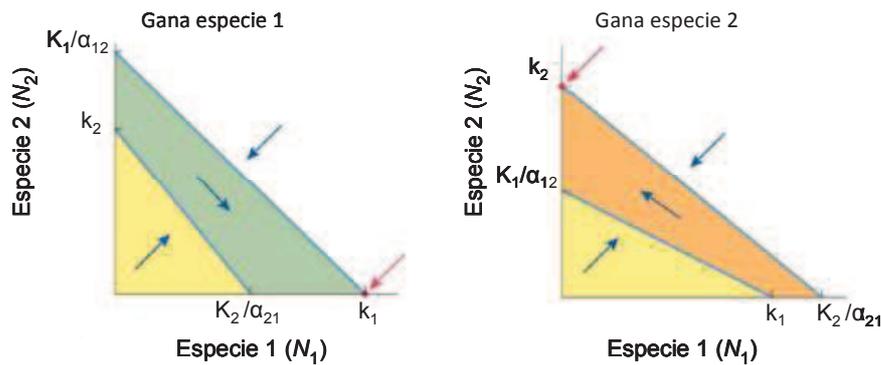


Figura ii.1. Módulo comunitario de competencia. Las flechas continuas indican el sentido de la interacción trófica y la flecha discontinua indica una interacción indirecta de competencia entre dos especies consumidoras (A y B) del recurso C.

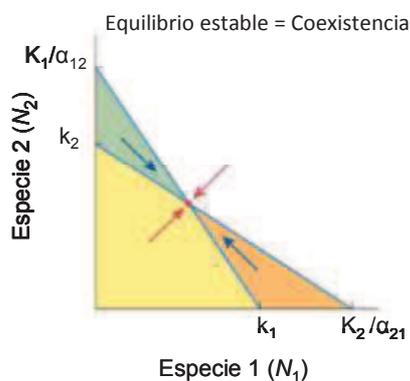
La competencia es una de las interacciones que con más fuerza influye en la composición y estructura de las comunidades. El “principio de exclusión competitiva” o “principio de Gause” mantiene que dos o más especies habitando en un ambiente con recursos limitados, y que tienen un idéntico patrón de utilización de éstos, no pueden coexistir si el ambiente es estable. Una especie estará mejor adaptada (explotará de manera más eficiente el recurso compartido) y eliminará a las otras, o bien se darán adaptaciones evolutivas hacia otros nichos ecológicos (Gause 1934). De esta manera la competencia favorece la segregación de especies con roles funcionales similares en un ecosistema (Loreau 2004). Esta segregación puede ser espacial (por ejemplo por división de nichos), temporal o ecológica (adaptaciones del comportamiento, de la morfología etc). El principio de exclusión fue demostrado experimentalmente por Gause (1934) con dos especies de *Paramecium* estrechamente relacionadas. Por separado, la población de ambas especies creció logísticamente (mostraron un crecimiento sigmoidal) mientras que cuando juntaron las dos especies una de las dos era eliminada. El principio de exclusión deriva matemáticamente de la ecuación logística (Verhulst 1838), que introduce en los modelos de crecimiento poblacional la limitación de los recursos a través de la capacidad de carga (K) del ambiente.

Lotka (1932) y Volterra (1926) desarrollaron, a partir de la ecuación logística, un modelo en el que, además de la competencia intraespecífica, incluía la competencia interespecífica entre dos especies. De su modelo se obtuvieron tres posibles resultados (exclusión de una de las dos especies, exclusión de una o de la otra especie según las condiciones iniciales, y coexistencia de las dos especies) que dependían de la importancia para cada especie de los efectos de la competencia intraespecífica con respecto a los efectos de la competencia interespecífica.

Resultado 1



Resultado 2



Resultado 3

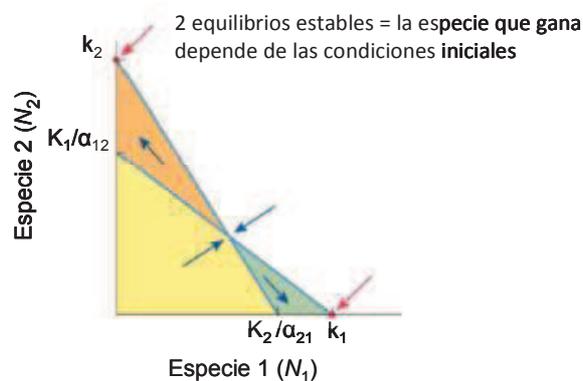


Figura ii.2. Representación de los 3 posibles resultados del modelo de competencia entre dos especies de Lotka-Volterra. K_1 y K_2 es la capacidad de carga de cada especie por separado, o sea, el número máximo de individuos de la especie que el sistema puede sostener, por lo que representa la competencia intraespecífica. α_{12} y α_{21} (coeficientes de competencia) representan el efecto interespecífico de una especie sobre la otra (e.g α_{12} se refiere al efecto interespecífico de la especie 2 sobre el crecimiento de la especie 1). Los puntos rojos señalados con flechas rojas corresponden a equilibrios estables. En el resultado 1, en el que una especie excluye a la otra, gana la especie 1 (arriba a la izquierda) porque su efecto intraespecífico es mayor que el efecto interespecífico que ejerce sobre ella la especie 2. Lo mismo ocurre (de forma inversa) cuando gana la especie 2 (arriba a la derecha). En el resultado 2, se da coexistencia porque la regulación intraespecífica de cada especie es más fuerte que la impuesta por la competencia interespecífica de la otra. En el resultado 3 ambas especies ejercen un efecto interespecífico sobre la otra mayor que el que ejercen sobre ellas mismas, i.e cada especie controla el crecimiento de la otra más que el propio. En este caso las condiciones iniciales del sistema, es decir, las densidades relativas en el momento de entrar en competencia, determinarán cual de las dos es la que acabará siendo dominante.

Con la inclusión en los modelos de competencia interespecífica de la dinámica del recurso compartido (R), Tilman (1982) desarrolló la llamada “norma R*” (en inglés “R* rule”, pronunciado “r star rule”) con la que se describe el mecanismo que opera en la exclusión de especies que compiten por un recurso limitado compartido. En la figura ii.3 se representa este mecanismo para dos especies de herbívoros (panel superior) que compiten por un recurso (una planta, panel inferior). R* se define como el nivel mínimo de recurso (en equilibrio) necesario para que la población de una especie pueda crecer (Tilman 1982). La población de la especie que es competitivamente superior (Sp1 en la Fig. ii.3) será capaz de crecer a partir de una densidad de recurso inferior a la que requiere la otra especie (Sp2). Consecuentemente, la explotación del recurso por Sp1 mantendrá la densidad del recurso a un nivel en equilibrio (panel inferior, línea continua) que no es suficiente para permitir la invasión, o sustentar una población, de Sp2. Esto quiere decir que Sp2 siempre será excluida cuando Sp1 esté presente. El “R* rule”, entonces, mantiene que aquella especie que creciendo a solas con el recurso lleve la densidad del recurso a un nivel en equilibrio más bajo (en otras palabras, aquella especie con una R* más pequeña) es la especie que ganará cuando ambas especies estén juntas.

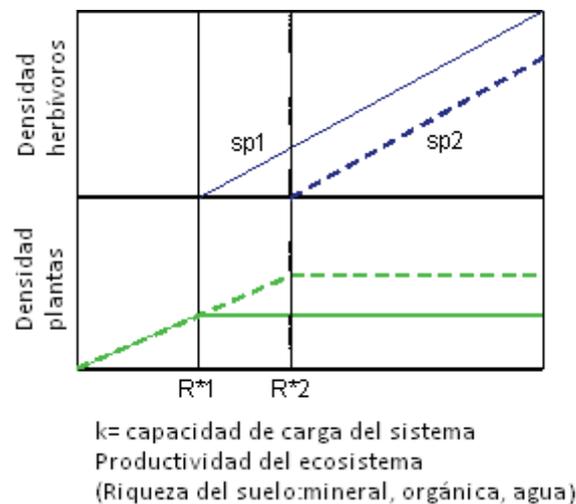


Figura ii.3. Representación del mecanismo que opera en la exclusión de especies que compiten por un recurso limitado compartido. La especie con un R* menor (sp1) es competitivamente superior en la explotación del recurso, manteniéndolo en una densidad de equilibrio inferior a la que requiere la especie con un R* más alto (sp 2) , la cual no podrá desarrollarse en presencia de la sp 1.

ii.1.2. Depredación intragremial

Cuando la competencia y la depredación se combinan surge el módulo comunitario conocido como “depredación intragremial” (IGP, de las siglas en inglés “intraguild predation”). La IGP se da cuando dos consumidores que compiten por recursos limitados están, a su vez, envueltos en interacciones de tipo depredador-presa (Polis et al. 1989, Holt & Huxel 2007). La IGP es la forma más simple de omnivoría, que se refiere al consumo de recursos en más de un nivel trófico (Pimm & Lawton 1978). La IGP se distingue del concepto tradicional de competencia porque existe una ganancia energética inmediata de una de las especies (la especie depredadora). También se diferencia del concepto clásico de depredación porque el acto de depredar reduce la competencia potencial. Por esto, el impacto de la IGP en las dinámicas de poblaciones es más complejo que los efectos que la competencia y depredación puedan ejercer por separado (Polis et al. 1989). En un principio la IGP, y la omnivoría en general, se consideró poco común en la naturaleza por su gran efecto desestabilizador, según los modelos teóricos, en la dinámica de las redes tróficas (Pimm & Lawton 1978). Sin embargo, posteriormente se observó que en realidad la IGP es muy frecuente en comunidades terrestres, marinas y de agua dulce (Polis et al. 1989, Polis & Holt 1992, Rosenheim et al. 1995, Brodeur & Rosenheim 2000, Arim & Marquet 2004, Gagnon 2011), lo que dio lugar a una profunda discordancia entre la teoría y la observación.

La mayoría de los modelos con IGP consideran tres especies (Fig. ii.4), una es el depredador intragremial (IG-depredador), que se alimenta de la segunda, la presa intragremial (IG-presa) y ambas se alimentan de la tercera especie, el recurso, por el cual compiten entre sí. La IGP puede ser simple cuando una especie siempre actúa como IG-depredador de otra, la IG-presa, o recíproca si la depredación es mutua (Polis et al. 1989). En los modelos de IGP simple una condición indispensable para la coexistencia de los sistemas con IGP es que la IG-presa debe ser competitivamente superior en la explotación del recurso compartido (Holt & Polis 1997), para ser capaz de soportar la presión debida a la depredación. Si no fuera así, el sistema se reduciría a una cadena trófica con el IG-depredador y el recurso. Además, según los modelos teóricos la coexistencia de las tres especies depende de la productividad del ecosistema, y solo es posible en sistemas de riqueza intermedia (Holt & Polis 1997, Mylius et al. 2001).

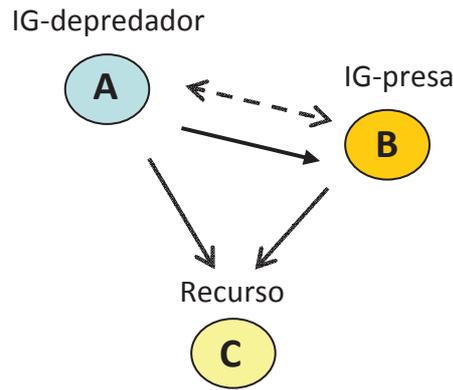


Figura ii.4. Módulo comunitario de depredación intragremial. Las flechas continuas indican el sentido de la interacción trófica y la flecha discontinua indica una interacción indirecta depredador-depredador (competencia). En este modulo la flecha continua entre IG-depredador e IG-presa es en un único sentido, indicando IGP simple. Para indicar IGP recíproca la flecha sería en ambos sentidos.

Varios trabajos teóricos han explorado el aumento de la persistencia de los sistemas con IGP incorporando en los modelos factores que los acercarán a los sistemas reales (e.g. comportamiento anti-depredador, estructura de tamaños en las poblaciones, heterogeneidad espacial, presencia de refugios, cambio de dieta durante la ontogenia, existencia de *trade-offs* entre ser competidor o ser depredador, presencia de presa alternativa, facilitación por parte del IG-depredador de la obtención del recurso para la IG-presa etc - Holt & Polis 1997, Diehl & Feissel 2000, Mylius et al. 2001, Kuijper et al. 2003, HilleRisLambers & Dieckmann 2003, Finke & Denno 2006, van de Wolfshaar et al. 2006, Holt & Huxel 2007, Amarasekare 2008, Rudolf & Armstrong 2008, Hin et al. 2011, Schellekens & van Kooten 2012, Shchekinova et al. 2013, Liu & Zhang 2013). Asimismo, algunos trabajos empíricos buscaron comprobar si las suposiciones y predicciones de los modelos de IGP se cumplían, usando modelos experimentales compuestos por especies acuáticas (Morin 1999, Diehl & Feissel 2000 y 2001, Schröder et al. 2009), terrestres (Montserrat et al. 2008, Reichstein et al. 2013) y de costas rocosas (Novak 2013). Otros trabajos han perseguido identificar experimentalmente factores (estructura en el hábitat – Janssen et al. 2007) o mecanismos (extinción a nivel local pero persistencia a nivel meta-poblacional – Montserrat et al. 2012) que favorezcan la persistencia de los sistemas con IGP y que puedan, por tanto, explicar su ubiquidad en la naturaleza. Sin embargo, a día de hoy aún no se ha conseguido resolver la incongruencia entre la teoría de IGP y las observaciones empíricas en campo y en laboratorio.

ii.2. Sistema de estudio y objetivos:

El agro-ecosistema del aguacate del sureste español, como se detalló en la introducción general de la presente tesis, está compuesto por el cultivo del aguacate, *Persea americana*, la especie plaga *Oligonychus perseae* y tres especies de ácaros fitoseidos depredadores, *Euseis stipulatus*, *E. scutalis* y *Neoseiulus californicus*. Las dos especies de depredadores *E. stipulatus* y *E. scutalis* son especies hermanas, filogenéticamente muy cercanas y muy similares tanto en su morfología como en su ecología. Durante los meses de verano de los años 2008 y 2009 se realizaron muestreos de campo en cultivos de aguacate de la zona de estudio, para identificar las especies de ácaros fitoseidos presentes asociados al ácaro cristalino *O. perseae* (comunicación personal J.R Boyero, J.M Vela & E.Wong, IFAPA Churriana, Málaga). La zona se dividió en área costera y en área de interior. El área costera presenta características climatológicas suaves, con temperaturas diurnas medias de verano de 25°C y altas humedades relativas, en torno al 70-80% de media. El área de interior presenta unas condiciones de verano más severas, de altas temperaturas, con medias diurnas de 28°C y bajas humedades relativas (60% de media) pudiendo registrarse incluso humedades relativas inferiores al 30%. Los resultados de los muestreos manifestaron una clara dominancia de *E. stipulatus* en cultivos de aguacate de clima costero y de *E. scutalis* en los cultivos de interior, de clima más extremo.

En el escenario de calentamiento global actual, el agro-ecosistema del aguacate se nos presenta como un modelo experimental ideal para el estudio del impacto que el cambio climático podrá ejercer en las comunidades. Por un lado es un sistema bastante simple, en cuanto a que se compone de un número de especies bajo. Estas especies, además, pueden ser fácilmente mantenidas en poblaciones controladas en crías de laboratorio con las que se pueden llevar a cabo todo tipo de experimentos. Por otro lado, en nuestra área de estudio este sistema ofrece unidades en campo que son comparables entre sí y que solo difieren entre ellas en las condiciones abióticas que presentan. Así podemos estudiar parcelas de aguacate de interior y parcelas de aguacate costeras que son similares en los métodos de gestión (riego, podas etc.), en la variedad de aguacate cultivada (Hass) etc. pero que presentan condiciones abióticas distintas (más cálidas y secas las de interior y más suaves las costeras). Además la comunidad de ácaros fitoseidos depredadores presenta diferencias estructurales (*E. scutalis* se encuentra en

parcelas de interior mientras que *E. stipulatus* se halla en parcelas de costeras) que parecen estar determinadas por las condiciones abióticas.

En base a los antecedentes presentados, en los capítulos 2, 3 y 4 de la presente tesis doctoral se estudió el efecto de las condiciones abióticas (temperatura y humedad relativa) sobre las especies que conforman el agro-ecosistema del aguacate del sureste español, tanto sobre parámetros individuales relacionados con su eficacia biológica (capítulo 2) como sobre las interacciones de que se dan entre ellas (capítulos 3 y 4). En concreto se estudiaron las dos especies de ácaros fitoseidos depredadores *Euseius stipulatus* y *E. scutalis* que en nuestro sistema compiten en el mismo nivel trófico por la explotación de los recursos presentes en el cultivo del aguacate, que son el polen y el ácaro cristalino *O. perseae*.

Los objetivos específicos de cada capítulo son los siguientes:

Capítulo 2:

El objetivo abordado en este capítulo fue definir, y comparar entre especies, la relación funcional que existe entre las condiciones abióticas (temperatura y humedad relativa) y algunos parámetros relacionados con la eficacia biológica de los individuos (tasa de oviposición, supervivencia de las hembras y de su descendencia). Así se podrá determinar si existen diferencias en el nivel de tolerancia a condiciones climáticas extremas entre las dos especies estudiadas, *E. stipulatus* y *E. scutalis*, que puedan explicar las diferencias observadas a nivel poblacional. La tasa de oviposición es un parámetro que en ácaros fitoseidos está altamente correlacionado con la tasa intrínseca de crecimiento de la población (Sabelis & Janssen 1994). La supervivencia de las hembras y de su descendencia es fundamental para el crecimiento de una población.

Capítulo 3:

En este capítulo el objetivo fue determinar si existe depredación intragremial entre *E. stipulatus* y *E. scutalis* usando polen de *Carpobrotus edulis* como recurso compartido, determinar su magnitud (tasa de depredación) y su dirección (si es simple o recíproca), y averiguar si la intensidad o dirección de la interacción varía con las condiciones ambientales.

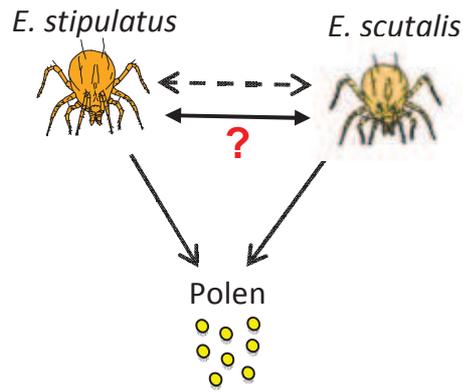
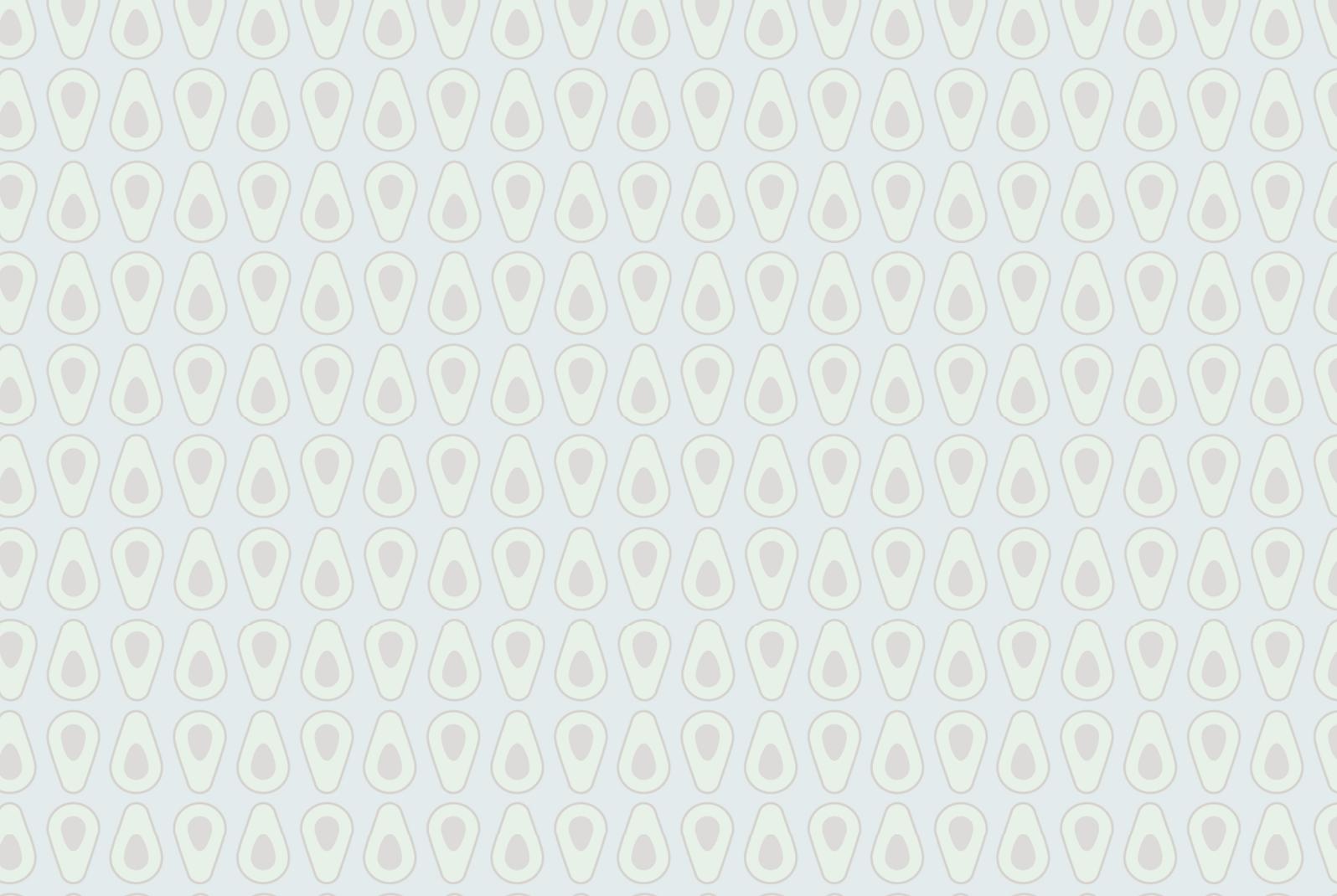


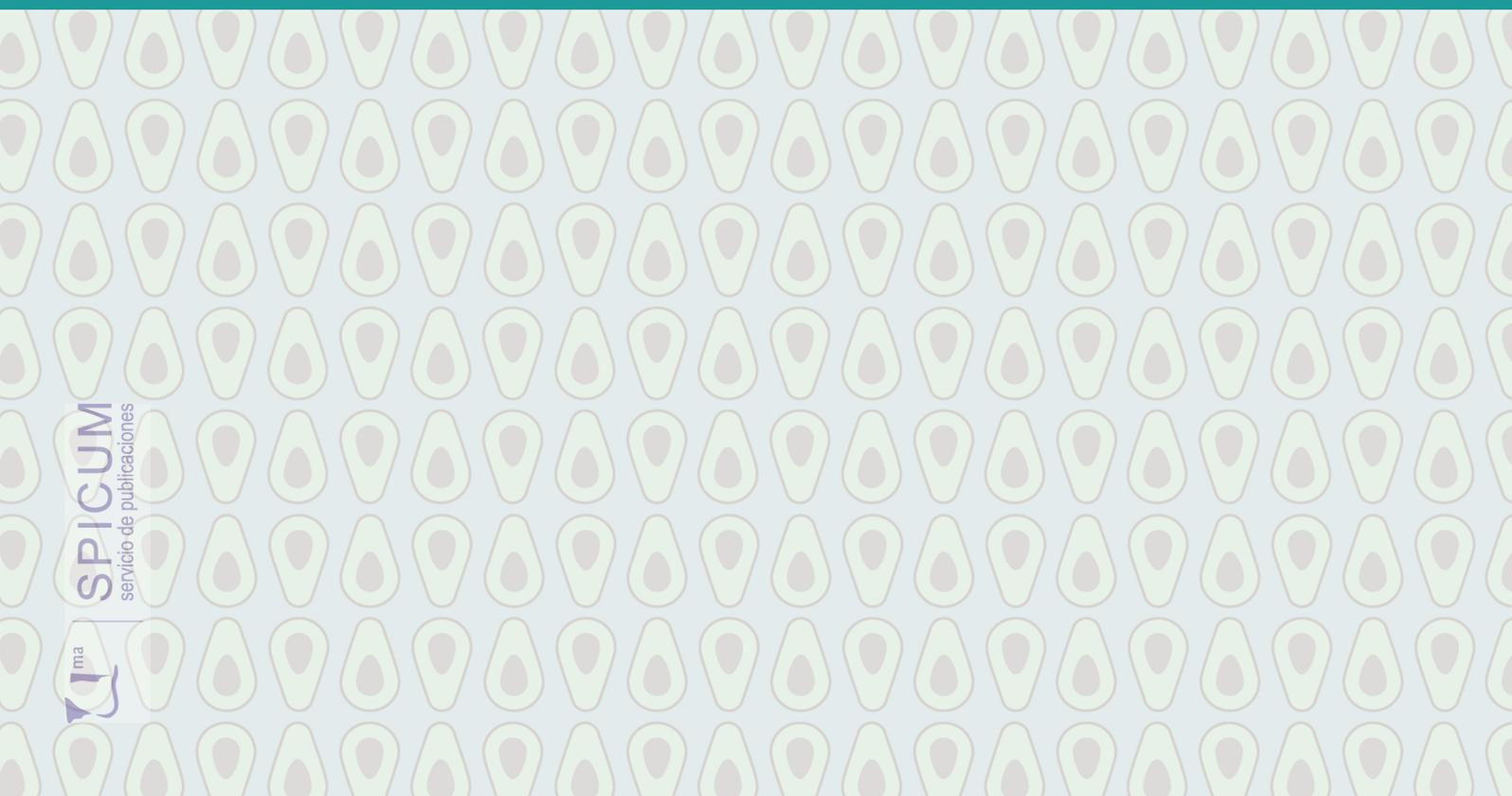
Figura ii.5. Módulo comunitario estudiado en el capítulo 3 bajo dos condiciones abióticas, “óptimas” y “cálidas-secas”. En los experimentos realizados en este capítulo se analizó la interacción de depredación entre ambas especies de *Euseius* que compiten por un recurso común, el polen, para determinar la existencia de depredación intragremial.

Capítulo 4:

Sabiendo que existe una relación de competencia entre *E. stipulatus* y *E. scutalis*, en el capítulo 4 se abordaron los efectos de las condiciones abióticas a nivel poblacional y de comunidad. Se determinó si las condiciones abióticas influyen en la relativa superioridad competitiva entre las dos especies. Se llevaron a cabo experimentos en los que se estudió la dinámica poblacional de cada especie por separado a cada condición ambiental, y experimentos poblacionales de competencia, en los que se determinaron patrones de exclusión dependientes de las condiciones abióticas.



Capítulo 2



2. Efecto de las condiciones abióticas sobre parámetros relacionados con la eficacia biológica de *E. stipulatus* y *E. scutalis*.

2.1 Material y Métodos

2.1.1 Crías de fitoseidos

Las poblaciones de *E. stipulatus* y *E. scutalis* fueron mantenidas en crías iniciadas en 2007 y 2009, a partir de aprox. 300 y 100 individuos respectivamente, obtenidos de cultivos de aguacate de clima costero para las crías de *E. stipulatus*, y de cultivos de interior cercanos a la población de Vélez-Málaga, de clima más cálido y seco, para las crías de *E. scutalis*. Las unidades de cría constaron de tres plántulas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) de dos a cuatro hojas de edad, situadas en los laterales de una esponja recubierta de algodón y sumergida en una bandeja plástica con agua, tal y como se describe en el capítulo 1 de la presente tesis. Las crías se mantuvieron en un habitáculo bajo condiciones controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ de humedad relativa y 16:8 h de luz:oscuridad). Las poblaciones de fitoseidos fueron transferidas una vez al mes a nuevas unidades de cría, bien cortando las hojas de las crías viejas y colocándolas sobre las hojas de las nuevas crías, o pasando cuidadosamente los individuos uno a uno con un pincel en el caso de detectarse contaminación en las crías con otras especies, como puede ser el caso del ácaro *Tyrophagus putrescentiae*, que se alimenta de los hongos de las zonas en descomposición que aparecen en las plántulas viejas (Duek et al. 2001).

2.1.2 Arenas experimentales

Las arenas experimentales utilizadas (Fig. 2.1) fueron diseñadas para mantener a lo largo de los experimentos dos ambientes abióticos diferentes, aislados y separados por el limbo de los discos de hoja de aguacate de las arenas. En el ambiente superior (el envés) los individuos testados experimentaron las condiciones abióticas definidas según los tratamientos, mientras que el inferior (el haz) se mantuvo más húmedo con el fin de prolongar la turgencia de los discos de hoja.

En un aro plástico de 6 cm de diámetro externo y 4 cm de diámetro interno, la cara interna se recubrió con plastilina y sobre ésta se pegó un disco de hoja de aguacate limpio de 4.5 cm de diámetro con el envés hacia el exterior, creando el área experimental para los individuos. En contacto con el disco de hoja se colocó un disco de

espuma floral mojado para aportarle humedad y permitir que se mantenga turgente. Para cerrar la parte inferior, se recubrió la espuma floral con parafilm®. Como soporte para la oviposición, en el área experimental se pegó un hilo de coser de 0.5 cm. Por último, en todo el área de contacto entre el disco de hoja y la plastilina se dispuso una barrera del compuesto tanglefoot® para dificultar que los ácaros abandonaran la arena y para capturar a los que la abandonaban (ver anexo II con detalles y fotos del montaje de las arenas).



Figura 2.1. Arena experimental utilizada para los experimentos a nivel individual detallados en este capítulo. En el centro se aprecia el disco de hoja de aguacate y el hilo para la oviposición. Alrededor del disco de hoja se ve la barrera de tanglefoot® y la plastilina (azul).

2.1.3 Efecto de las condiciones abióticas sobre parámetros relacionados con la eficacia biológica y el comportamiento de *E. stipulatus* y *E. scutalis*.

El objetivo de este experimento fue determinar cómo afectan las condiciones abióticas al rendimiento de *E. stipulatus* y *E. scutalis*, mediante la evaluación del efecto de la temperatura y de la humedad relativa en algunos parámetros relacionados con la eficacia biológica (tasa de oviposición, porcentaje de eclosión de huevos, supervivencia de las hembras) o con el comportamiento (tendencia a huir de la arena).

Debido a que la tasa de oviposición varía con la edad de las hembras, en los experimentos se evaluaron hembras fértiles de edad similar (entre 10-14 días). Para obtenerlas se realizaron cohortes de cada especie a partir de 400 huevos extraídos de las crías, que se depositaron con un pincel sobre dos o tres hojas de judía, situadas sobre una espuma cubierta de algodón mojado en una bandeja de plástico de 3.5 litros, y se dejaron desarrollar a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y $65 \pm 5\%$ de humedad relativa, con polen de *Carpobrotus edulis* como alimento, hasta obtener hembras adultas. En cada arena

experimental se colocó una hembra grávida proveniente de las cohortes descritas anteriormente. Como fuente de alimento se añadió polen de *C. edulis ad libitum*. Cada réplica se asignó a uno de los 15 tratamientos definidos por una combinación diferente de temperatura y humedad relativa, en un rango diurno de temperatura entre 20°C y 37°C y de humedad relativa entre 30% y 75% (tabla 2.1). Los experimentos se llevaron a cabo en una cámara de condiciones controladas (Fitoclima S 600 PLH Aralab) con un fotoperiodo de 16:8 h de luz:oscuridad. Las hembras de ambas especies fueron expuestas a las condiciones abióticas asignadas durante 3 días consecutivos. Cada día (a las 24, 48 y 72 h) se realizó el recuento del número de huevos depositados por las hembras, y se anotó el “destino” de éstas, que se definió según tres categorías: “viva” si la hembra estuvo viva en la arena hasta el tercer día; “muerta” si la hembra se encontró seca en la arena antes del tercer día y “huida” si la hembra fue hallada muerta en el tanglefoot® que rodea las arenas antes del tercer día. Por último, los huevos depositados por todas las hembras, independientemente del destino de éstas, fueron examinados cada día, y durante un máximo de 4 días más, para obtener el número de huevos eclosionados y de huevos no eclosionados, a cada condición abiótica. El número de réplicas por tratamiento y especie varió entre 17 y 40.

Tabla 2.1. Combinaciones de temperatura (T^a en °C) y humedad relativa (HR en %) diurnas y nocturnas establecidas para cada condición abiótica o tratamiento.

	DÍA		NOCHE	
	T^a	HR	T^a	HR
SUAVES	20°C	75%	18°C	75%
SUAVES SECAS	20°C	50%	18°C	50%
SUAVES MUY SECAS	20°C	30%	18°C	30%
ÓPTIMAS	25°C	75%	22°C	75%
ÓPTIMAS SECAS	25°C	50%	22°C	50%
ÓPTIMAS MUY SECAS	25°C	30%	22°C	30%
CÁLIDAS	30°C	75%	27°C	75%
CÁLIDAS SECAS	30°C	50%	27°C	50%
CÁLIDAS MUY SECAS	30°C	30%	27°C	30%
MUY CÁLIDAS	33°C	75%	30°C	75%
MUY CALIDAS SECAS	33°C	50%	30°C	50%
MUY CÁLIDAS MUY SECAS	33°C	30%	30°C	30%
EXTREMAS	37°C	75%	30°C	75%
EXTREMAS SECAS	37°C	50%	30°C	50%
EXTREMAS MUY SECAS	37°C	30%	30°C	30%

2.1.4. Análisis de los datos:

2.1.4.1. Tasa de oviposición

Dado que los ácaros fitoseidos ovipositan 2-3 huevos por día (van Rijn & Tanigoshi, 1999) y que solo pueden llevar un huevo en su interior (Faraji et al. 2002), al menos uno de los huevos depositados por las hembras durante las primeras 24 h puede haber sido producido bajo las condiciones abióticas previas al experimento. Por tanto, la tasa de oviposición (número huevos/hembra/día) se obtuvo a partir del promedio de huevos ovipositados por las hembras durante el segundo y tercer día, para asegurar que los resultados se deben solo al tratamiento. Así, solo las réplicas en las que las hembras sobrevivieron hasta el tercer día fueron incluidas en los análisis estadísticos, por lo que éstos solo informarán de diferencias causadas por las condiciones abióticas en aquellas hembras que logran sobrevivir a tales condiciones.

Por un lado se comparó el efecto de las condiciones abióticas en la tasa de oviposición entre las dos especies. Para ello se usó un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución de Poisson del error y “especie”, temperatura (“T”), y humedad relativa (“HR”) como efectos fijos. Debido a que nuestro interés era detectar diferencias entre especies, en este modelo solo se incluyeron las fuentes de variación que contenían el factor principal “especie” (i.e. “especie”, “especie*T”, “especie*HR” y “especie*T*HR”).

Por otro lado se analizaron los efectos de las condiciones abióticas en la tasa de oviposición de las hembras de cada especie, mediante un GLM por especie, con distribución de Poisson del error, y “T” y “HR” como efectos fijos.

Para estimar la relación funcional de la tasa de oviposición a lo largo de un gradiente de temperatura y de humedad relativa, los datos de cada especie también se ajustaron a un modelo de regresión no lineal que incluyó el primer y segundo orden de la temperatura y la humedad relativa, así como su interacción. Los valores de temperatura incluidos en este análisis fueron los promedios entre las temperaturas diurnas y las nocturnas de cada tratamiento, esto es 19.0°C, 23.5°C, 28.5°C, 31.5°C y 33.5°C.

2.1.4.2. “Destino” de las hembras y de los huevos

Para el análisis del “destino” de todas las hembras, y que fue categorizado en “vivas”, “muertas”, y “huidas”, se utilizó un GLM con distribución multinomial del error. De manera similar, el “destino” de los huevos depositados por las hembras (“eclosionados” vs. “no eclosionados”) se analizó con un GLM con distribución binomial del error. Se hicieron dos tipos de análisis, uno para comparar el efecto de las condiciones abióticas entre especies y otro para comparar este efecto dentro de cada especie, de manera similar al análisis de la tasa de oviposición. En el análisis de los huevos eclosionados no se incluyeron los tratamientos a 37°C (temperatura de día) al no poner ningún huevo *E. stipulatus* y muy pocos *E. scutalis*.

Todos los análisis se hicieron con el programa SPSS (IBM SPSS statistics v.19)

2.2. Resultados

2.2.1. Tasa de oviposición

La tasa de oviposición de las hembras presentó diferencias significativas entre las dos especies (Wald para “especie” = 224.87, g.l = 1, $P << 0.001$). Estas diferencias fueron a su vez influidas por la temperatura (Wald para “especie*T” = 667.94, g.l = 8, $P << 0.001$) y por la humedad relativa (Wald para “especie*HR” = 11.04, g.l = 4, $P = 0.026$), pero no por la interacción con ambas (Wald para “especie*T*HR” = 22.41, g.l = 16, $P = 0.130$). En general *E. scutalis* presentó una mayor tasa de oviposición que *E. stipulatus* en todos los tratamientos (Fig. 2.2), tendiendo a aumentar las diferencias con el incremento de la temperatura y la disminución de la humedad relativa. La máxima tasa de oviposición de *E. stipulatus* se dio a temperaturas más bajas (25°C diurna = 23.5°C de promedio diario) que la de *E. scutalis* (30°C diurna = 28.5°C de promedio diario) (Fig. 2.2).

En cuanto al efecto de las condiciones abióticas en cada especie, la temperatura y la humedad relativa afectaron a la tasa de oviposición de *E. stipulatus* y de *E. scutalis* de manera distinta. Según el modelo lineal generalizado (GLM) la tasa de oviposición de *E. scutalis* se vió afectada por la temperatura (Wald para “T” = 91.84, g.l = 4, $P << 0.001$) pero no por la humedad relativa (Wald para “HR” = 0.03, g.l = 2, $P = 0.99$; Wald para “T*HR” = 2.90, g.l = 8, $P = 0.94$). El número de huevos depositados por las hembras fue menor a temperaturas extremas (tanto bajas como altas) pero no varió según humedad relativa dentro de cada temperatura (Fig. 2.2). Sin embargo la tasa de

oviposición de *E. stipulatus* se vió afectada por la combinación de temperatura y humedad relativa (Wald para “T*HR”= 42.25, g.l=8, P<0.001), siendo estos efectos más acusados en tratamientos con altas temperaturas y bajas humedad relativa (Fig. 2.2)

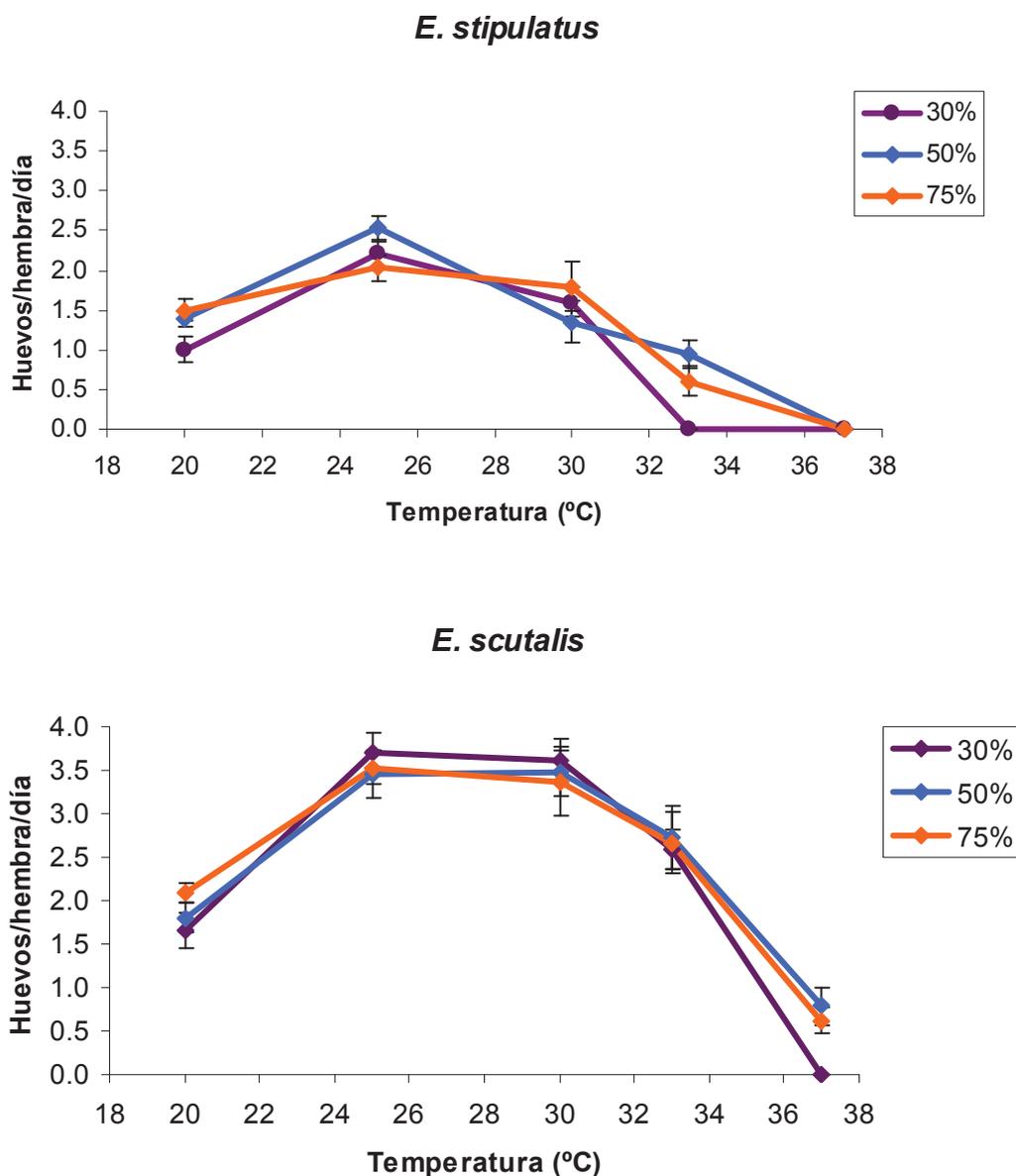


Figura 2.2. Tasa de oviposición de *E. stipulatus* (arriba) y de *E. scutalis* (abajo) en función de la temperatura (eje X, representado solamente las temperaturas diurnas) y de la humedad relativa (leyenda). Cada punto muestra el promedio (\pm error estándar; n=5-20)

El análisis de regresión no lineal dio un resultado similar al del GLM. Para la especie *E. stipulatus*, el primer y el segundo orden de la temperatura y de la humedad relativa fueron factores que explicaron significativamente los cambios en la tasa de oviposición ($P < 0.001$ para las fuentes de variación “T”, “T²”, “HR” y “HR²”), aunque

la interacción “T*HR” no resultó significativa ($P = 0.80$). Para *E. scutalis*, al igual que en el GLM, solo resultaron significativos el primer y segundo orden de la temperatura (ambas fuentes de variación a $P \ll 0.001$). En la figura 2.3 se representan gráficamente los resultados de las regresiones no lineales cuando en la ecuación se incluyeron solo los parámetros estimados que fueron significativos.

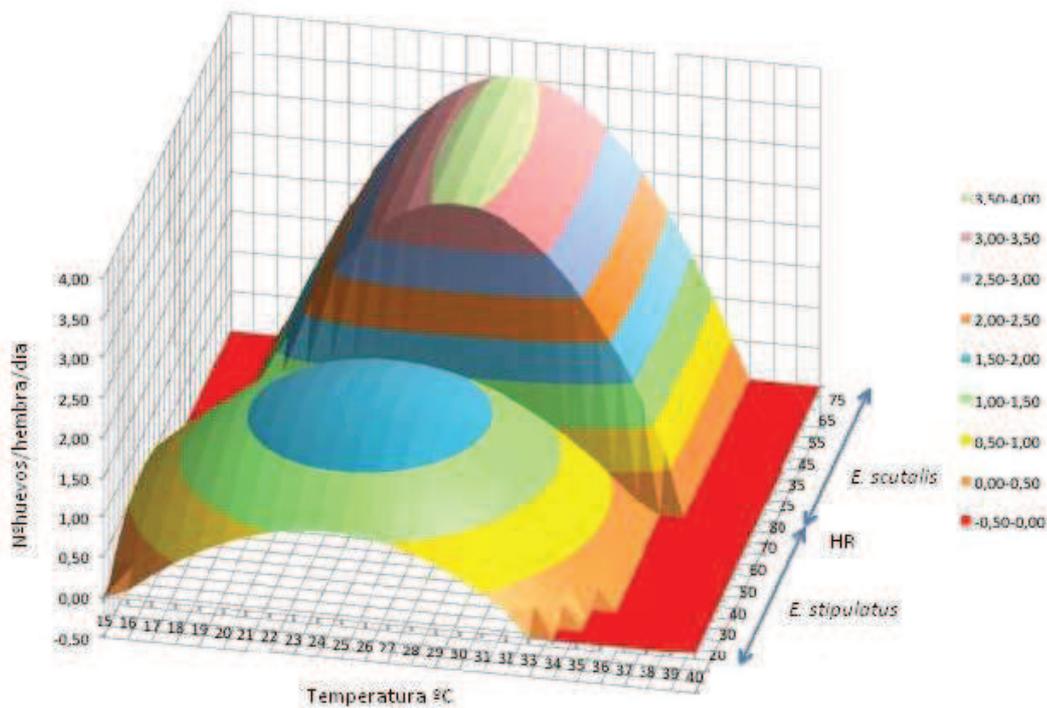


Figura 2.3. Predicciones de la tasa de oviposición (eje Y) según un modelo de regresión no lineal, en función de la temperatura promedio por día (eje X) y la humedad relativa (eje Z) para ambas especies, *E. stipulatus* (abajo) y *E. scutalis* (arriba). La leyenda indica el número de huevos/hembra/día.

2.2.2. “Destino” de las hembras y de los huevos

Entre especies, los efectos en la tasa de oviposición causados por los factores abióticos se vieron amplificados por los efectos de la temperatura y la humedad relativa en la supervivencia de las hembras (Wald para especie*temperatura*HR = 31.48, g.l. = 16, $P=0.012$) y en la eclosión de los huevos (Wald para especie*temperatura*HR = 28.31, g.l. = 12, $P=0.005$). En general se observó una mayor supervivencia de las hembras de *E. scutalis* que de las de *E. stipulatus*, en todos los tratamientos (Fig. 2.4). En cuanto a la eclosión de los huevos (Fig. 2.5), el porcentaje fue similar para las dos especies cuando la humedad relativa fue media y alta (50% y 75%), pero solo entre 20 y

30 °C de temperatura. A temperaturas superiores a 30 °C, los huevos de *E. stipulatus* ya no eclosionaron (excepto un pequeño porcentaje a 30°C y 75% HR) mientras que en *E. scutalis* esto ocurrió cuando las temperaturas fueron superiores a 33°C.

En el análisis por especies, la supervivencia de las hembras de *E. stipulatus* se vio afectada tanto por la temperatura como por la humedad relativa (Wald para “T*HR”= 28.84, g.l = 8, $P < 0.001$). En *E. scutalis* solo la temperatura influyó en el “destino” de las hembras (Wald para “T”=36.99, g.l=4, $P < 0.001$). En efecto, la inspección gráfica revela que la humedad relativa baja afectó negativamente a la supervivencia de las hembras de *E. stipulatus* pero no a las de *E. scutalis* (Fig. 2.4). El efecto de las altas temperaturas fue más acusado en *E. stipulatus* que en *E. scutalis*, e.g, a 37°C (33.5°C de promedio diario) *E. stipulatus* no fue capaz de sobrevivir a ninguna humedad relativa, mientras que *E. scutalis* sí sobrevivió a humedades relativas de 50% y 75% (Fig. 2.4) e incluso ovipositió, aunque a una tasa muy baja (0,79 y 0,63 huevos/hembra/día, respectivamente) (Fig. 2.2). El “destino” de los huevos, a diferencia de la tasa de oviposición y de supervivencia de las hembras, sí se vio afectado por la humedad relativa en ambas especies, además de por la temperatura (en *E. stipulatus* Wald para “T*HR”=19.56, g.l = 6, $P = 0.003$ y en *E. scutalis* Wald para “T*HR”= 28.20, g.l = 6, $P < 0.001$). El porcentaje de eclosión de ambas especies disminuyó con el incremento de la temperatura (Fig. 2.5), siendo este efecto más acusado en humedades relativas bajas, de 50% y 30% para *E. stipulatus* y de 30% para *E. scutalis*.

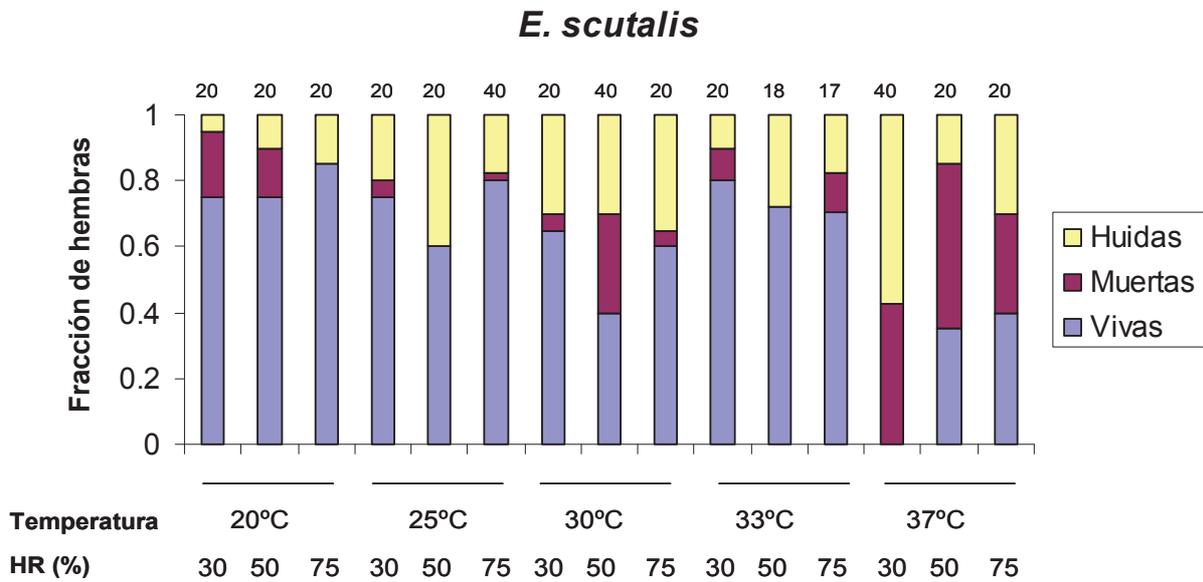
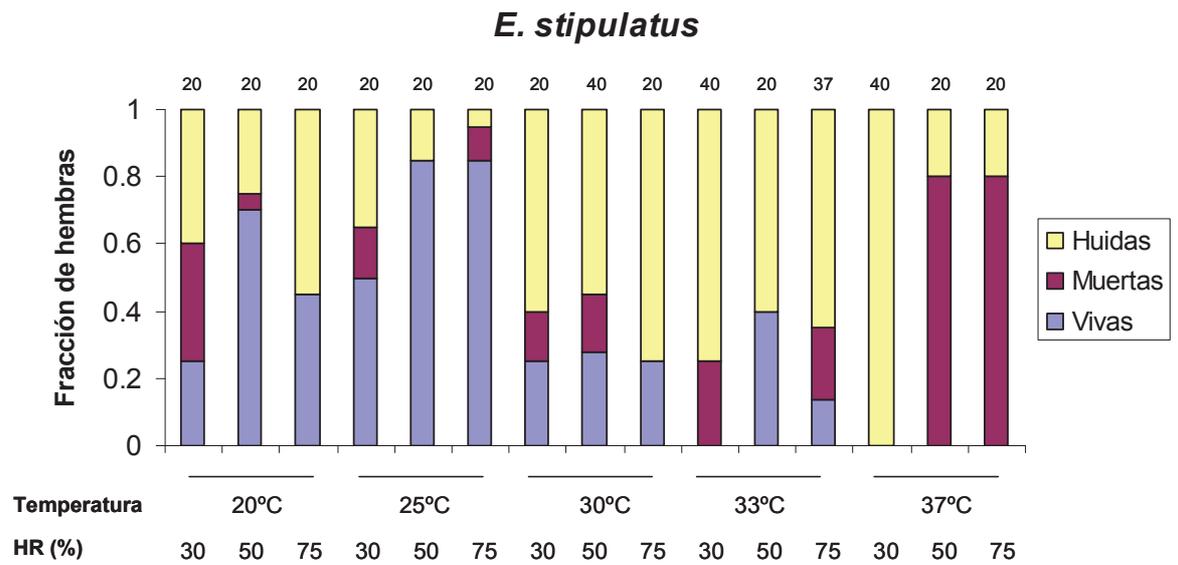


Figura 2.4. Representación de la fracción de hembras de *E. stipulatus* (arriba) y de *E. scutalis* (abajo) vivas, muertas y huidas (ver leyenda) en cada uno de los 15 tratamientos (solo se representan las temperaturas diurnas). Los números sobre las barras se refieren al número total de hembras de cada tratamiento.

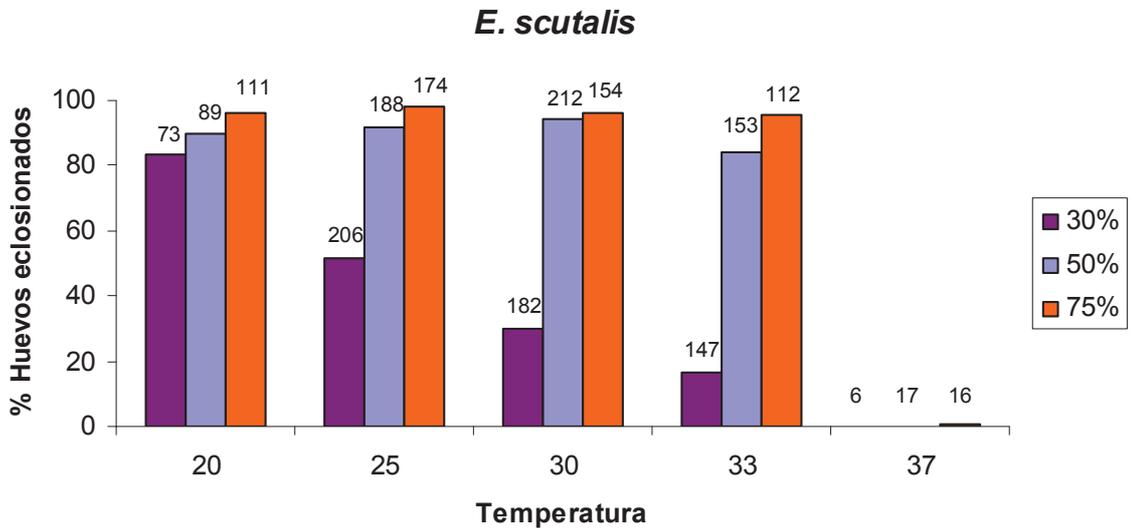
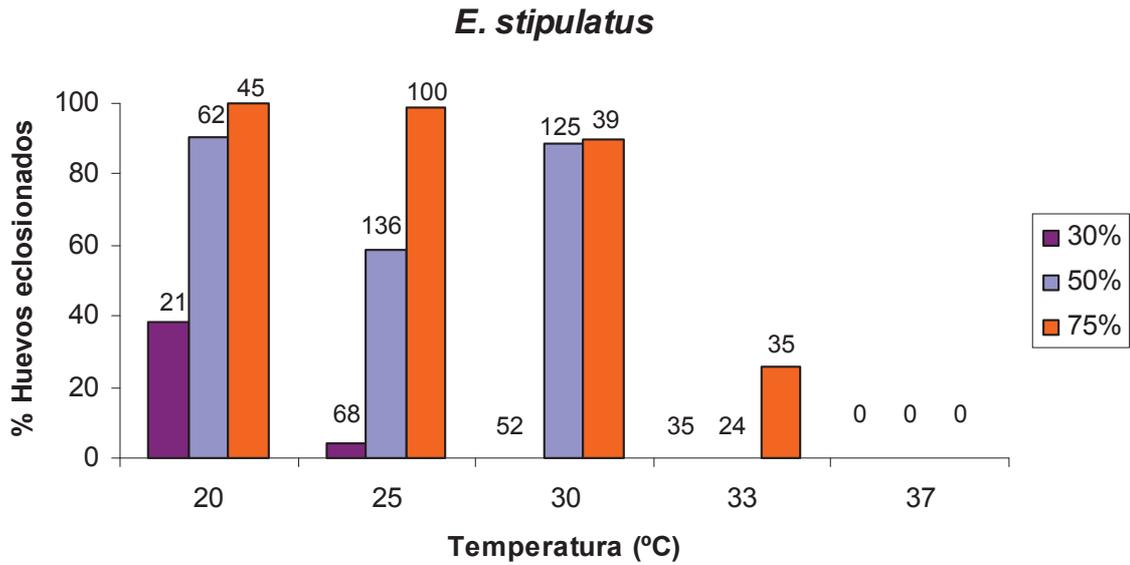


Figura 2.5. Porcentaje de eclosión de huevos de *E.stipulatus* (arriba) y de *E. scutalis* (abajo) en función de la temperatura (eje X, solo se representan las temperaturas diurnas) y la humedad relativa (leyenda). Los números sobre las barras corresponden al total de huevos ovipositados por el total de hembras en cada tratamiento.

Por último, la tendencia a huir de la arena, “estimada” a partir de los individuos hallados en la barrera de tanglefoot®, fue en general mucho más acusada en hembras de *E. stipulatus* que en hembras de *E. scutalis* (Fig. 2.4). A 25°C la tendencia a huir de las hembras de *E. stipulatus* fue menor que en el resto de temperaturas. La mayor tendencia a huir se dio a 37°C y 30% de humedad relativa, coincidiendo con las condiciones abióticas más severas. En *E. scutalis* la menor tendencia a huir se dio a 20°C, y la mayor a 37°C y 30% de humedad relativa (Fig. 2.4).

2.3 Discusión.

Las condiciones abióticas estudiadas en este trabajo (temperatura y humedad relativa) afectaron de forma relevante a todos los parámetros relacionados con la eficacia biológica que se analizaron en *E. stipulatus* y *E. scutalis*. Ya en multitud de trabajos se determinó que la temperatura y la humedad relativa son factores de vital importancia para las especies ectotermas, como los artrópodos. Su efecto se ha evaluado en, por ejemplo, la tasa intrínseca de crecimiento, la tasa de oviposición, la eclosión de huevos, el tiempo de desarrollo, fecundidad, longevidad, supervivencia, etc (Ferragut et al. 1987, Davey 1988, Bonfour & McMurtry 1997, Roy et al. 2003, Raza et al. 2005, de Vis et al. 2006, Tsoukanas et al. 2006, Broufas et al. 2007, Walzer et al. 2007, Kasap 2009a y 2009b, Ferrero et al. 2010, Gadino & Walton 2012, Abbassy et al. 2012). La relación funcional de estos parámetros del ciclo vital de las especies con la temperatura y la humedad relativa es a menudo no-lineal. En nuestros resultados, la variación de la tasa de ovoposición con la temperatura se ajustó bien a una función cuadrática en las dos especies, con la tasa máxima de oviposición en valores medios de temperatura (2.53 huevos/hembra/día a 25°C de temperatura diurna) para *E. stipulatus* y valores medios y más extremos (3.72 y 3.60 huevos/hembra/día a 25°C y 30°C de temperatura diurna, respectivamente) para *E. scutalis* (Fig. 2.2). Este último resultado concuerda con el encontrado por Bonfour & McMurtry (1997) para hembras de *E. scutalis* alimentadas con polen de *Malephora crocea* Jacq. En el caso de la humedad relativa esta relación cuadrática con la tasa de oviposición se observó en *E. stipulatus* pero no en *E. scutalis*.

El efecto de ambas variables abióticas en los tres parámetros evaluados en este trabajo no fue el mismo para las dos especies. La sensibilidad al aumento de las temperaturas fue mucho mayor en *E. stipulatus* que en *E. scutalis*, y además la humedad relativa fue muy importante para la primera especie pero no tanto para la segunda. En efecto, temperaturas diurnas superiores a los 30°C afectaron dramáticamente la reproducción y supervivencia de hembras de la primera especie pero en muy menor medida en la segunda, y el impacto de la humedad relativa en los tres parámetros evaluados (tasa de oviposición, supervivencia de las hembras, y eclosión de los huevos) fue mucho mayor para *E. stipulatus* que para *E. scutalis*. Este impacto diferencial de la humedad relativa se observó incluso en la supervivencia de los huevos, el estadio más vulnerable a condiciones abióticas desfavorables, como altas temperaturas y bajas humedades relativas (Sabelis 1985, Walzer et al. 2007), por ser un estadio inmóvil que

no puede obtener agua de su presa ni del entorno (Bakker et al. 1993; De Courcy Williams et al. 2004). El efecto de la humedad relativa sobre la eclosión de los huevos ha sido comprobado en multitud de trabajos con ácaros fitoseidos (van Dinh et al. 1987 y sus referencias, Bakker et al. 1993, Schausberger 1998, De Courcy Williams et al. 2004, de Vis et al. 2006, Ferrero et al. 2010).

Aunque se espera que cada especie responda a los cambios ambientales de manera individual (Voigt et al. 2003), llama la atención que especies tan cercanas filogenéticamente como *E. scutalis* y *E. stipulatus* respondan de manera tan distinta al estrés ambiental causado por factores abióticos. Existen numerosos mecanismos fisiológicos de adaptación a los cambios de temperatura ambiental que actúan a nivel celular, como son cambios en la densidad mitocondrial (que aumenta en épocas frías y disminuye en épocas cálidas en peces - St.-Pierre et al. 1998, Guderley 1998) y modificaciones en la saturación de los lípidos, en las propiedades cinéticas de las enzimas metabólicas, en las proteínas contráctiles y en los transportadores transmembrana. (Johnston 1990, Hazel 1995, Tiku et al. 1996, Storelli et al. 1998). Uno de los mecanismos más importantes, existente en la mayoría de los organismos tanto eucariotas como procariotas, es la síntesis de unos polipéptidos altamente conservados llamados proteínas de shock térmico (HSP de sus siglas en inglés “heat shock proteins”) (Kregel 2002). La expresión de estas proteínas se induce tras la exposición a un shock térmico u otro tipo de estrés (hipoxia, acidosis, isquemia, radiación ultravioleta, disminución de la energía, presencia de especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno como el óxido nítrico, e infecciones virales) (Moseley 1997, Kregel 2002). En respuesta a una hipertermia generan en el organismo una termotolerancia (capacidad del organismo de volver a soportar un nuevo shock térmico) que puede durar de 4 a 5 días. Además las HSPs tienen un importante papel en la adaptación al calor. Se han encontrado diferencias interespecíficas en los patrones de acumulación de proteínas HSP en función de que su hábitat fuera más o menos cálido. En un estudio con nueve especies de reptiles que habitaban distintos ambientes (montañosos, boscosos y desérticos) se demostró una notable diversidad entre especies en los niveles constitutivos de HSP70, que se correlacionó con las temperaturas de sus hábitats (Ulmasov et al. 1992). Así, estos autores llegaron a una conclusión extrapolable a todos los organismos ectotermos: a mayor temperatura del nicho ecológico, mayor es la cantidad de proteínas de la familia de las HSP70 encontradas a condiciones de

temperatura fisiológicamente normales, sin estar bajo estrés térmico. En algunas especies de moscas se ha demostrado que la desecación (humedades relativas inferiores al 5%) también puede incrementar la cantidad de proteínas HSP (Hayward et al. 2003, Tammariello et al. 1999). En nuestro caso, sería interesante poder evaluar la producción de HSPs en ambas especies de *Euseius*, tanto a condiciones de estrés térmico como a condiciones normales de temperatura, para determinar si hay diferencias en la expresión de estas proteínas que pudieran explicar las diferencias en la adaptación a las temperaturas encontrada entre *E. scutalis* y *E. stipulatus*. Nuestros resultados, así como los de otros autores (Bonfour & McMurtry 1997) apuntan a que *E. scutalis* es una especie mejor adaptada a climas áridos y cálidos que *E. stipulatus*. Se podría esperar, entonces, que la producción de HSPs en *E. scutalis* sea probablemente mayor que la de *E. stipulatus*. Sin embargo, se supone que la producción de HSP conlleva un elevado coste energético que puede comprometer (*trade-off*) otras funciones en los organismos, como el crecimiento y la reproducción (Krebs & Loeschke 1994, Silbermann & Tatar 2000). En el caso de que este *trade-off* exista, para *E. scutalis* es probable que a temperaturas moderadamente altas (entre 30 y 33°C diurnas, 28.5°C y 31.5°C promedio diario) este coste repercuta principalmente en la producción de huevos, pero no en la supervivencia, ya que en general ésta no fue diferente a estas temperaturas (Fig. 2.4 y 2.5). A temperaturas extremas, sin embargo, la producción de HSPs podría ser fundamental para aumentar la probabilidad de supervivencia de las hembras, con un gran coste para la reproducción (fig. 2.5).

Dentro del contexto del control biológico de plagas en escenarios de cambio climático, uno esperaría que *E. scutalis*, al ser la especie mejor adaptada a las condiciones adversas que se dan en la zona estudiada durante el verano, sea la especie más idónea para su uso como agente de control biológico del ácaro cristalino del aguacate, *O. perseae*. Sin embargo habría que tener en cuenta algunas consideraciones: la primera es que a pesar de que *E. scutalis* sea una especie adaptada a climas más secos y cálidos, la eclosión de los huevos a tales condiciones es muy baja. En las zonas de cultivo del aguacate la humedad relativa durante los veranos llega a menudo a valores cercanos al 30%, lo que podría afectar al reclutamiento generacional de los depredadores y repercutir negativamente en el control de la plaga a lo largo de la temporada de verano. La segunda es que en zonas costeras podrían presentarse problemas para el establecimiento de poblaciones de *E. scutalis*, ya que datos de campo

indican que *E. stipulatus* es posiblemente la especie residente, lo que, como se detalla en el capítulo 4, podría dificultar la capacidad invasora de *E. scutalis*. En este sentido son necesarios ensayos de invasión y de competencia en el laboratorio, para poder predecir qué patrones de invasión y exclusión serían más probables de suceder en el campo, en el caso de diseñar estrategias para el aumento de las poblaciones de *E. scutalis*. Por último, *E. scutalis* no es una especie que se comercialice para el control biológico de plagas, por lo que difícilmente se podría facilitar su invasión mediante la liberación de un elevado número de individuos.

En resumen, la temperatura y la humedad relativa son factores fundamentales para la supervivencia y reproducción de las dos especies estudiadas. Este efecto fue sin embargo diferente entre las dos especies: la temperatura afectó a ambas, pero en mayor medida a *E. stipulatus* que a *E. scutalis*. La humedad relativa tuvo un efecto sobre la tasa de oviposición y supervivencia de las hembras solamente en *E. stipulatus*, aunque en *E. scutalis* sí afectó a la eclosión de sus huevos. Estos resultados indican que *E. scutalis* es una especie mejor adaptada a climas áridos y cálidos que *E. stipulatus*.

Capítulo 3

3. Efecto de las condiciones abióticas en la depredación intragremial entre *E. stipulatus* y *E. scutalis*.

3.1. Material y Métodos

3.1.1 Metodología y condiciones abióticas.

Las unidades de cría de *E. stipulatus* y de *E. scutalis* fueron las mismas que las descritas en el capítulo 1. Las arenas experimentales son similares a las utilizadas en los experimentos del capítulo 2 (ver ANEXO II para detalles del montaje). La única diferencia reside en su diámetro interno, que fue de 6.5 cm. para los experimentos de depredación intragremial, 2.5 cm. mayor que el de las arenas utilizadas en los experimentos anteriores. Estas arenas fueron más grandes porque los experimentos detallados en este capítulo incluyen un número mayor de individuos.

Las condiciones abióticas de temperatura y humedad relativa elegidas para estudiar la depredación intragremial de las dos especies de *Euseius* fueron las que se aproximan más a las condiciones de verano de las áreas donde cada una de las especies se encuentra de forma natural en los cultivos de aguacate de la Axarquía. *Euseius stipulatus* coloniza cultivos de zonas con condiciones abióticas suaves, como las que denominamos “óptimas”, mientras que *E. scutalis* se encuentra en zonas con condiciones abióticas más áridas, tales como las “cálidas-secas” (tabla 3.1). Los experimentos se llevaron a cabo en cámara de condiciones controladas (Fitoclima S 600 PLH) con un fotoperiodo de 16:8 hs de luz:oscuridad.

Tabla 3.1. Combinación de temperatura (°C) y humedad relativa (%) diurnas y nocturnas establecidas para los ensayos de depredación intragremial.

Tratamiento	DÍA		NOCHE	
	Tª	HR	Tª	HR
ÓPTIMAS	25°C	75%	22°C	75%
CÁLIDAS SECAS	30°C	50%	27°C	50%

3.1.2 Depredación intragremial entre *E. stipulatus* y *E. scutalis*

Las hembras de ambas especies utilizadas en estos experimentos, al igual que en experimentos anteriores, provenían de cohortes de 10-14 días de edad, lo que aseguró que se encontraran en su edad fértil y además minimizó la variabilidad entre individuos. Previamente al experimento las hembras fueron sometidas a un ayuno de 16 h para estandarizar el nivel de hambre entre los individuos. En cada arena experimental se situó una hembra (IG-depredador) junto a 10 individuos inmaduros (IG-presa) de 1-3 días de edad desde la eclosión del huevo, tanto en presencia como en ausencia de polen de *Carpobrotus edulis*, el recurso compartido (Tabla 3.2, tratamientos A y B, respectivamente). También se realizaron arenas con 10 IG-presa sin el IG-depredador, tanto en presencia como en ausencia de polen, como controles de su mortalidad natural (Tabla 3.2, tratamientos C y D, respectivamente). Tras 24 h se realizó el recuento de los huevos ovipositados por la hembra (tasa de oviposición), de los individuos IG-presa depredados (tasa de depredación) y de los individuos IG-presa muertos de manera natural (tasa de mortalidad natural). Por último, como control de la oviposición, se realizaron arenas con una hembra IG-depredadora en presencia de polen de *C. edulis* (Tabla 3.2., tratamiento E) y sin polen ni IG-presa (Tabla 3.2, tratamiento F). Estos 6 tratamientos fueron llevados a cabo para cada una de las dos condiciones abióticas, “óptimas” y “cálidas-secas”, y actuando *E. stipulatus* como IG-depredador y *E. scutalis* como IG-presa, y *viceversa*. Se realizaron entre 10-22 réplicas por tratamiento. En todos los tratamientos con polen, éste se suministró *ad libitum*. Como IG-presa se usaron individuos en estadios de larva y de protoninfa (primer y segundo estadio de desarrollo móvil, respectivamente, denominados “juveniles” de aquí en adelante) ya que debido a que presentan menor movilidad, tamaño y capacidad de defensa que los adultos, son más vulnerables a la depredación (Polis et al. 1989).

Tabla 3.2. Combinaciones bióticas presentes en cada uno de los 6 tratamientos realizados. Las tasas de depredación/mortalidad y oviposición se analizaron en todos los tratamientos tanto a condiciones “óptimas” como a “cálidas-secas” y con las dos especies de *Euseius* actuando como IG-depredador y como IG-presa alternativamente.

TRATAMIENTOS	
A: 1 IG-depredador + 10 IG-presa + polen	
B: 1 IG-depredador + 10 IG-presa	
C: 10 IG-presa + polen	
D: 10 IG-presa	
E: 1 IG-depredador + polen	
F: 1 IG-depredador	

3.1.2.1 Análisis de los datos:

El efecto de los factores bióticos y abióticos sobre la mortalidad de los juveniles y sobre la tasa de oviposición se analizó mediante un modelo lineal generalizado (GLM) de 4 factores con una distribución normal del error. Para el análisis de la tasa de depredación/mortalidad solo se incluyeron los cuatro tratamientos en los que había IG-presa (i.e A-D) y los factores fueron: “especie de IG-depredador” (2 niveles *E. stipulatus* y *E. scutalis*), “condición abiótica” (2 niveles óptimas y cálidas-secas), “presencia de IG-depredador” (2 niveles SI-NO) y “presencia de polen” (2 niveles SI-NO). En el análisis de la tasa de oviposición solo se incluyeron los tres tratamientos en los que había IG-depredador (i.e A, B y E y F) y los factores fueron: “especie de IG-depredador” (2 niveles: *E. stipulatus* y *E. scutalis*), “condición abiótica” (2 niveles: óptimas y cálidas-secas), “presencia de IG-presa” (2 niveles: SI-NO) y “presencia de polen” (2 niveles: SI-NO). Cuando fueron necesarias, las comparaciones post-hoc se hicieron con el test de Bonferroni. Los análisis se realizaron con el software de análisis de datos SPSS (IBM SPSS statistics v.19).

3.3. Resultados

3.3.1 Depredación intragremial entre *E. stipulatus* y *E. scutalis*

El análisis de los resultados reveló que las condiciones abióticas no tuvieron un efecto en la mortalidad de los juveniles, ni en la natural ni en la causada por depredación, en ninguna de las dos especies (todas las fuentes de variación que contenían el factor “condición abiótica” fueron no significativas). La intensidad de la depredación intragremial y la mortalidad natural fue similar entre las dos especies (Wald para “especie*presencia IGD”=0.03, g.l.=1, P=0.87), aunque la mortalidad natural de los juveniles (en ausencia del IG-depredador) sí difirió entre especies según presencia o ausencia de polen (Wald para “especie*presencia IGD*polen” = 4.12, g.l.=1, P= 0.042). En efecto, la mortalidad natural de los juveniles de *E. scutalis* no varió en función de si había o no polen, mientras que ésta aumentó significativamente en *E. stipulatus* en ausencia de polen (Fig. 3.2).

Los únicos factores que de manera relevante influyeron en la mortalidad de los juveniles de ambas especies fue la presencia del IG-depredador (Wald para “presencia IGD”=87.34, g.l. =1, P<<0.001) - lo que apunta a que hubo depredación en juveniles hetero-específicos tanto en presencia como en ausencia de polen (Fig. 3.2., comparar primer par de barras con el tercero, y segundo par de barras con el cuarto) - y la presencia de polen (“Wald para “polen”= 68.88, g.l.=1, P<<0.001), que disminuyó considerablemente la tasa de depredación de los IG-depredadores en la IG-presa (Fig. 3.2, comparar primer y segundo par de barras).

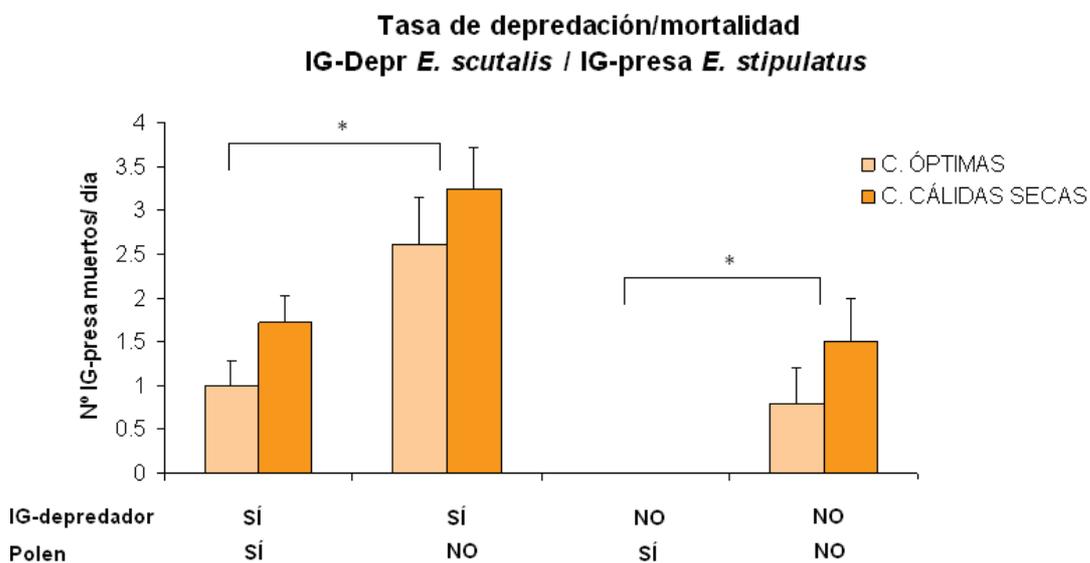
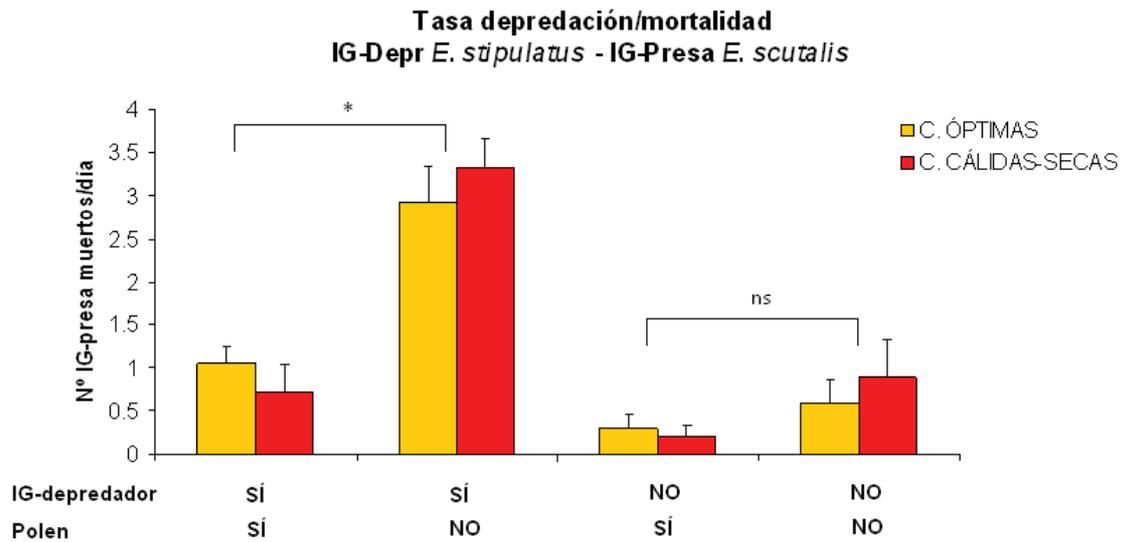


Figura 3.2. Tasa de depredación/mortalidad a ambas condiciones abióticas (leyenda) actuando *E. stipulatus* como IG-depredador y *E. scutalis* como IG-presa (arriba) y viceversa (abajo). Los dos primeros pares de barras corresponden al número de juveniles IG-presa depredadas/día en presencia y ausencia de polen respectivamente. El tercer y cuarto par de barras corresponden a los controles de la mortalidad natural de los juveniles, IG-presa muertas/día en ausencia de depredador, y en presencia y ausencia de polen respectivamente.

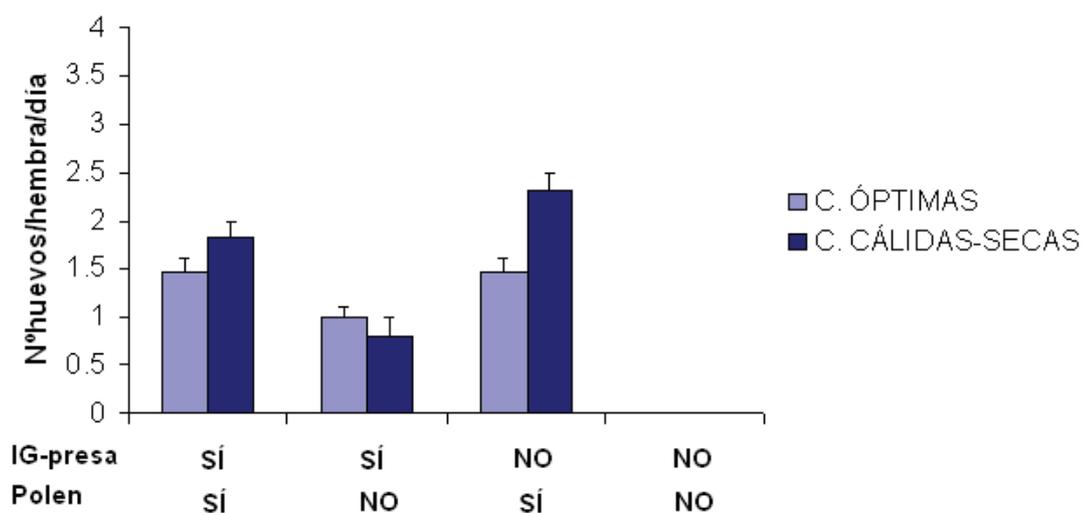
En cuanto a la tasa de oviposición, en general ésta fue, como ya se observó en el capítulo 2, más alta en *E. scutalis* que en *E. stipulatus* (Wald para “especie”= 18.08, g.l = 1, $P < 0.01$). La oviposición en presencia o ausencia de la IG-presa fue distinta según si las hembras dispusieron o no de polen (Wald para “presencia IG-presa*polen”=32.06, g.l.=1, $P < 0.01$), y este efecto fue similar en las dos especies (Wald para “especie*presencia IG-presa*polen”=0.24, g.l.=1, $P=0.62$): en ambas especies la

oviposición de las hembras fue más alta cuando dispusieron de polen que cuando solo se les ofreció IG-presa (Fig. 3.3.).

Un resultado que destaca es que si bien las condiciones abióticas no influyeron en el efecto causado por la presencia de la IG-presa en la tasa de oviposición (Wald para “condición abiótica*presencia de IG-presa”= 1.98, g.l.=1, P=0.16), en ninguna de las dos especies (Wald para “especie*condición abiótica*presencia de IG-presa”= 0.20, g.l.=1, P=0.66), si influyeron en el efecto causado por la presencia del polen (Wald para “condición abiótica*polen”=32.92, P<<0.001), influencia que fue marginalmente diferente entre especies (Wald para “especie*condición abiótica*polen”= 3.73, g.l.=1, P=0.053). En efecto, la tasa de oviposición de *E. scutalis* fue más alta a condiciones “cálidas-secas” que a condiciones “óptimas”, pero solo cuando las hembras dispusieron de polen (Fig. 3.3. panel inferior), efecto que no se observó, o no fue tan acusado, en *E. stipulatus* (Fig. 3.3. panel superior).

En cuanto a los diferentes tratamientos, los IG-depredadores de ambas especies y a ambas condiciones abióticas presentaron una mayor tasa de oviposición cuando se alimentaron de polen que alimentándose solo de la presa intragremial (Fig. 3.3) No hay diferencias en ninguna de las dos especies ni condiciones en la tasa de oviposición con polen solo a la tasa de oviposición con polen y con IG-presa.

Oviposición hembras *E. stipulatus*



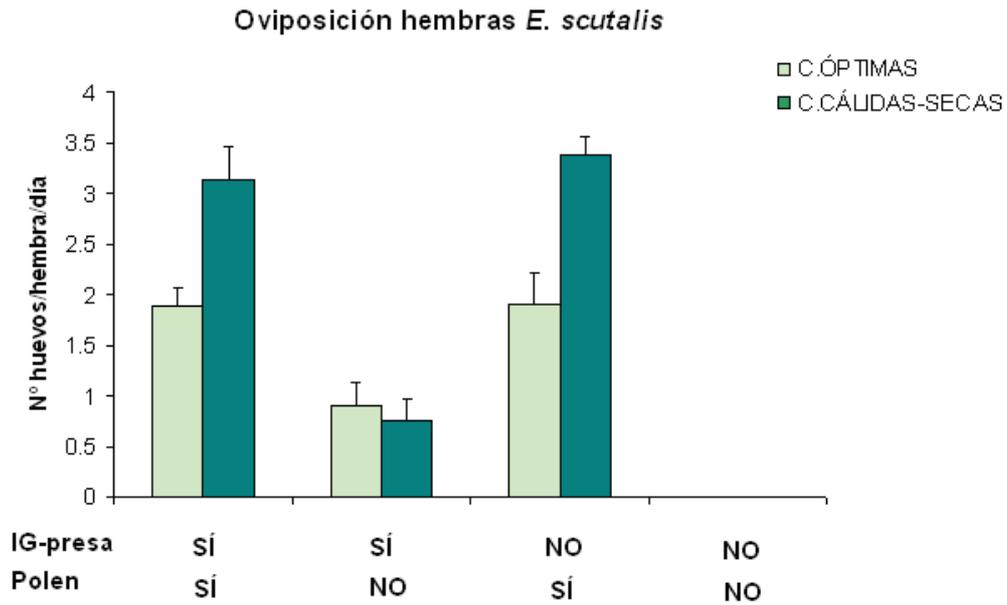


Figura 3.3. Tasa de oviposición del IG-depredador *E. stipulatus* (arriba) y *E. scutalis* (abajo) bajo dos condiciones abióticas (leyenda), en función del tratamiento o tipo de alimento (eje x). En el primer par de barras el alimento fue IG-presa y polen, en el segundo solo IG-presa y en el tercero solo polen.

3.3 Discusión

El objetivo de este trabajo consistió en determinar si las dos especies de *Euseius* de nuestro sistema además de interactuar a través de la competencia también interactúan a través de la depredación, i.e. si el sistema es un sistema con depredación intragremial. Además, se evaluó si las condiciones abióticas influyen en la fuerza y/o dirección de la depredación..

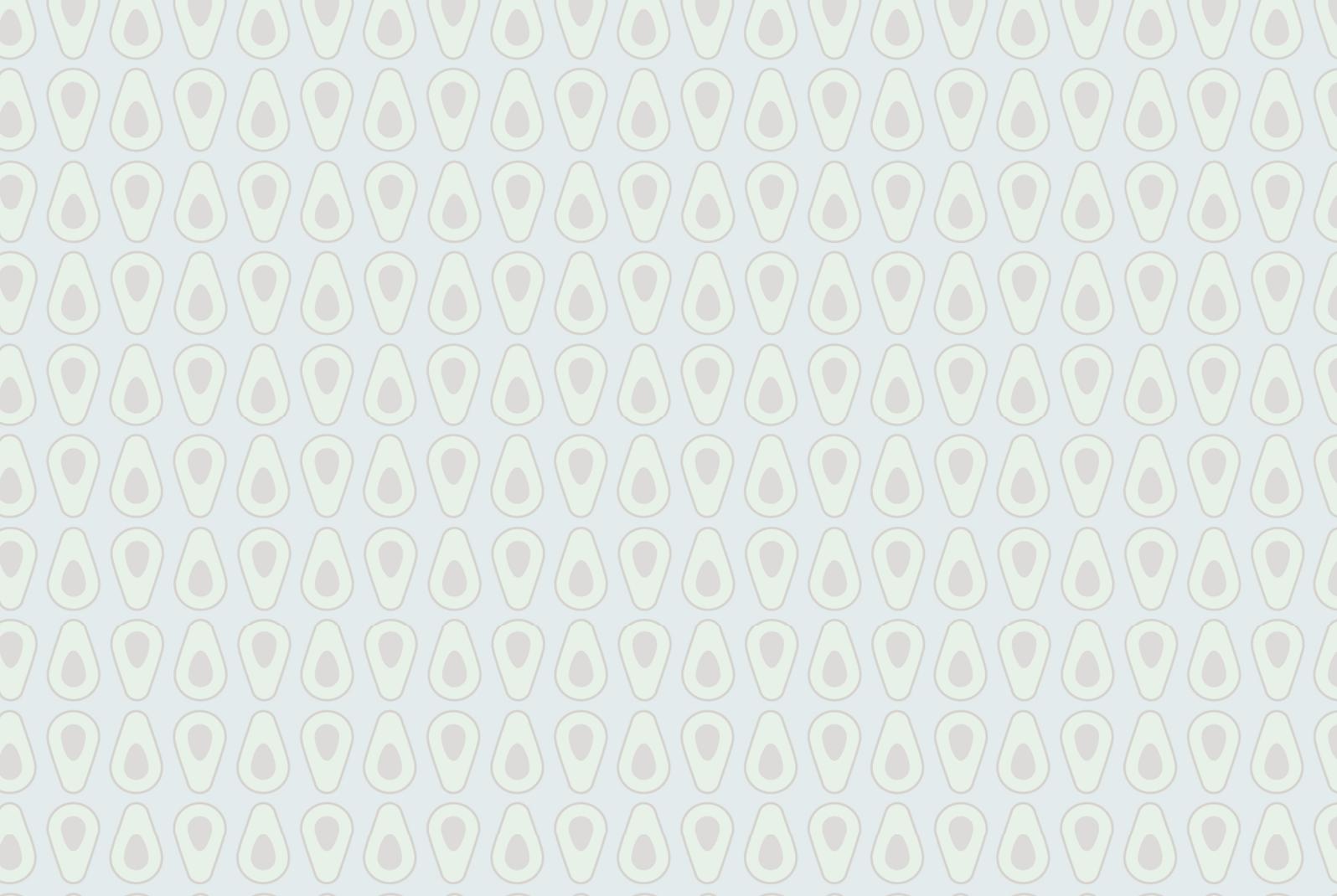
Una primera evaluación de los resultados apunta a que entre *E. stipulatus* y *E. scutalis* existe depredación intragremial recíproca, tanto a condiciones “óptimas” como “cálidas-secas”. La depredación intragremial recíproca es muy común en sistemas tanto terrestres como acuáticos, y se da en sistemas que presentan estructura de edades, frecuentemente en la forma: juveniles de la especie A son depredados por adultos o estadios de mayor tamaño de la especie B, y adultos de la especie A se alimentan de juveniles de la especie B (Polis et al. 1989). En nuestro sistema la tasa de depredación/mortalidad se vio afectada por la presencia de IG-depredador y por la presencia de polen, no hallándose diferencias en dicho parámetro ni entre especies de IG-depredador ni entre condición abiótica. Es decir, la magnitud de la depredación es similar entre ambas especies y a ambas condiciones abióticas. Sin embargo, el número de juveniles muertos cuando las hembras dispusieron también de polen fue similar al del tratamiento sin IG-depredadores ni polen (Fig 3.2, comparar primer par de barras con el cuarto par de barras). Este resultado pone en duda si la causa de la mortalidad de los juveniles en presencia de polen fue directa (depredación) o indirecta (competencia por interferencia, i.e. la presencia del IG-depredador dificultó el acceso de los juveniles al polen). Aunque la IGP entre especies de la familia *Phytoseiidae* es muy frecuente (MacRae & Croft 1997, Schausberger 1999, Schausberger & Croft 2000, Hatherly et al. 2005, Onzo et al. 2005, Montserrat et al 2006, Abad Moyano et al. 2010, Buitenhuis et al. 2010), es también muy común que los fitoseidos reduzcan considerablemente el ataque a la IG-presa cuando disponen de su alimento favorito, el polen (van Rijn et al. 2002, Onzo et al. 2005). En nuestro caso, no queda claro si es simplemente una reducción o si es un cambio de dieta (de presa animal a polen). En otros sistemas con fitoseidos sí se da depredación intragremial de forma clara, incluso sin que exista variación en la tasa de depredación en presencia o ausencia del recurso compartido, como es el caso del sistema en el que el IG-depredador *Iphiseius degenerans*, un IG-

depredador muy voraz, se alimenta de larvas de *Neoseiulus cucumeris* (Montserrat et al. 2008).

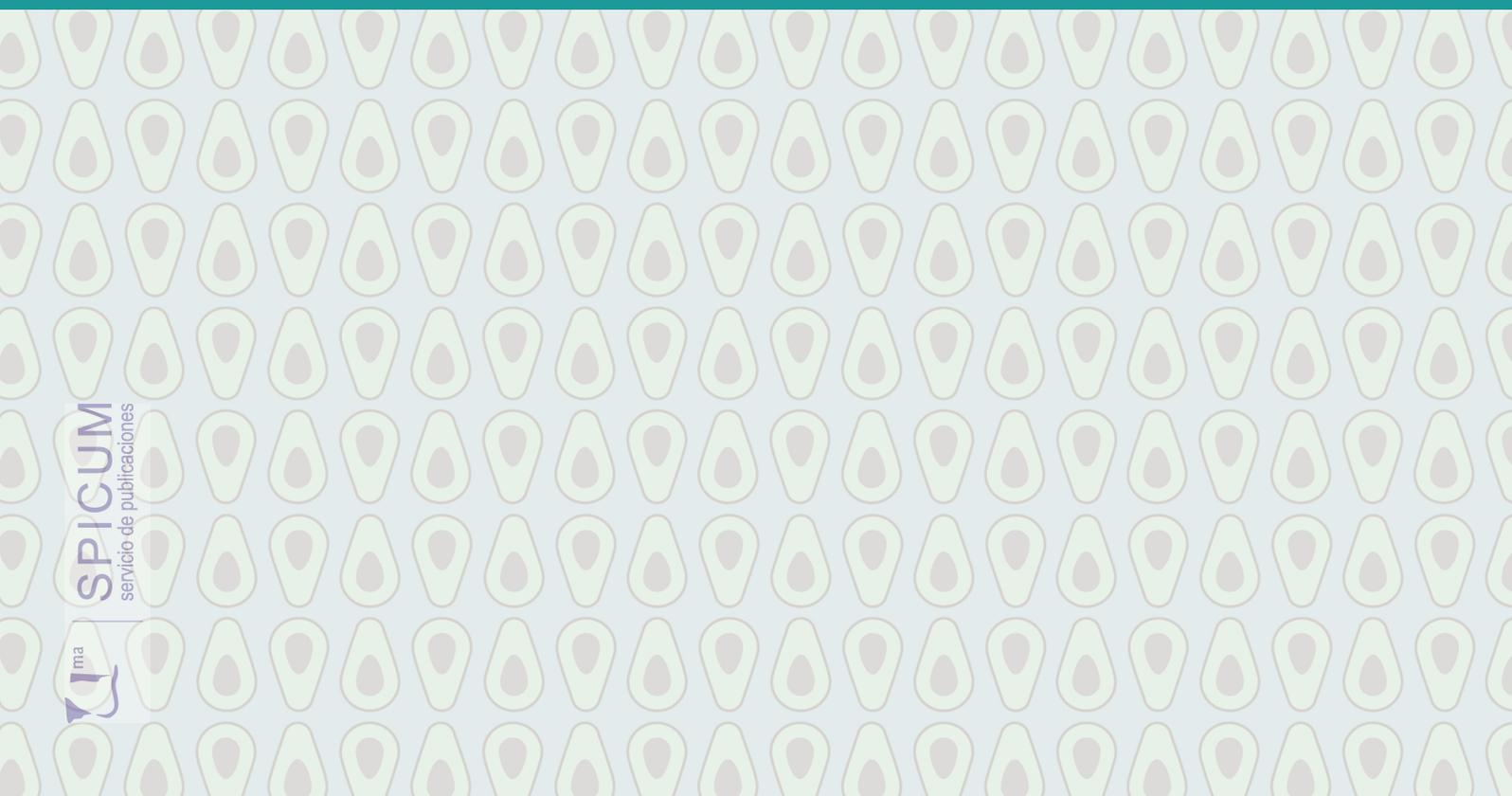
Por otro lado sobre la tasa de oviposición hay influencia de los cuatro factores analizados, “especie de IG-depredador”, “condición abiótica”, “presencia de IG-presa” y “presencia de polen”. Este es un resultado esperado, ya que como se determinó en el capítulo 2 de esta tesis doctoral, la tasa de oviposición de *E. scutalis* es mayor en todas las condiciones abióticas ensayadas. En ese capítulo además se determinó que hay un efecto de la temperatura y de la temperatura y la humedad relativa en las tasas de oviposición de *E. scutalis* y *E. stipulatus* respectivamente.

Los IG-depredadores de ambas especies presentaron una mayor tasa de oviposición cuando se alimentaron de polen que alimentándose solo de la presa intragremial. Además el alimento mixto (IG-presa y polen) no se tradujo en una mayor tasa de oviposición. Esto demuestra que el beneficio energético que los individuos obtienen del polen es mucho mayor que el que obtienen de la IG-presa. El polen es un alimento óptimo para el desarrollo de ambas especies de *Euseius*, como ya pusieron de manifiesto McMurtry & Croft (1997) al catalogar estas especies como ácaros generalistas de tipo IV especializados en polen, alimento con el que muchas de las especies de este género obtienen su mayor potencial reproductivo (Abou-Setta & Childers, 1987, 1989; Ferragut et al. 1987, McMurtry & Rodríguez 1987, Abdallah et al. 2001) En base a este resultado se podría pensar que una estrategia de control biológico de conservación, en la que se realice un suplemento de polen en los cultivos de aguacate, podría beneficiar a las poblaciones de ácaros fitoseidos. Esta hipótesis se comprobó como efectiva en los trabajos llevados en nuestra zona de estudio detallados en el capítulo 1 de esta tesis (Montserrat et al. 2013b) y en González-Fernández et al. (2009), en los que se determinó que la pulverización de polen comercial disuelto en agua sobre los árboles de aguacate y la adición de polen de maíz liberado por plantas intercaladas entre los cultivos de aguacate respectivamente conducía a un incremento de la población de ácaros fitoseidos.

El conocimiento de las interacciones de competencia y/o depredación entre *E. scutalis* y *E. stipulatus* y el efecto que sobre ellas tienen las condiciones abióticas es una herramienta importante a la hora de poder explicar la distribución de estas dos especies en nuestra área de estudio, como se verá en el capítulo 4. Además constituye un avance más en la comprensión de las relaciones que se dan entre las especies de ácaros fitoseidos depredadores del agro-ecosistema del aguacate.



Capítulo 4



4. Estudio de la capacidad competitiva de *E. stipulatus* y *E. scutalis* en función de las condiciones abióticas.

4.1 Material y Métodos

4.1.1 Metodología y condiciones abióticas:

Los individuos de *E. stipulatus* y de *E. scutalis* utilizados para los experimentos detallados en este capítulo provienen de unidades de cría que fueron realizadas y mantenidas según se describió en el capítulo 1 de la presente tesis.

Las arenas experimentales utilizadas para los experimentos de dinámica de poblaciones de este capítulo se componen, al igual que las detalladas en el capítulo 2, de un aro de plástico con su borde interno recubierto de plastilina, sobre la cual se adhirió un disco de hoja de aguacate limpio, se selló con tanglefoot® y se cerró con parafilm®. En este caso el diámetro interno de las arenas es de 12 cm, un área mayor que el de las arenas utilizadas a nivel individual, ya que han de sostener poblaciones que pueden llegar a alcanzar los 600 individuos (incluyendo huevos). Como soporte para los huevos se dispuso un fragmento de algodón pegado al disco de hoja, y en lugar de espuma floral se utilizó un disco de esponja cubierto de algodón para mantener la turgencia de la hoja.

Las condiciones abióticas de temperatura y humedad relativa elegidas para estudiar la habilidad competitiva de las dos especies de *Euseius* fueron las mismas que las utilizadas en los experimentos de depredación intragremial del capítulo 3, que son las que más se aproximan a las de las áreas costeras (condiciones “óptimas”) y de interior (condiciones “cálidas-secas”) (Tabla 4.1) de nuestra zona de estudio. Como se mencionó anteriormente, los muestreos de campo parecen indicar que *E. stipulatus* coloniza cultivos de aguacate de zonas con condiciones abióticas suaves, como las que denominamos “óptimas”, mientras que *E. scutalis* se encuentra asociado a cultivos con condiciones abióticas más áridas, tales como las “cálidas-secas” (comunicación personal JR. Boyero, J.M Vela, E. Wong, 2009, IFAPA Churriana, Málaga).

Todos los experimentos se llevaron a cabo en cámara de condiciones controladas (Fitoclima S 600 PLH) con un fotoperiodo de 16:8 h de luz:oscuridad.

Tabla 4.1. Combinación de temperatura (°C) y humedad relativa (%) diurnas y nocturnas establecidas para los experimentos control y para los experimentos de competencia.

Condiciones abióticas	DÍA		NOCHE	
	Tª	HR	Tª	HR
ÓPTIMAS	25°C	75%	22°C	75%
CÁLIDAS SECAS	30°C	50%	27°C	50%

4.1.2 Efecto de las condiciones abióticas en la capacidad de explotación del recurso de *E. stipulatus* y *E. scutalis*.

El objetivo de estos ensayos fue determinar si la capacidad de explotación de un recurso, i.e. el polen de *Carpobrotus edulis*, por parte de *E. stipulatus* y de *E. scutalis* difiere según las condiciones abióticas, y si esa diferencia iría asociada a un cambio en la identidad del competidor superior. Para ello se evaluó la dinámica poblacional de las dos especies por separado, a dos condiciones abióticas, “óptimas” y “cálidas-secas” (tabla 4.1), y a dos niveles de productividad del recurso, baja (0.8 mg de polen) y alta (4.8 mg de polen) suministrado 2 veces por semana. Se realizaron 3 réplicas en cada tratamiento, excepto en uno de ellos en el que una réplica se malogró (ver más abajo). Al inicio del experimento, en cada arena experimental se colocaron 10 hembras fecundadas (de 10-14 días de edad desde la eclosión del huevo) de una u otra especie. Dos veces por semana se realizaron recuentos del número total de individuos (i.e. número de hembras, juveniles, larvas y huevos), y después de cada recuento se suministró una nueva dosis de polen. Después de 33-34 días desde el inicio (entre 6 y 8 generaciones, según condiciones abióticas) todas las poblaciones alcanzaron un umbral numérico, por lo que se finalizaron los experimentos. Las arenas se renovaron cuando el disco de hoja empezaba a mostrar síntomas de marchitamiento. En cada renovación se realizó el traspaso de todos los individuos (de forma individual mediante un pincel, con sumo cuidado para no dañar a los individuos) y del algodón a la nueva arena.

4.1.2.1 Análisis de los datos:

Los datos de cada una de las productividades fueron analizados mediante Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM) de 3 factores, con una distribución del error binomial negativa, usando “especie” y “condición abiótica” como factores fijos, “tiempo” (fecha de muestreo) como factor aleatorio y número total de individuos como

variable dependiente. Para evitar ruido de cuantificación que pudiera ser causado por la dinámica transitoria de las fases iniciales del crecimiento poblacional, solo los datos de los últimos 6 muestreos de la serie temporal, que se corresponden con el momento en que las poblaciones alcanzaron el umbral numérico, fueron incluidos en los análisis. Las diferencias entre especies a cada condición abiótica fueron analizadas con contrastes de desviación pareados, en los cuales se compara la abundancia de cada especie con la abundancia total (diferencia significativa mínima a un nivel de significación de 0.05)

4.1.3 Competencia interespecífica y patrones de exclusión. Efecto de las condiciones abióticas en la estructura de la comunidad.

Para determinar si la relativa habilidad competitiva entre las dos especies de fitoseidos varía según la condición abiótica, lo que en último término determinaría qué especie eliminaría a la otra, se llevaron a cabo experimentos de dinámica poblacional con las dos especies juntas en la misma arena. Las condiciones abióticas ensayadas fueron las mismas que las detalladas en los experimentos con cada especie por separado, i.e. “óptimas” y “cálidas-secas”.

En cada arena experimental se colocaron 10 hembras fecundadas de *E. stipulatus* y 10 hembras fecundadas de *E. scutalis* provenientes de cohortes de 10-14 días. Dos veces por semana se realizaron recuentos del número total de individuos, i.e. hembras, juveniles, larvas y huevos, durante un período de 40-43 días. Solo se utilizó el nivel de productividad alto (4.8 mg de polen de *C. edulis*) ya que al alcanzar las poblaciones valores numéricos más altos, de haber diferencias éstas se observarían de manera más clara.

Debido a que ambas especies son morfológicamente muy similares y resulta imposible distinguirlas bajo lupa binocular, se diseñó un método de muestreo que permitiera identificar a los individuos de cada especie sin interferir con la dinámica de la comunidad: los experimentos comenzaron con 12 y 13 réplicas para las condiciones “óptimas” y “cálidas-secas”, respectivamente. A los 14, 21, y 43 días desde el inicio del experimento para condiciones “óptimas”, y a los 7, 14, 21 y 40 días para condiciones “cálidas-secas”, grupos de 3 o 4 réplicas por tratamiento fueron sometidos a un recuento de tipo destructivo (Fig. 4.1), donde, por un lado, todos los adultos se recogieron y se prepararon para su identificación bajo microscopio óptico. Por otro lado, los juveniles (formas móviles y huevos) se transfirieron individualmente a discos de hoja de aguacate

de 1.5 cm de diámetro, colocados sobre una pieza de algodón en recipientes de plástico de 5 cm de diámetro con agua. En estos recipientes, y a condiciones controladas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ y 16:8 luz:oscuridad, se les alimentó con polen de *C. edulis* hasta que llegaron a adulto, cuando se prepararon para ser identificados. Debido a que no todos los juveniles y huevos individualizados sobrevivieron hasta la fase de adulto, se usó el porcentaje de individuos que sobrevivieron para estimar, a partir del número total obtenido en el recuento *in situ*, el número de juveniles por especie en cada réplica en la correspondiente fecha de muestreo. Este número estimado de juveniles, sumado al número de adultos identificados previamente, nos dio el número total de individuos de cada especie existente en cada fecha de muestreo.

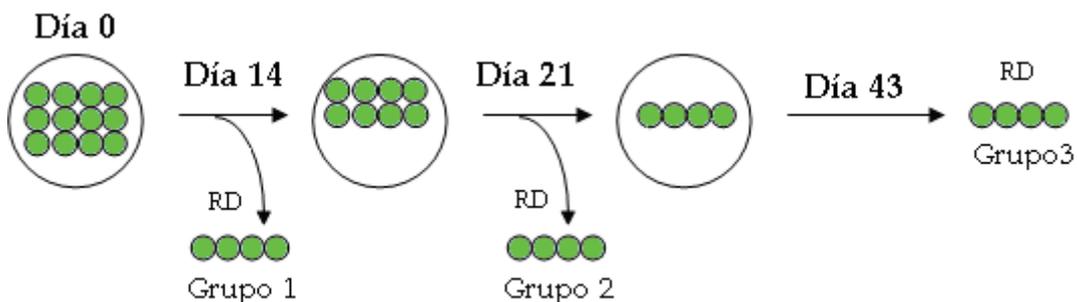


Figura 4.1. Esquema del diseño muestral de los experimentos. Se comenzó con un número elevado de réplicas (12 en el esquema), a las que se les realizaron dos recuentos semanales del número de individuos. A lo largo del tiempo, se realizó el recuento destructivo (RD) de algunas de las réplicas (grupos de entre 3 y 4) para realizar la identificación taxonómica de los individuos. De esta manera no se interfirió con la dinámica de la comunidad, que se siguió evaluando en el resto de las réplicas. Al final del experimento se realizó el RD de las réplicas que quedaban.

La identificación taxonómica de los ácaros fitoseidos adultos la llevó a cabo la Dra Ernestina Aguilar-Fenollosa, del Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural de la Universitat Jaume I. Para ello siguió el protocolo descrito en Gutiérrez (1985). Primero realizó una digestión de las partes blandas con ácido láctico al 65%, dejando únicamente la cutícula y permitiendo que el cuerpo se expandiera y se extendieran las patas para una mejor observación de las características morfológicas que permiten la identificación. Posteriormente realizó el montaje permanente en portaobjetos con medio Hoyer. La identificación a nivel de especie se realizó en un microscopio de contraste de fases en base al número, longitud, posición y morfología de las setas de las placas dorsal y ventral, y en la morfología de la espermateca de las hembras (Ferragut et al. 2010).

4.1.4 Superioridad competitiva dependiente de las condiciones abióticas

Los datos de dinámica de poblaciones a alta productividad de cada especie, tanto cuando estaban solas como en presencia de la otra especie, y a cada condición abiótica (“óptimas” y “cálidas-secas”), se ajustaron a una función de regresión logística, definida como:

$$N_i(t) = \frac{k_i}{1 + \left(\frac{k_i - N_0}{N_0}\right)e^{-rt}}$$

donde i se refiere a una especie o a la otra, $N_i(t)$ al número total de individuos (adultos, juveniles y huevos), r_i a la tasa de crecimiento de cada población, t al tiempo (días) y N_0 al número inicial de individuos de cada especie (i.e. 10). En los tratamientos en los que cada especie estaba sola, k_i se consideró una estimación de la capacidad de carga, K_i , de cada especie a cada condición abiótica; en los tratamientos donde las dos especies se encontraban juntas, k_i se consideró un estimador del impacto relativo de la competencia intraespecífica vs interespecífica, equivalente a $K_i/\alpha_{i,j}$ en el modelo clásico de competencia entre 2 especies de Lotka-Volterra (L-V) (Volterra 1926, Lotka 1932). En el análisis con cada población sola se incluyeron los datos de todas las fechas de muestreo, pero cuando las dos poblaciones se encontraron juntas solo se incluyeron los datos de las fechas en las que se llevaron a cabo los muestreos destructivos, ya que las abundancias de cada especie se estimaron a partir de éstos. Los valores estimados de k_i , $\alpha_{i,j}$ y r_i , se usaron para simular y predecir, usando el modelo de L-V de competencia entre dos especies (ver abajo), el resultado final de la comunidad cuando el número inicial de cada especie varía de 1 a 10, para imitar las condiciones de nuestro experimento asumiendo posibles pérdidas de individuos debidas a causas aleatorias.

$$\frac{dN_1}{dt} = r_1 N_1 \left(\frac{k_1 - N_1 - \alpha_{12} N_2}{k_1} \right) \quad \frac{dN_2}{dt} = r_2 N_2 \left(\frac{k_2 - N_2 - \alpha_{21} N_1}{k_2} \right)$$

4.2 Resultados

4.2.1 Efecto de las condiciones abióticas en la capacidad de explotación del recurso de *E. stipulatus* y *E. scutalis*.

Las diferencias en los niveles poblacionales de ambas especies fueron dependientes de las condiciones abióticas (Wald para “especie*condición abiótica” = 56.82, g.l= 1;66, $P \ll 0.001$). A condiciones “óptimas” ambas especies explotaron el recurso de manera similar, alcanzando las poblaciones niveles similares a ambas productividades (Fig. 4.2 superior, ver también tabla 4.2 para el valor de K a alta productividad). Como era de esperar los niveles poblacionales fueron mayores a productividad alta que a productividad baja para ambas especies (Fig. 4.2 superior). Sin embargo, a condiciones “cálidas-secas” se observó que *E. scutalis* alcanzó niveles de población superiores a los alcanzados por *E. stipulatus* a ambas productividades estudiadas (Fig. 4.2 inferior). De hecho, la abundancia de *E. scutalis* no se vio afectada por las condiciones abióticas (comparar líneas azules en los paneles inferior y superior de la fig. 4.2.). Estos resultados parecen indicar que a condiciones “óptimas” las dos especies de *Euseius* poseen similar capacidad de explotación del recurso, mientras que a condiciones “cálidas-secas” *E. scutalis* es capaz de explotar el recurso de manera más eficaz que *E. stipulatus*. Esto nos llevó a plantear la hipótesis de que en los experimentos de competencia, con ambas especies juntas, a condiciones “cálidas-secas” *E. scutalis* debería excluir siempre a *E. stipulatus*. A condiciones “óptimas”, sin embargo, el resultado de dicha interacción no está claro.

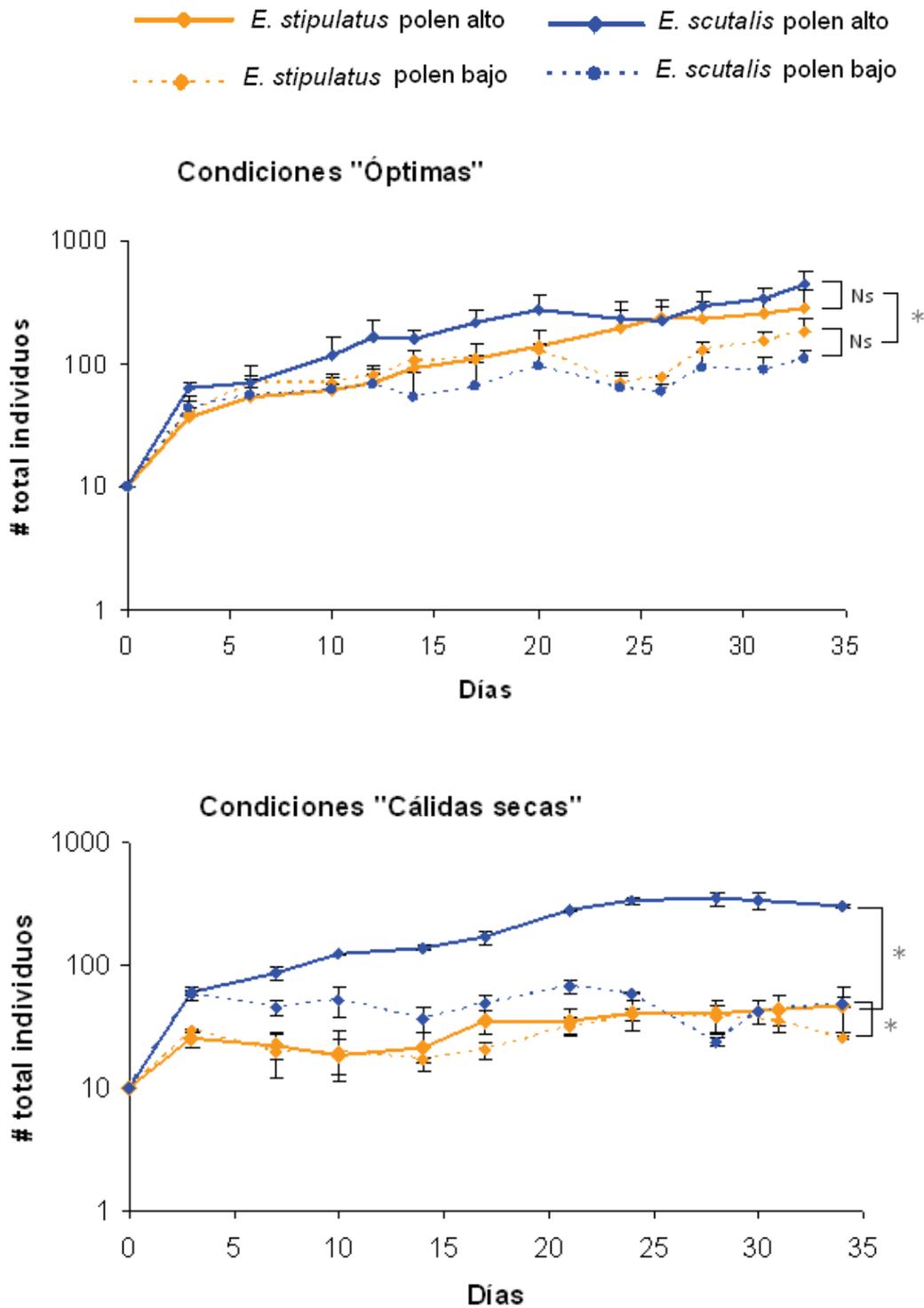


Figura 4.2. Dinámica de poblaciones de *E. stipulatus* y *E. scutalis* en los experimentos con cada especie por separado, a cada condición abiótica ("óptimas" arriba y "cálidas-secas" abajo) y a las dos productividades ensayadas (ver leyenda). Cada punto corresponde con el promedio del número total de individuos \pm error estándar ($n=2-3$). Se señalan diferencias no significativas con Ns y significativas con asterisco (*).

4.2.2 Competencia interespecífica y patrones de exclusión. Efecto de las condiciones abióticas en la estructura de la comunidad.

La dinámica de la comunidad formada por individuos de las dos especies de *Euseius*, *E. stipulatus* y *E. scutalis*, alcanzó al finalizar el experimento valores poblacionales similares a condiciones “óptimas” y a condiciones “cálidas-secas” (Fig. 4.3). Sin embargo, el umbral poblacional se alcanzó antes a condiciones “óptimas” (a partir del día 25) que a condiciones “cálidas-secas” (a los 37 días) (Fig. 4.3).

El porcentaje de cada especie determinado tras la identificación taxonómica a lo largo de la dinámica a condiciones “óptimas” (Fig. 4.4 izquierda) parece indicar una coexistencia entre ambas especies. Sin embargo, los datos de cada réplica por separado al finalizar el experimento (Fig. 4.5, recuento destructivo del día 43) mostraron cierta variabilidad entre réplicas. Por ejemplo, en la réplica 12 *E. scutalis* es la especie que domina, mientras que en el resto de réplicas (9,10 y 11) es *E. stipulatus* la especie más abundante.

A condiciones “cálidas-secas” se observó que *E. scutalis* fue excluyendo a *E. stipulatus* a medida que avanzaba el tiempo (Fig. 4.4 derecha). La dinámica de la comunidad fue consistente entre réplicas, con *E. scutalis* excluyendo a *E. stipulatus* en todas ellas: al finalizar el experimento más del 90% de los individuos eran *E. scutalis* (Fig. 4.6, réplicas 10,11, 12 y 13).

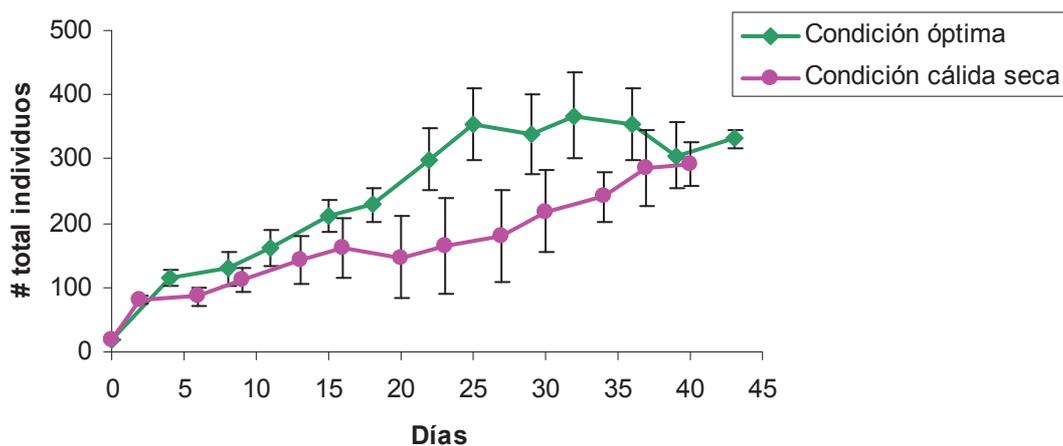


Figura 4.3. Dinámica de comunidad de las dos especies de *Euseius* juntas a dos condiciones abióticas (ver leyenda). Solo se representa la dinámica del último grupo de réplicas, ya que es el que se encuentra completo hasta el final del experimento (40-43 días). Cada punto corresponde con el promedio del número total de individuos de cada réplica ($n=4$) \pm error estándar.

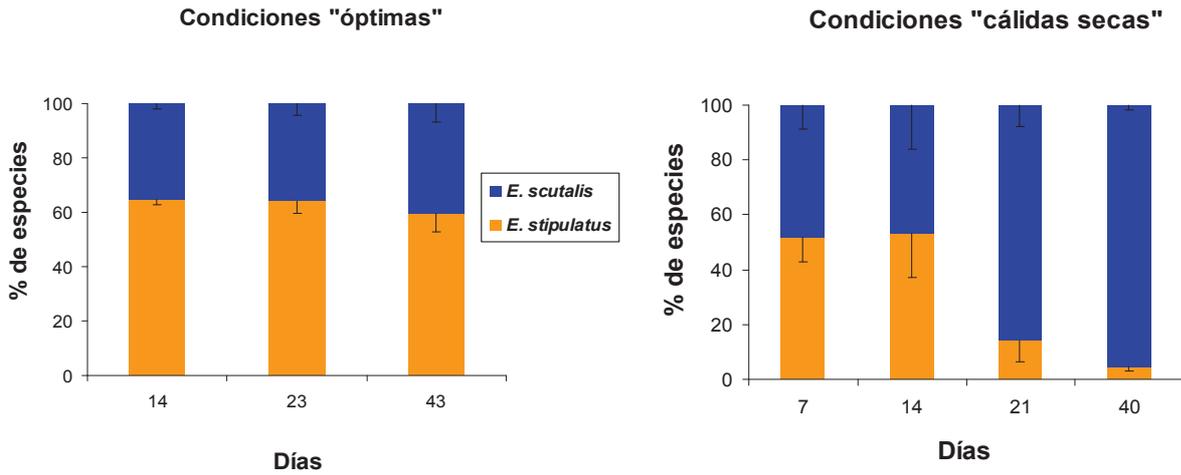


Figura 4.4. Porcentaje de individuos de cada especie (ver leyenda) determinados tras la identificación taxonómica en cada recuento destructivo, a condiciones “óptimas” y “cálidas secas”. En el eje X se representan los días en los que se realizaron los recuentos destructivos. Cada barra representa el promedio de los porcentajes de cada especie y el error estándar (n=3-4)

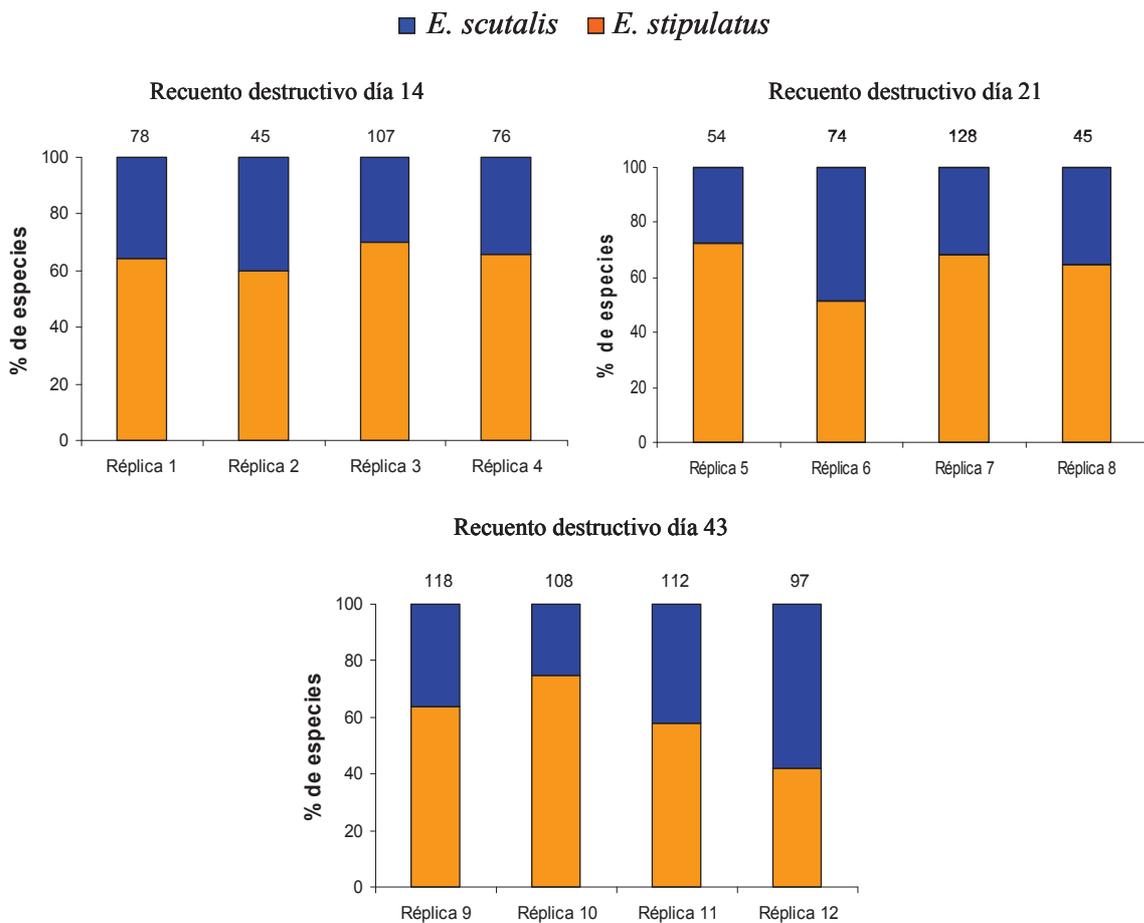


Figura 4.5. Porcentaje de individuos de cada especie (ver leyenda) en cada réplica, determinados tras la identificación taxonómica en cada recuento destructivo a condiciones “óptimas”. El número que aparece sobre las barras corresponde al número total de individuos identificados en cada réplica.

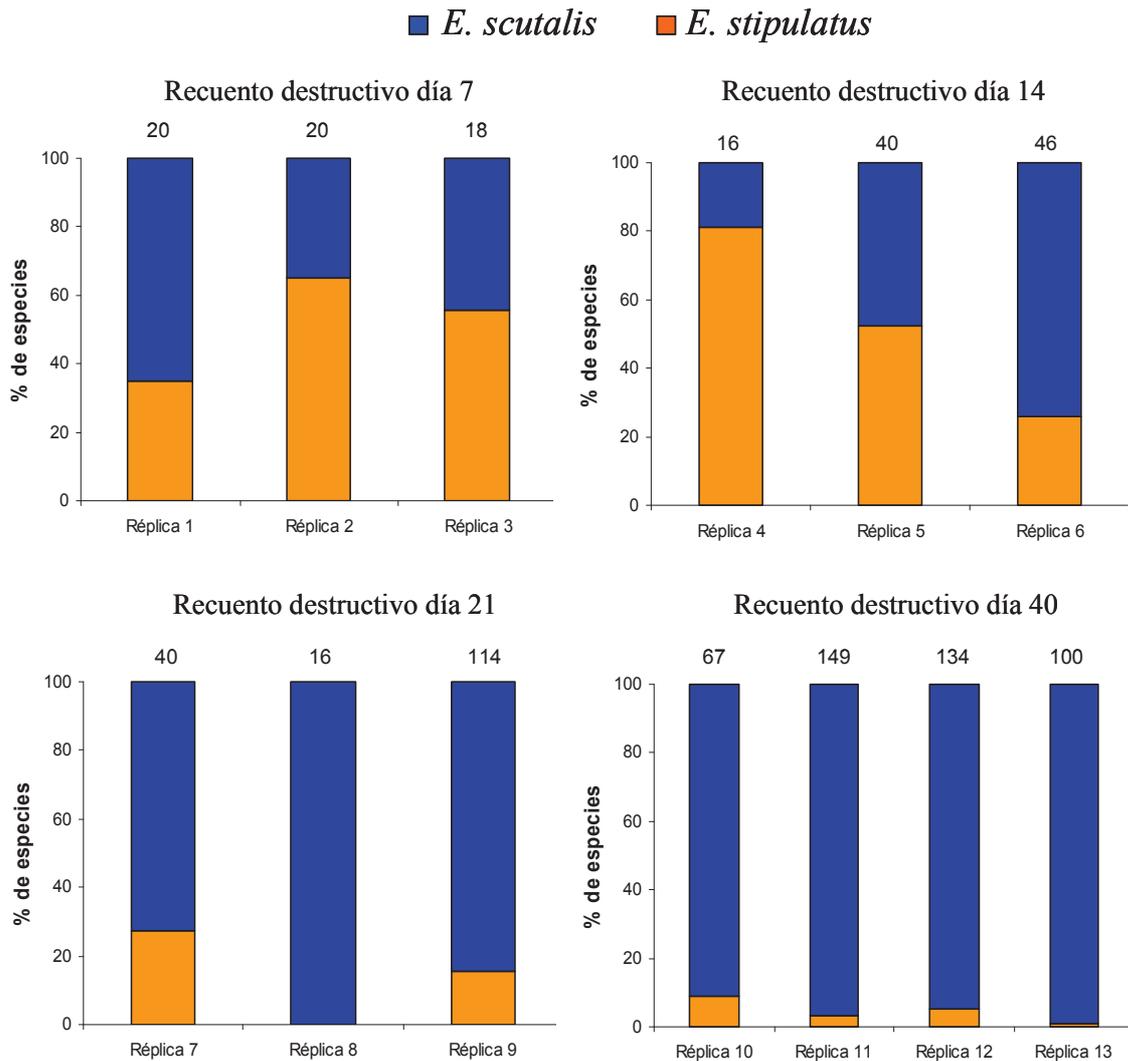


Figura 4.6. Porcentaje de individuos de cada especie (ver leyenda) en cada réplica realizada, determinados tras la identificación taxonómica en cada recuento destructivo a condiciones “cálidas-secas”. El número que aparece sobre las barras corresponde al número total de individuos identificados en cada réplica.

4.2.3 Predicciones mediante el modelo de competencia de Lotka-Volterra

Todas las series temporales se ajustaron bien a la ecuación logística, y todos los parámetros estimados resultaron significativos (Tabla 4.2). Los valores estimados de K_i y $K_i/\alpha_{i,j}$ para cada especie variaron en función de las condiciones abióticas (Fig. 4.7a). A condiciones óptimas, los efectos de la competencia interespecífica fueron más fuertes que los efectos de la competencia intraespecífica en las dos especies, lo que, según el modelo de L-V, daría lugar a un escenario con dos equilibrios estables donde las condiciones iniciales determinarían qué especie dominaría y excluiría a la otra (Fig. 4.7a. izquierda). Las simulaciones con el modelo de competencia interespecífica de Lotka-Volterra, en las se imitó una variabilidad experimental inicial que podría ser

debida a efectos aleatorios, revelaron que a condiciones óptimas el resultado final de la interacción es muy sensible a pequeñas diferencias en el número inicial de individuos de las dos especies (Fig. 4.7b, izquierda). A condiciones “cálidas-secas” en el escenario resultante y en las simulaciones *E. scutalis* siempre excluye a *E. stipulatus* (Fig. 4.7a. y 4.7b, derecha).

Tabla 4.2: Resultados del ajuste de los datos a la ecuación logística a productividad alta para ambas condiciones, y en cada una de ellas, para cada especie cuando estaban por separado y cuando estaban juntas.

Condiciones óptimas. Experimentos con cada especie por separado

E. stipulatus (especie 1)

	Estimado	Error estándar	t-valor	P
K_1	298.85	60.94	4.90	<0.001
r_1	0.17	0.02	6.70	<0.001

E. scutalis (especie 2)

	Estimado	Error estándar	t-valor	P
K_2	321.97	35.15	9.160	<0.001
r_2	0.25	0.034	7.27	<0.001

Condiciones óptimas. Experimentos con las dos especies juntas

E. stipulatus (especie 1)

	Estimado	Error estándar	t-valor	P
$K_1/\alpha_{1,2}$	184.43	18.53	9.95	<0.001
r_1	0.29	0.06	5.20	<0.001

E. scutalis (especie 2)

	Estimado	Error estándar	t-valor	P
$K_2/\alpha_{2,1}$	119.45	13.92	8.58	<0.001
r_2	0.20	0.04	5.55	<0.001

Condiciones cálidas-secas. Experimentos con cada especie por separado

E. stipulatus (especie 1)

	Estimado	Error estándar	t-valor	P
K_1	49.78	11.75	4.24	<0.001
r_1	0.11	0.04	2.96	0.006

E. scutalis (especie 2)

	Estimado	Error estándar	t-valor	P
K_2	344.07	17.30	19.88	<0.001
r_2	0.23	0.014	16.70	<0.001

Condiciones cálidas-secas. Ambas especies juntas

E. stipulatus (especie 1)

	Estimado	Error estándar	t-valor	P
$K_1/\alpha_{1,2}$	18.09	2.81	6.43	<0.001
r_1	0.70	1.56	0.45	0.66

E. scutalis (especie 2)

	Estimado	Error estándar	t-valor	P
$K_2/\alpha_{2,1}$	342.63	92.00	3.72	0.004
r_2	0.12	0.02	4.69	<0.001

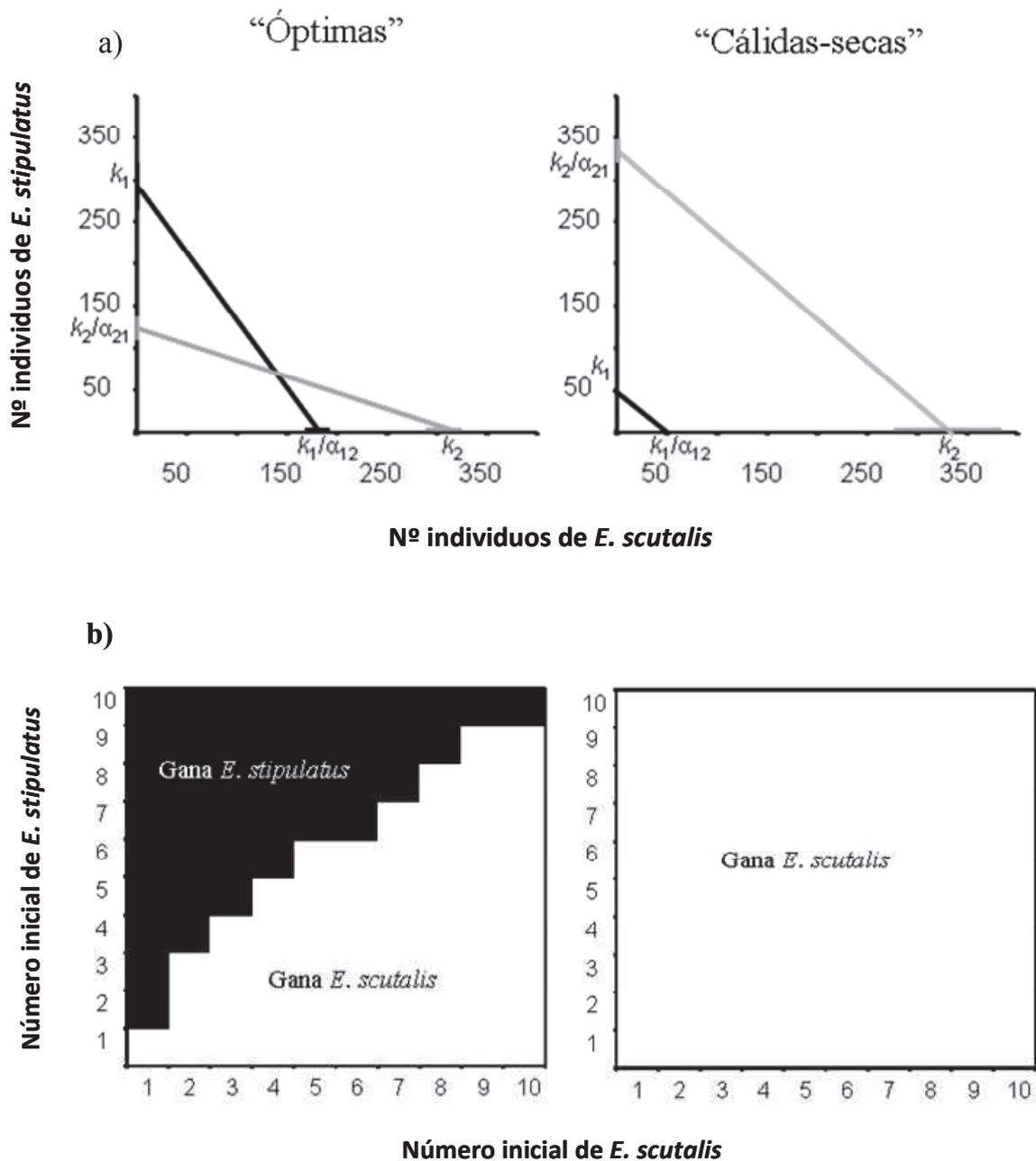


Figura 4.7. a) Escenarios esperados a partir de los valores estimados de k_i y α_{ij} para cada especie según el modelo de competencia de L-V para los datos de abundancia de las poblaciones de ambas especies y a ambas condiciones abióticas (“óptimas” a la izquierda y “cálidas-secas” a la derecha). En el caso de la izquierda hay dos equilibrios estables en K_1 y K_2 y un equilibrio inestable donde las dos líneas se cruzan. El que el sistema se mueva hacia K_1 o hacia K_2 depende de las condiciones iniciales. En el caso de la derecha solo hay un equilibrio estable, K_2 b) Resultado de las simulaciones en las que se imitó una posible variabilidad experimental inicial debida a efectos aleatorios.

4.3 Discusión:

En este trabajo se estudió, mediante experimentos de laboratorio, si la superioridad competitiva en la explotación de un recurso puede ser mediada por las condiciones abióticas.

En los experimentos de dinámica de poblaciones con cada especie por separado se determinó que a condiciones “óptimas” ambas especies parecen explotar el recurso con similar eficiencia, ya que ambas alcanzaron niveles poblacionales similares. Esto planteó dudas a la hora de predecir qué especie debería dominar en ambientes caracterizados por unas condiciones abióticas suaves, como las “óptimas”. En el campo, según datos proporcionados por J.R Boyero, J.M Vela y E. Wong (en Guzmán et al., en preparación), en nuestra área de estudio en los cultivos de aguacate de zonas con clima suave la especie dominante es *E. stipulatus*, no habiéndose encontrado nunca a *E. scutalis*. Esta observación no concuerda con los resultados de los ensayos de competencia interespecífica a condiciones “óptimas”, en los que las dos especies coexistieron a lo largo del experimento (Fig. 4.4 izquierda). Esta claro, pues, que la ausencia en el campo de *E. scutalis* en zonas de clima suave necesita una explicación. Primero si se observa por separado cada réplica del último recuento destructivo (Fig. 4.5), cuando según la figura 4.3. las poblaciones estaban en su umbral poblacional, se aprecia una cierta variabilidad en la dominancia (en tres réplicas la especie dominante es *E. stipulatus* mientras que en una la que domina es *E. scutalis*). Por otro lado, según los valores estimados a partir de los experimentos de K_i y $K_i/\alpha_{i,j}$, el escenario predicho por el modelo de competencia de L-V a condiciones “óptimas” sería aquél en el que la especie dominante viene determinada por las condiciones iniciales del sistema. Según nuestras simulaciones, el sistema es tan sensible a pequeñas variaciones numéricas iniciales que si las dos especies invadiesen los espacios simultáneamente lo que deberíamos observar serían extinciones de una u otra especie a nivel local, pero coexistencia a nivel metapoblacional. En el campo esto se podría traducir en observar, por ejemplo, un árbol o una parcela con una especie y otro árbol o parcela con la otra. Sin embargo, en los cultivos de aguacate en zonas costeras de clima suave solo se observa una de las especies, *E. stipulatus*. Del escenario predicho por el modelo L-V también se deriva que si una de las especies fuera la residente la otra nunca podría invadir. O sea, una propiedad emergente de este escenario es que los efectos prioritarios, en los que el primero que llega es el que gana, son fundamentales. En base a estas

observaciones nuestra hipótesis para explicar esta dominancia en campo en áreas con clima suave es que *E. stipulatus*, una especie mediterránea (Bouras & Papadoulis 2005), colonizó antes la zona de estudio y, al ser la especie residente, impide la colonización de *E. scutalis*. También en los cultivos de cítricos, típicos de la costa mediterránea española, *E. stipulatus* es una de las especies más abundantes mientras que en ellos nunca se ha encontrado a *E. scutalis* (Mc Murtry 1977, Abad-Moyano et al. 2009). En la literatura encontramos información sobre la distribución de *E. stipulatus* que apunta a que es una especie de distribución exclusivamente mediterránea, sobretodo del mediterráneo occidental ya que no se encuentra en Egipto o Israel (Bonfour & McMurtry 1987, Moraes et al. 2004). Por otro lado, en los cultivos de aguacate de Israel solo se encuentra *E. scutalis*, pero no *E. stipulatus* (Swirski & Amitai 1997, Maoz et al. 2011), lo que parece indicar que en estas zonas la especie residente es *E. scutalis*. Estas observaciones estarían de acuerdo con la hipótesis de que *E. stipulatus* podría ser la especie residente en la franja mediterránea occidental, y que, como especie residente, estaría dificultando la colonización de *E. scutalis*, cuya distribución podría haber ido en expansión a partir de Oriente medio, donde es muy común (Kasap & Sekeroglu 2004). Para corroborar esta hipótesis serían necesarios experimentos de invasión, en los que en poblaciones ya establecidas de una de las especies se imitan eventos de invasión con pocos individuos de la otra (Montserrat et al. 2008, 2012).

Por otro lado, los fenómenos de exclusión recíproca entre dos especies determinados por efectos prioritarios también pueden darse en sistemas con depredación intragremial recíproca (Hille Ris Lambers & de Roos 2005, Montserrat et al. 2012). Los resultados del capítulo 3 indicaron que los adultos de ambas especies de *Euseius* son capaces de depredar en los juveniles de la otra cuando el recurso que comparten (polen) esta ausente, o sea, cuando lo que se simula es un módulo comunitario del tipo depredador-presa. Sin embargo, en presencia del recurso compartido, cuando se simula un módulo comunitario con IGP, la mortalidad de los juveniles no difirió de la encontrada en tratamientos sin IG- depredador y sin polen. Este resultado pone en duda si la causa de la mortalidad de los juveniles fue directa (depredación) o indirecta (competencia por interferencia, i.e. la presencia del IG- depredador dificultó el acceso de los juveniles al polen). Además, se sabe que en espacios suficientemente grandes y heterogéneos la intensidad de la depredación intragremial, y sus consecuencias a nivel comunitario, pueden ser reducidas considerablemente (Janssen et al. 2007). Esto es debido a que tales espacios permiten la expresión de comportamientos en los

individuos, y de su consecuencia a nivel poblacional, que minimizan la IGP, como el comportamiento anti-depredador (Magalhaes et al 2005, Montserrat et al. 2007 y 2008). Así, aunque teóricamente nuestros resultados y las observaciones de campo podrían también ser atribuidas a la existencia de depredación intragremial recíproca, creemos que la interacción que con más fuerza actúa como conductor de la dinámica poblacional en nuestra comunidad es la competencia.

Las condiciones “cálidas-secas” afectaron dramáticamente el crecimiento poblacional de *E. stipulatus* pero no el de *E. scutalis* (Fig. 4.2 y 4.4). Este resultado nos permitió predecir que a estas condiciones abióticas *E. scutalis* debería excluir siempre a *E. stipulatus*. Efectivamente, en todas las réplicas de los experimentos de competencia esto fue lo que ocurrió. Los resultados apuntan a que *E. scutalis* presenta mecanismos que le permiten adaptarse sin problemas a ambientes cálidos y secos (Bonfour & McMurtry 1987), y que éstos le confieren una ventaja competitiva sobre especies competidoras que no los tienen, como sería el caso de *E. stipulatus*.

Observaciones de campo en nuestra zona de estudio muestran que en verano *E. scutalis* es la especie dominante, y en algunos casos la única presente, en cultivos de aguacate situados en zonas de interior, donde las condiciones abióticas son muy cálidas y secas, pero que en primavera, cuando las condiciones abióticas son más suaves, *E. stipulatus* también está presente (Guzmán et al., en preparación). Nuestros resultados apuntan a que esta dominancia en verano es probablemente debida a que *E. scutalis* supera competitivamente a *E. stipulatus*, y que esta superioridad está mediada por las condiciones abióticas. Patrones de exclusión debidas a depredación intragremial recíproca no pueden explicar la ausencia de *E. stipulatus* en verano, ya que, como especie residente y presente durante la primavera, debería ser capaz de impedir la invasión y crecimiento poblacional de *E. scutalis* (Hille Ris Lambers & de Roos 2005), tal y como ocurre en zonas costeras.

Concluyendo, en este trabajo mostramos que la estructura de las comunidades puede estar mediada únicamente por las condiciones abióticas, a través del efecto que éstas pueden causar en los factores bióticos que determinan la estructura de las comunidades, como la competencia, depredación, simbiosis, parasitismo, mutualismo, etc (Dunson & Travis 1990). Una reciente revisión expone que el cambio en las condiciones abióticas causado por el calentamiento global está afectando virtualmente todas las interacciones que se dan entre las especies (Tylianakis et al. 2008). En este

trabajo mostramos, mediante experimentos controlados de dinámica de poblaciones, el importante efecto que estos cambios pueden causar en la estructura de las comunidades.

Capítulo 5

5. Interacción entre agro-ecosistemas y su efecto en la dinámica depredador-presa: una aproximación molecular.

5.1 Introducción

5.1.1 De poblaciones a meta-ecosistemas

En ecología, una *población* es un conjunto de individuos que pertenecen a la misma especie y que ocupan un mismo hábitat y una *comunidad* es un conjunto de poblaciones que interactúan entre sí, y que ocupan un mismo hábitat (Begon et al. 1986) (Fig. 5.1). Básicamente, una comunidad es el componente biótico de un *ecosistema*, que podría definirse como una unidad discreta que consiste en el conjunto de todos los organismos vivos (factores bióticos) que ocupan un hábitat y todos los factores abióticos con los cuales los organismos interactúan (Allaby 1994) (Fig. 5.1). Así en el mantenimiento de un ecosistema es fundamental el flujo de energía a través de las redes tróficas y el ciclo biogeoquímico de los nutrientes (Allaby 1994). En estas definiciones de población, comunidad, y ecosistema se considera a los sistemas como unidades aisladas. Sin embargo, el flujo de materiales y de organismos a través de los límites de los sistemas, tanto terrestres como acuáticos, es común en la naturaleza (Polis et al. 1997). Es por ello que actualmente la influencia de este flujo espacial de organismos y/o materiales en la persistencia de las poblaciones y comunidades es el núcleo central de varios estudios teóricos que han abordado el tema desde diferentes niveles de organización (Fig. 5.1): a nivel de *meta-población*, definida como un conjunto de poblaciones de una sola especie, conectadas entre sí a través de la dispersión de sus individuos (por lo que hay intercambio genético entre poblaciones) (Hansky & Gilpin 1991); a nivel de *meta-comunidad*, un conjunto de comunidades conectadas entre sí a través de la dispersión de múltiples especies que interactúan entre ellas (Leibold et al. 2004); y a nivel de *meta-ecosistema*, un grupo de ecosistemas conectados entre sí a través del flujo de energía, materiales y/o organismos (Loreau et al. 2003). Un resultado general de estos estudios teóricos es que el flujo de organismos y/o materiales entre sistemas posibilita, bajo ciertas condiciones, que poblaciones, comunidades o ecosistemas que a nivel local se extinguirían puedan persistir.

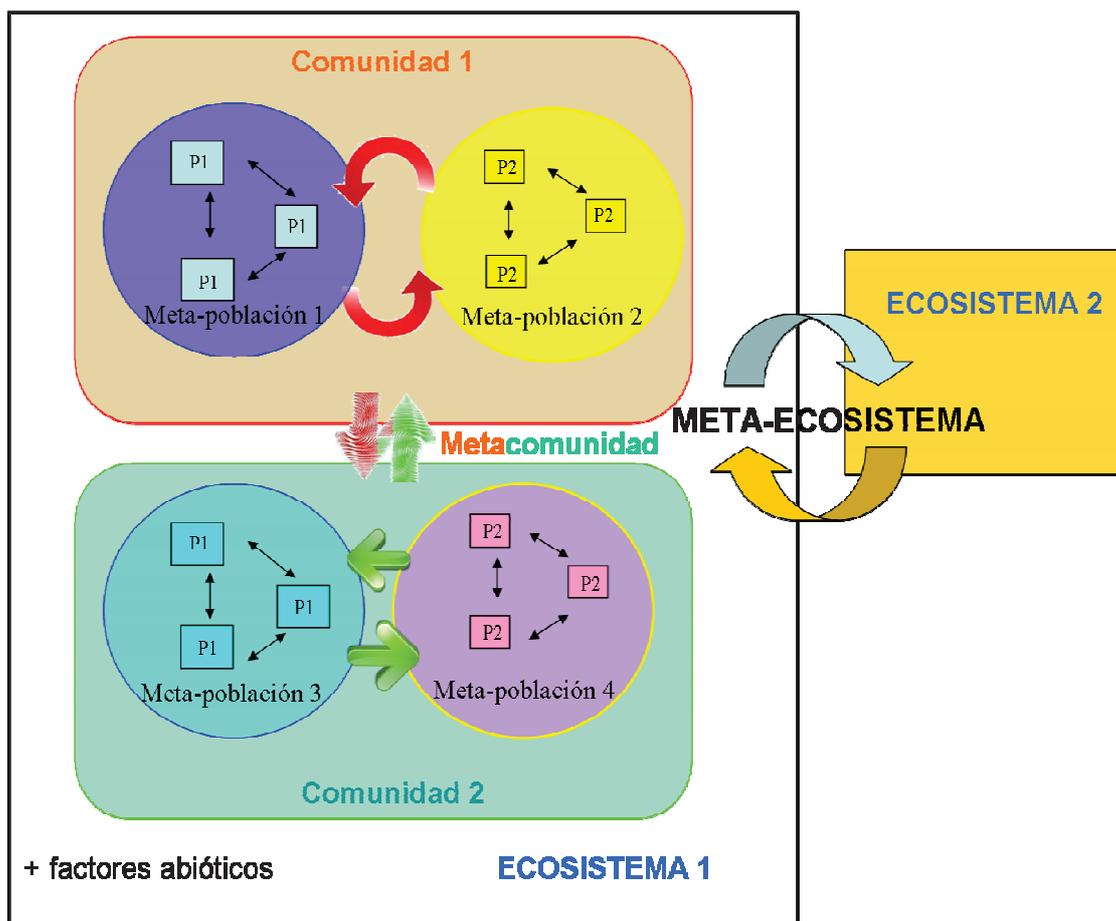


Figura 5.1. Esquema en el que se explica gráficamente las definiciones de población, meta-población, comunidad, meta-comunidad, ecosistema y meta-ecosistema descritas en el texto. Las flechas indican interacciones y flujos de materiales y organismos a través de los límites de los sistemas. P1 se refiere una población formada por un conjunto de individuos que pertenecen a la especie 1 y que ocupan un mismo hábitat (lo mismo para P2, P3 y P4)

5.1.2 Dinámica de la comunidad del agro-ecosistema del aguacate e hipótesis experimental.

Como se explicó en la introducción general, el estudio de la dinámica poblacional de las especies que componen el agro-ecosistema del aguacate del sureste español determinó la existencia de un único máximo anual en verano de la población de *O. perseae*, mientras que la de los ácaros fitoseidos mostró dos máximos anuales, uno en primavera en ausencia de poblaciones significativas del ácaro cristalino, y otro en verano (ver Fig. i.6) que se correspondió con una respuesta numérica a la presencia del ácaro cristalino. González-Fernández et al. (2009) determinaron que la dinámica poblacional de los fitoseidos en primavera se correspondió con la dinámica de la abundancia de polen en la atmósfera porque los ácaros fitoseidos se estaban alimentando del polen de la atmósfera que se depositaba sobre la superficie de las hojas de aguacate. Este polen del que se

alimentaban era principalmente de olivo, *Olea europaea*, el más abundante en la atmósfera en primavera (77% del total de mayo). Esta hipótesis se corroboró en campo al identificar como *E. stipulatus*, la especie omnívora y polinófaga, al 81% de los individuos muestreados durante el primer máximo poblacional, mientras que solo un 2% eran *N. californicus*, la especie depredadora. Además experimentos de laboratorio demostraron que *E. stipulatus* es capaz de sobrevivir y reproducirse alimentándose exclusivamente de polen de olivo (González-Fernández et al. 2009). También se comprobó, mediante la aplicación de trampas de polen situadas a 150 cm de altura entre las hojas de la periferia de los troncos de aguacate, que había polen de olivo en suspensión en la atmósfera del interior de los cultivos de aguacate que se depositó junto a otros tipos polínicos sobre las hojas del aguacate (González-Fernández et al. 2009).

La dinámica de la comunidad del agro-ecosistema del aguacate apunta a que las poblaciones de fitoseidos en los árboles de aguacate se sostienen, al menos en parte, por la llegada de recursos externos al ecosistema en el que habitan, i.e, la llegada de polen proveniente de otro agro-ecosistema cercano, el del olivo. Por lo tanto, la hipótesis que nos planteamos es que las comunidades en el agro-ecosistema del aguacate siguen una dinámica a nivel de meta-ecosistema. El cultivo del olivo aportaría un flujo unidireccional de materia y energía hacia el agro-ecosistema del aguacate a través de la llegada de polen, que se depositaría sobre las hojas de los aguacates y que serviría como fuente de alimento para *E. stipulatus* en los periodos en los que la densidad de presa es baja, como ocurre en primavera.

En la literatura se encuentran varios trabajos que demuestran experimentalmente el efecto del flujo de organismos y/o materiales en la persistencia de los sistemas (Janssen et al. 1997, Boughton 1999, Tittler et al. 2006, para meta-poblaciones; Amezcua et al. 2000, para meta-comunidades; Knight et al. 2005, Romero & Srivastava 2010, para meta-ecosistemas Wesner 2010). En estos trabajos este efecto se demostró de manera indirecta mediante la manipulación de los sistemas, de forma que en unos se permitía el intercambio o flujo entre ellos y en otros no, y posteriormente se comparaba la abundancia o la persistencia de las poblaciones en ambos tratamientos. En nuestro sistema este tipo de manipulación es virtualmente imposible, ya que sería muy difícil impedir la entrada de polen atmosférico en las parcelas experimentales. Por ello, se ha recurrido a técnicas moleculares para demostrar que recursos exógenos al sistema de

estudio contribuyen al mantenimiento de las poblaciones de fitoseidos del agro-ecosistema del aguacate.

5.1.3. Objetivos y técnicas disponibles para cumplirlos

5.1.3.1 Objetivos

El objetivo general del trabajo desarrollado en este capítulo es la puesta a punto de un método que permita determinar si el ácaro *E. stipulatus* se alimenta de polen de olivo en los árboles de aguacate. Esto permitiría, por un lado, confirmar de manera directa que aportaciones de materiales exógenos contribuyen a la persistencia de las poblaciones de los fitoseidos en el agro-ecosistema del aguacate, confirmando así que la comunidad de fitoseidos sigue una dinámica a nivel de meta-ecosistema. Por otro lado aportaría una interesante aplicación práctica, ya que permitiría determinar qué tipo de polen es ingerido en los cultivos por los ácaros fitoseidos existentes en cualquier sistema y así poder diseñar una estrategia de control biológico de conservación adecuada para el sistema de estudio. Para ello, el objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Diseño de cebadores capaces de detectar ADN de *O. europaea* en el interior de ácaros fitoseidos.
2. Puesta a punto de métodos de lavado de la superficie externa de dichos individuos para eliminar posibles granos de polen que pudieran quedar adheridos, evitando así falsos positivos.
3. Detección de ADN de *O. europaea* en el interior de ácaros fitoseidos bajo condiciones controladas.
4. Detección de ADN de *O. europaea* en el interior de ácaros fitoseidos recogidos en campo durante el máximo poblacional de primavera.

5.1.3.2 Técnicas moleculares disponibles

Para afianzar la hipótesis teórica de la existencia de un meta-ecosistema aguacate-olivo necesitamos demostrar experimentalmente que los individuos de *E. stipulatus* muestreados en campo se alimentan de polen de olivo. Debido al diminuto tamaño de los individuos (300-500 μm) resulta imposible realizar una disección para determinar el tipo de alimento ingerido. Además, estos ácaros no ingieren los granos de polen enteros sino que los perforan individualmente con su boca, succionando su contenido. Estas

consideraciones nos llevan a tener que recurrir a métodos moleculares a través de los cuales podamos detectar la presencia de polen de olivo en el interior del tracto digestivo de *E. stipulatus*.

En la bibliografía (Jervis et al. 1992, Symondson 2002) se detallan tres técnicas que están actualmente en uso para la identificación molecular de presa animal en la dieta de depredadores. En nuestro caso habría que adaptar dichas técnicas a la detección de alimento de origen vegetal.

1) Electroforesis de isoenzimas

La electroforesis en muchas formas ha sido usada para analizar la dieta de artrópodos como coleópteros, hemípteros y ácaros (Murray & Solomon 1978). Se han de realizar extractos homogeneizados de los depredadores (o en los casos que sea posible la disección, solo de sus tractos digestivos) que se analizan en geles de poliacrilamida y se tiñen para su actividad enzimática, sobretodo de enzimas estererasas. Los patrones de banda resultantes se comparan con los obtenidos de extractos de la presa o del alimento en cuestión (polen, hojas, etc.). Van der Geest y Overmeer (1985) analizaron el contenido del tracto digestivo de ácaros fitoseidos mediante este método de detección de enzimas y llegaron a la conclusión de que, a pesar de que sí se obtienen bandas correspondientes a enzimas estererasas del polen ingerido, el método no es suficientemente específico para distinguir entre la amplia variedad de tipos de pólenes ingeridos por estos ácaros en campo.

2) Métodos inmunológicos: ELISA

Este es un método bastante utilizado para la detección de individuos presa en el interior del tracto digestivo de sus depredadores (Hagler & Naranjo 1997) debido a su elevada sensibilidad, dado que, generalmente, la cantidad de material ingerido por el depredador es muy bajo. Otra ventaja de este método es su elevada especificidad, ya que se usan anticuerpos monoclonales específicos contra los antígenos que se quieren detectar.

Debido a su alergenicidad, el polen de olivo se encuentra bien caracterizado. Hasta la fecha se han identificado, purificado y caracterizado 12 alérgenos en el polen de olivo que se han denominado desde Ole e 1 hasta Ole e 12 (Villalba et al. 2013). La proteína Ole e 1 se ha aislado y purificado, y se ha demostrado que presenta actividad antigénica y alérgica. Se conocen anticuerpos frente a Ole e 1 (como por ejemplo anti-Ole e 1

10H1) que se encuentran disponibles comercialmente y que podrían ser usados para la detección a través de ELISA.

3) Métodos basados en PCR

Los métodos basados en la amplificación de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa se han convertido en una herramienta muy importante para el estudio de las interacciones tróficas en condiciones naturales. Una gran ventaja de estos métodos es que aunque el ADN se degrade rápidamente durante la digestión del alimento, cualquier resto de ADN que permanezca intacto podrá ser amplificado y detectado gracias a la técnica de PCR. Esta ventaja y la disponibilidad del material necesario para llevar a cabo la técnica en nuestro laboratorio nos llevó a decantarnos por métodos basados en PCR para alcanzar el objetivo propuesto.

En la bibliografía consultada, la mayoría de estudios se basan en la detección, mediante técnicas moleculares, de presa animal en los tractos digestivos de sus depredadores. En cambio hasta la fecha en que se realizó este trabajo no se habían encontrado trabajos previos en los que se pretendiera detectar mediante la técnica de PCR alimento de origen vegetal, como es el polen, en el tracto digestivo de ácaros fitoseidos. Por tanto, los tipos de muestras y los controles elegidos para este estudio fueron desarrollados *de novo* para la puesta a punto de este método de detección.

5.2 Material y métodos

5.2.1 Obtención de individuos de *E. stipulatus*

La especie con la que se trabajó en este capítulo es *E. stipulatus*, debido a que es la especie de ácaro fitoseido polinófaga representada de forma mayoritaria en los muestreos realizados en primavera en cultivos de aguacate de climatología de tipo costera.

Los individuos de *E. stipulatus* utilizados para la detección de polen de olivo bajo condiciones controladas se obtuvieron directamente de las crías mantenidas en laboratorio, descritas en el capítulo 2. Los individuos de *E. stipulatus* utilizados para los ensayos de detección de polen en campo se recogieron en parcelas de aguacate del IHSM La Mayora según se detalla en el apartado 5.2.7 de esta sección.

5.2.2 Generalidades del análisis de las muestras

Para el análisis de todos los tipos de muestras se siguieron los siguientes pasos:

1. Extracción de ADN
2. Cuantificación de ADN
3. Reacciones de PCR
4. Electroforesis en geles de agarosa.

1. Extracción de ADN

El protocolo elegido para la extracción de ADN fue el basado en CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) ya que hace posible la extracción de ADN de alto peso molecular de plantas sin la necesidad de utilizar materiales de elevados costes ni procedimientos que conlleven mucho tiempo de trabajo (Rogers & Bendich 1985). A cada muestra se añadieron 400 µl de tampón de extracción CTAB y dos bolitas de metal y se homogeneizó mediante Tissuelyser (Quiagen) en 2 ciclos de 30 y 15 seg a 30 Hz de frecuencia. Posteriormente se añadieron 2 µl de 2-mercaptoetanol y se mezcló en el vórtex. Las muestras se incubaron en el baño a 65° C durante 30 min. A continuación se añadieron 400 µl de Sevag (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1) y se mezcló por inversión y en vórtex hasta que las dos fases fueron homogéneas. Las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 15 min a 4° C. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante obtenido a viales limpios y se centrifugó nuevamente a 10.000 r.p.m durante 5 min. Luego se añadieron 240 µl de isopropanol frío y se centrifugó nuevamente a 13.000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se retiró, se añadieron 800 µl de tampón de lavado (etanol 100%, H₂O y acetato amonio 10N) sobre el pellet y se dejó lavar durante 30 minutos en nevera a 4°C. Pasado este tiempo se centrifugó a 13.000 g durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 µl de etanol al 70% frío, que se eliminó tras una nueva centrifugación. El pellet se resuspendió en MTE (Tris HCL 1M y EDTA 0,5 M ambos a pH 8), cuyo volumen varía según el tipo de muestra (20 µl para muestras con fitoseidos y 50-100 µl para muestras con tejido de hoja o con polen). Todo el proceso se realizó en campana de extracción y con las muestras en hielo para evitar la degradación del ADN.

2. Cuantificación de ADN

Para cuantificar la concentración de ADN obtenida tras la extracción y su grado de pureza se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop[®] (Nanodrop Technologies, USA). Para la medición, primero se realizó un blanco con la solución tampón utilizada para la resuspensión del pellet de ADN depositando sobre el brazo inferior del pedestal una gota de 1,5 µl. Posteriormente se midió la concentración de cada muestra con 1,5 µl. Entre cada tipo de muestra y al finalizar se limpió el pedestal con 2 µl de agua destilada.

3. Reacciones de PCR

El ADN obtenido tras la extracción fue utilizado como molde en las reacciones de PCR. La temperatura de anillamiento idónea para la amplificación de ADN de olivo se determinó experimentalmente mediante PCR en gradiente, fijándose en 60-61°C (ver 5.3.1.3 de Resultados). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl que contenían 4 µl de ADN molde extraído, 2,5 µl de tampón de PCR 10X (Bioline), 1 µl de cada cebador 10 µM (Sigma-Aldrich, USA), 1 µl de dNTPs (2,5mM), 1 µl de Cl₂Mg (50 mM) (Bioline), 0,2 µl de enzima Taq-polimerasa Biotaq (Bioline) y 14,4 µl de agua MilliQ esterilizada. También se incluyeron controles negativos sin ADN molde, que fue sustituido por el mismo volumen de agua, para detectar posibles contaminaciones. Los ciclos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador I-cycler (Biorad Laboratories, USA) e incluyeron 1 minuto a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 61°C (o la temperatura de anillamiento elegida), 1 minuto a 72°C y 5 minutos de elongación final a 72°C. El proceso de preparación de las placas de PCR se realizó en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones y con los reactivos y muestras en hielo.

4. Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR se realizaron electroforesis en geles de agarosa que se tiñeron con GelRed[™] (Biotium, Hayward, USA). Los geles se prepararon a una concentración del 1%, añadiendo 1,25 g de agarosa a 125 ml de tampón TBE 0,25X y 4 µl de GelRed. El mismo tampón fue utilizado para la cubeta de electroforesis. En cada pocillo se cargaron de 10 a 20 µl de reacción de PCR con 5 µl de azul de bromofenol. El patrón de peso molecular utilizado fue el hipperladder I del cual se cargaron 7 µl en el primer pocillo de cada gel. La migración del ADN se produjo

durante 2 horas a 90-100 V. La visualización de los resultados se llevó a cabo en el sistema Versadoc™ (Bio-rad, USA).

5.2.3 Diseño de los cebadores y comprobación de su capacidad de amplificación

Para la detección de ADN de olivo en el interior de los fitoseidos se eligió como secuencia diana de la amplificación la correspondiente a una proteína muy estudiada y caracterizada por ser el principal alérgeno del olivo, la proteína Ole e 1. La secuencia de nucleótidos que codifican para dicha proteína y los polimorfismos que presenta dicha secuencia en las distintas variedades de olivo (e.g. Picholine, Menara, Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca, Arbequina y Bella de España) (Hamman-Khalifa *et al.*, 2008) se obtuvieron de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov). Para poder detectar polen de olivo en los individuos independientemente de la variedad que hubieran ingerido, el diseño de los cebadores se realizó a partir de las regiones más conservadas entre variedades. Los cebadores se diseñaron con el programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky 2000).

5.2.3.1. Control positivo de los cebadores

Para comprobar la amplificación esperada con las parejas de cebadores diseñadas se utilizaron las siguientes muestras:

a) Hoja joven de olivo:

Se recogieron 16 hojas jóvenes de olivo que se congelaron y trituraron en un mortero con nitrógeno líquido. El material obtenido se almacenó en 4 viales de 1,5 ml (0,2 g de hoja en cada vial) y se procedió a la extracción de ADN genómico y reacciones de PCR según se explica en el apartado 5.2.2. Se analizaron 4 réplicas de ADN de hoja joven de olivo para cada pareja de cebadores diseñada.

b) Polen de olivo:

Se prepararon 3 viales de 5 mg de polen de olivo y se procedió a la extracción de ADN genómico y reacciones de PCR. Se analizaron 3 réplicas para cada pareja de cebadores diseñada.

5.2.3.2. Control negativo de los cebadores

Se procedió a comprobar que la pareja de cebadores elegida tras el control positivo (ver sección de resultados, sección 5.3.1.1) no amplificaba ADN de otras especies de plantas cuyo polen puede hallarse disponible como alimento de los ácaros fitoseidos, bien en el campo (polen de aguacate de la variedad Hass) o bien en el laboratorio (polen de *Carpobrotus edulis*). Las muestras utilizadas fueron las siguientes:

c) Polen de aguacate:

Se preparó 1 vial de 10 mg de polen de aguacate variedad Hass y se procedió a la extracción de ADN genómico y reacciones de PCR. Se analizó por tanto 1 réplica.

d) Polen de *C. edulis*:

Se preparó 1 vial de 10 mg de polen de *C. edulis* y se procedió a la extracción de ADN genómico y reacciones de PCR. Se analizó 1 réplica.

e) Muestras de ADN de hoja de aguacate variedad Hass:

Debido a que algunas especies de fitoseidos son capaces de alimentarse de tejidos vegetales de la planta que los hospeda (Nomikou et al. 2003) se añadieron muestras de hoja de aguacate para comprobar que no se amplificaba ADN de hoja de aguacate. Se analizaron 2 muestras.

Como control positivo de este ensayo se utilizó una de las réplicas de ADN de polen de olivo citada anteriormente.

5.2.3.3. Prueba de amplificación mediante PCR en gradiente

Para determinar de manera experimental la temperatura de anillamiento idónea para la amplificación de ADN de polen de olivo mediante el cebador elegido, se procedió a la realización de PCR en gradiente de temperatura. Para ello se tomaron como muestras ADN de polen de olivo en diluciones seriadas, para al mismo tiempo poder determinar la concentración mínima necesaria para que se produzca amplificación. Se partió de una muestra de ADN de polen de olivo de 858 ng/μl y se realizaron diluciones cuyas concentraciones fueron: D1: 8.58 ng/μl, D2: 0.858 ng/μl, D3: 0.0858 ng/μl y D4:

0.00858 ng/ μ l. Las temperaturas de anillamiento ensayadas fueron 58°C, 59°C, 60.5°C, 62.6°C, 65.7°C, 67.9°C, 69.3°C y 70°C.

5.2.4 Métodos de lavado

Con el fin de asegurar que el ADN de polen de olivo que se pudiera detectar mediante PCR se correspondía con ADN de polen ingerido y no con ADN perteneciente a granos de polen que pudieron quedar adheridos al exoesqueleto de los individuos, se desarrolló un método de lavado de los ácaros fitoseidos.

De las unidades de cría se recolectaron 855 hembras de *E. stipulatus* que fueron colocadas en grupos de 5 en placas de Petri de 3,5 cm de diámetro, con un doble disco de papel de filtro mojado en agua destilada como de fuente de agua. Las placas de Petri se taparon con Parafilm® y se colocaron en una cámara de condiciones controladas a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $65 \pm 5\% \text{HR}$, y 16:8 h L:O. Los individuos se dejaron en ayunas durante 24 horas para asegurar la completa digestión de la comida ingerida en las unidades de cría. Transcurridas las 24 horas, las placas de Petri se sumergieron en nitrógeno líquido para una inmediata congelación de los individuos. Posteriormente los individuos se colocaron, mediante un pincel limpio, en discos de plástico con polen olivo y se procedió a recubrirlos con los granos de polen (Fig. 5.2). Por último, grupos de 15 individuos recubiertos de polen se pasaron a viales de 1,5 ml., lo que se corresponde con la unidad muestral (UM) del ensayo. Se obtuvieron un total de 57 UM, de las que 9 se almacenaron directamente a -20°C (control sin lavar), mientras que el resto (48) fueron sometidas a los métodos de lavado elegidos.



Figura 5.2. Ácaros fitoseidos recubiertos con polen de olivo (señalado por las flechas)

En los métodos de lavado se utilizaron productos que han sido usados para lavar restos de plantas de la superficie externa de diversos insectos (Matheson et al. 2006) o para eliminar ADN de hongos exógenos en psílidos (Meyer & Hoy, 2008).

En la Tabla 5.1 se presenta un resumen de los distintos métodos de lavado evaluados. La tabla incluye los tipos de soluciones ensayadas, los tiempos de actuación, el número de lavados realizados con cada solución, y el número de UM por tratamiento.

El primer paso del proceso de lavado consistió en la introducción mediante una pipeta Pasteur desechable de 1 ml de solución de lavado (Fig. 5.3), diferente según el tratamiento, en cada UM. A continuación cada UM fue agitada con un vórtex durante 30 seg a 15 Hz y se dejó actuar según el tiempo determinado (Tabla 5.1). Pasado este tiempo, se retiró la solución con una pipeta nueva.

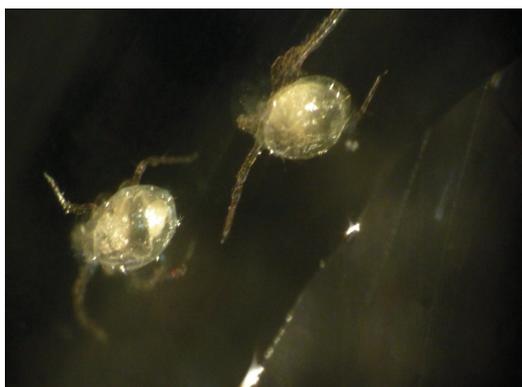


Figura 5.3. Ácaros fitoseidos inmersos en solución de lavado.

Tabla 5.1. Resumen de las soluciones de lavado ensayadas, el número de lavados realizados con cada solución, los tiempos de actuación y número de unidades muestrales (UM).

Solución de Lavado	Núm. de lavados	Tiempo (min.)	Nº UM
Control (sin lavar)			9
1. ETANOL 70%	1	1	3
2. Hipoclorito sódico 0.21% + Tween 20 0.1%	1	1	2
3. Hipoclorito sódico 0.21%	1	1	2
4. ETANOL 70%	1	10	2
5. Hipoclorito sódico 0.0175% + Tritón 0.01%	1	1	2
6. Hipoclorito sódico 0.2% + Tween 20 0.1%	1	15	1
	2	15+5	1
7. Hipoclorito sódico 0.2% + Tween 20 0.25%	1	10	1
	2	10+5	1
8. Hipoclorito sódico 3.5% + Tween 20 0.1%	1	1	1
	1	3	1
	2	1+1	1
9. Hipoclorito sódico 2% + Tween 20 0.1%	1	1	1
	1	3	1
	2	1+1	1
10. Hipoclorito sódico 0.5% + Tritón 0.01 %	1	1	1
	1	3	1
11. Hipoclorito sódico 0.2% + Tween 20 al 1%.	3	6+6+6	10
12. Hipoclorito sódico 0.5% + Tritón x-1001%.	2	10+10	6
13. Hipoclorito sódico 2% + Tween 20 1%	2	3+3	9

Cada UM llevó colocado un doble disco de filtro de metal para evitar que los individuos se perdieran al retirar la solución de lavado (Fig. 5.4). En los tratamientos en los que se aplicó un segundo lavado, éste se realizó siguiendo el mismo procedimiento excepto que la segunda agitación fue de 10 Hz, más suave para evitar una posible rotura de los fitoseidos. En los tratamientos con un tercer lavado, en éste no se realizó agitación. Todas las UM se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada con autoclave con una ligera inversión para eliminar los restos de la solución de lavado. Por último, se retiraron los filtros de metal y los fitoseidos fueron recogidos uno a uno con un pincel bajo lupa binocular (Leica S6-E, Leica Microsystems S.A.) a 10X aumentos y se introdujeron en viales estériles. Éstos se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis molecular (extracción de ADN y reacciones de PCR).



Figura 5.4. Muestras con filtro y solución de lavado

El análisis de las soluciones se realizó mediante 4 ensayos de lavado (I-IV) (ver apartado xx del capítulo de resultados) debido al volumen de trabajo requerido para llevarlo a cabo.

5.2.5. Detección de polen de olivo bajo condiciones controladas

Para poder validar la detección de ADN de polen en el tracto digestivo de los fitoseidos recogidos en el campo, de los que no se tiene ninguna información *a priori*, es necesario probar el método de detección con individuos sujetos a condiciones controladas de laboratorio, de los que sí sabemos de antemano si han ingerido o no polen de olivo. Para ello se prepararon 6 tipos de muestras, detalladas a continuación, que fueron posteriormente analizadas mediante los métodos explicados en el apartado 5.2.2.

5.2.5.1. Tratamientos

Para la preparación de las muestras se recolectaron 345 hembras de *E. stipulatus* de las unidades de cría, que fueron colocadas en grupos de 5 en placas de Petri similares a las descritas en el apartado 2.2, y se dejaron en ayunas durante 24h en la cámara de condiciones controladas (25 ± 1 ° C, 65 ± 5 % HR, y 16: 8 h L: O). Pasadas las 24 h, los individuos fueron sometidos a uno de los tratamientos (a,b,c,d) que se explican a continuación. Como en el apartado anterior, la unidad muestral (UM) de estos ensayos consistió en grupos de 15 individuos sujetos al mismo tratamiento. Las muestras se almacenaron a -20° C hasta su posterior análisis molecular.

a) Individuos que no han estado en contacto con el polen de olivo:

Con este tratamiento se pretende asegurar que el método aplicado no amplifica ADN endógeno de los ácaros fitoseidos, descartando así un falso positivo. Seis placas de Petri conteniendo 5 individuos en ayunas se sumergieron en nitrógeno líquido. Los individuos se recogieron después con un pincel nuevo y fueron colocados en viales en grupos de 15 y se almacenaron a -20° C. Se analizaron 2 réplicas (Fs1 y Fs2).

b) Individuos alimentados con polen de olivo y lavados:

Tras las 24 horas de ayuno, grupos de 5 individuos se colocaron en arenas de plástico de 2 cm de diámetro sobre las que se depositó abundante polen de olivo para que se alimentaran de él. Mediante experimentos preliminares de alimentación, se determinó que en 30 min cada individuo ingiere el interior de aproximadamente 60 granos de polen, y que tras 30-40 minutos dejan de alimentarse. Por tanto se les observó comer bajo lupa (63X) durante dicho periodo de tiempo, pasado el cual los individuos se recogieron uno a uno y se transfirieron a viales que fueron inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido. La rápida congelación es necesaria para, por un lado, impedir procesos enzimáticos que puedan producir la degradación del ADN, y por otro lado, para impedir el inicio de la digestión del polen ingerido. En cada vial se introdujeron un total de 15 individuos. Posteriormente los individuos se lavaron con el método num.11 para eliminar cualquier grano de polen que hubiera podido quedar adherido en la superficie de los individuos. Se obtuvieron 5 réplicas de 15 individuos alimentados y posteriormente lavados con el método de lavado 11. Este tratamiento nos permitirá

determinar si es posible detectar polen de olivo ingerido por los individuos en el laboratorio.



Figura 5.5 Ácaro fitoseido alimentándose con polen de olivo

c) Individuos recubiertos con polen de olivo sin lavar:

Seis placas de Petri conteniendo 5 individuos en ayunas se sumergieron en nitrógeno líquido. Posteriormente, con un pincel limpio, se recogieron los individuos ayunados y congelados de las placas y se colocaron en discos de plástico con polen de olivo y con un pincel se recubrieron con granos de polen. Por último se pasaron a viales de 1,5 ml, obteniendo 2 réplicas o UM de 15 individuos recubiertos de polen.

d) Individuos recubiertos con polen de olivo y posteriormente lavados:

Las placas de Petri conteniendo 5 individuos en ayunas se sumergieron en nitrógeno líquido. Posteriormente, con un pincel limpio, se recogieron los individuos ayunados y congelados de las placas y se colocaron en arenas de plástico con polen olivo y con un pincel se recubrieron los individuos con granos de polen. A continuación se sometieron al proceso de lavado detallado en el punto 5.2.4 con el método de lavado 11. Se obtuvieron 2 réplicas.

Los tratamientos c) y d) permitirán validar el método de lavado de los granos de polen de la superficie de los individuos.

e) Muestras sin ADN:

En las reacciones de PCR se incluyeron muestras control negativo de la PCR, en las cuales se incluyeron todos los reactivos necesarios para la reacción excepto el ADN molde, que fue sustituido por agua MilliQ esterilizada, para detectar posibles

contaminaciones, ya que en ningún caso se espera amplificación en este tipo de muestras.

f) Muestra de polen de olivo:

Se incluyó 1 muestra de ADN de polen de olivo que sirvió como control positivo de la reacción de PCR.

5.2.6. Ensayo de detección de fuente de contaminación

Este ensayo de detección de fuente de contaminación hubo de realizarse debido a que en el ensayo de detección de polen de olivo bajo condiciones controladas se obtuvo un resultado inesperado, lo que nos llevó a plantear la hipótesis de que podría haberse producido contaminación en alguna etapa del proceso, que pudo derivar en la obtención de falsos positivos. Para comprobar la existencia de contaminación se realizaron 3 estudios:

Estudio 1: Para este ensayo experimental se prepararon 7 UM de 15 individuos que no habían estado en contacto con polen de olivo, de la misma forma que se detalló en el apartado 5.2.5.1, y lavados con el método de lavado 11. Además se prepararon viales vacíos (3 réplicas) en cada etapa del proceso de preparación de dichas muestras, realizando los mismos pasos pero sin introducir los ácaros fitoseidos.

La extracción de ADN de estas nuevas muestras se realizó en una campana de flujo laminar que impide la entrada de agentes externos y con reactivos nuevos. En este ensayo se incluyeron también controles negativos de la extracción, es decir viales vacíos esterilizados en autoclave a los que se les practicó el mismo proceso de extracción que a las muestras pero que en principio no contienen ADN (4 réplicas). Además en la etapa de PCR se realizaron 4 réplicas de control negativo de PCR. La preparación de las nuevas muestras y la realización del ensayo se llevaron a cabo entre los meses de mayo y junio.

Estudio 2: En este ensayo se llevó a cabo la extracción de ADN de 15 viales nuevos esterilizados mediante autoclave y vacíos, sin ningún tipo de muestra más que el aire que contenían. Con el “supuesto” ADN obtenido se realizó la amplificación mediante PCR, en la que además se incluyeron 3 controles negativos de PCR (i.e

reacciones con todos los reactivos excepto el ADN molde, cuyo volumen es sustituido por agua) y 4 controles positivos con ADN de polen de olivo (0.08 , 0.8 , 10 y 40 ng/ μ l).

Estudio 3: En todas las reacciones de PCR llevadas a cabo en este trabajo, tanto en aquellas presentadas en esta memoria como en las no presentadas, se incluyeron controles negativos de PCR de rutina para detectar posibles falsos positivos debidos a contaminaciones. En dichos controles no se espera en ningún caso amplificación. En el caso de que la hubiera ésta se debería a la existencia de ADN de olivo, que se considera contaminación. Así, con todos los controles negativos incluidos en todos los ensayos de este capítulo, se procedió al cálculo de un porcentaje de contaminación como la fracción de controles negativos contaminados (es decir, con amplificación) frente al total de controles negativos analizados.

5.2.7. Detección de polen de olivo en individuos de campo

La recolección de los individuos de campo se llevó a cabo en los años 2010 y 2011, durante abril y mayo, meses en los que la población de ácaros fitoseidos responde numéricamente a la abundancia de polen en la atmósfera (González-Fernández et al. 2009). En una parcela de aguacate localizada en el IHSM La Mayora se recogieron aproximadamente 1000 hojas de aguacate, que se inspeccionaron bajo lupa binocular, para capturar uno a uno con un pincel los individuos adultos de *E. stipulatus* que se encontraran. Los 450 individuos recolectados fueron introducidos en grupos de 15 en viales de 1,5 ml y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Este método de recolección individual se recomienda frente a otros métodos de recolección, como puede ser el uso de un aspirador, ya que la aspiración puede producir contaminación externa (King et al. 2008). Los individuos recolectados se almacenaron a -20° C (King et al. 2008). Posteriormente estos individuos se sometieron al proceso de lavado (método 11) y se obtuvieron 6 réplicas de 15 individuos recogidos en campo. En este análisis además se incluyeron como controles: 2 réplicas de individuos recubiertos de polen y lavados, 5 réplicas de controles de la extracción y 5 réplicas de controles negativos de PCR.

5.3. Resultados

5.3.1 Diseño de los cebadores y comprobación de su capacidad de amplificación

Una vez halladas las secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína OLE e 1 en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e identificadas las regiones más conservadas entre dichas variedades (Hamman-Khalifa *et al.* 2008), se procedió al diseño de cebadores capaces de amplificar fragmentos de ADN de *Olea europaea*. En el extremo 5' se hallaron dos regiones conservadas con las que fue posible diseñar dos cebadores sentido. Sin embargo, solo se diseñó un cebador antisentido ya que la región más conservada hacia el extremo 3' de la secuencia era corta y no fue posible diseñar otro, de forma que un único cebador antisentido fue pareja de ambos cebadores sentido. Las secuencias de los cebadores diseñados y sus respectivas temperaturas de fusión (T_m), obtenidas a partir de la fórmula [$T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$], fueron las siguientes:

Cebadores sentido:

OLE 1A-F 5'-TACGCCTCCAATGCAAAGAC-3' T_m : 60° C

OLE 1B-F 5'-GATTCATTACTGAACTTAGCGAGTTC-3' T_m : 72° C

Cebador antisentido:

OLE 1C-R 5'-TGTGCACATTTTGGGAAGAGC-3' T_m : 58° C

Para la pareja de cebadores OLE 1A-F y OLE 1C-R se espera un tamaño de banda de 283 pares de bases y para la pareja OLE 1B-F y OLE 1C-R se espera una banda de 325 pares de bases. Ambas parejas de cebadores cumplen con una premisa importante para la detección de ADN en el interior del tracto digestivo de depredadores: una elevada T_m (mayor que 55°C), que permite llevar a cabo una reacción de PCR con una alta temperatura de anillamiento ($T_a > 60^\circ\text{C}$), reduciendo el riesgo de amplificaciones inespecíficas y aumentando la eficiencia de la reacción (King *et al.* 2008).

5.3.1.1. Control positivo de los cebadores

En este primer ensayo para comprobar la amplificación esperada con ambas parejas de cebadores en ADN genómico de hoja joven de olivo se observó amplificación de la banda esperada de 283 pares de bases en las 4 réplicas de ADN de hoja joven de olivo

(Fig. 5.6 calles 1 a 4) con la pareja de cebadores OLE 1A-F y OLE 1C-R. Con la pareja OLE 1B-F y OLE 1C-R también se observó la banda de 325 pares de bases esperada en las 4 réplicas, pero además se obtuvieron otras dos bandas de mayor tamaño que pueden deberse a amplificaciones inespecíficas (Fig 5.6, calles 5 a 8).

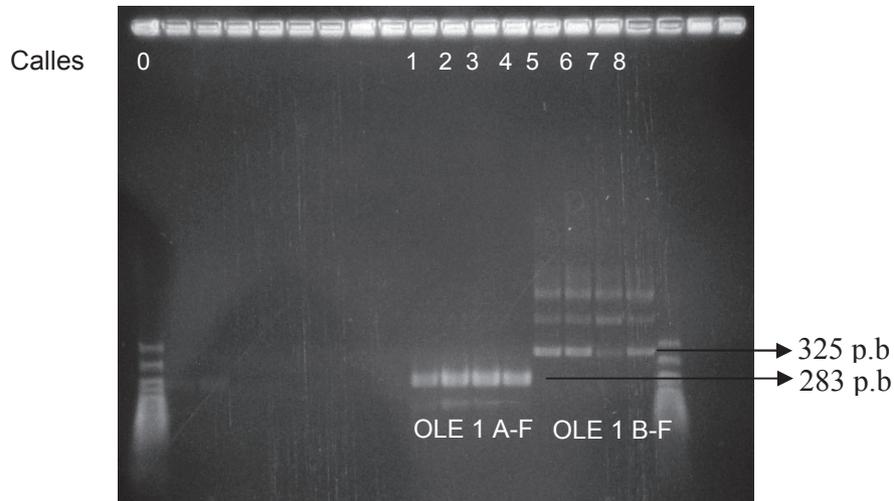


Figura 5.6. Resultados de la electroforesis para la detección de amplificación de ADN de hoja de olivo con los cebadores sentido OLE 1 A y OLE 1 B y el cebador antisentido OLE 1 C común para ambos. La primera calle (0) corresponde al patrón de peso molecular, al igual que en todas las figuras posteriores.

En el ensayo con ADN genómico extraído de muestras de polen de olivo se comprobó que ambas parejas de cebadores amplificaban las bandas esperadas (Fig. 5.7a, calles 1-3 y Fig. 5.7b, calles 1-3).

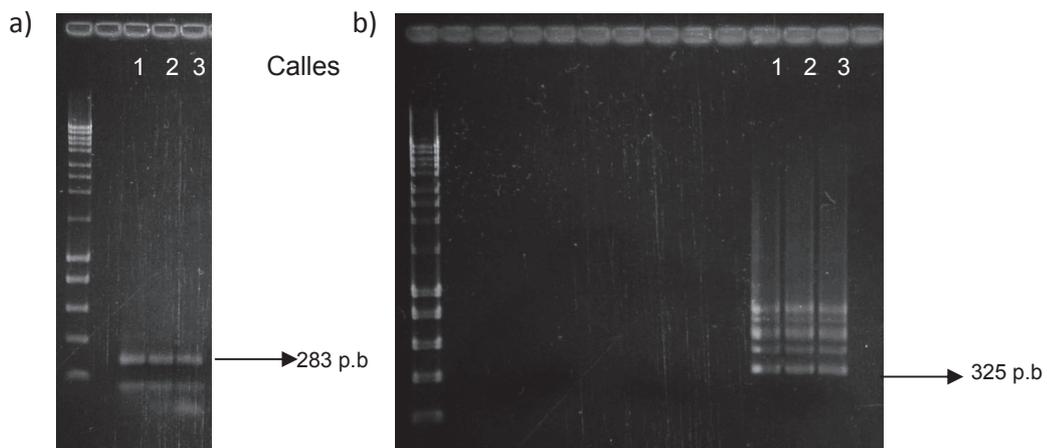


Figura 5.7. Resultados de la electroforesis para la detección de amplificación de ADN de polen de olivo con los cebadores sentido OLE 1 A (a) y OLE 1 B (b) y el cebador antisentido OLE 1 C común para ambos

Debido a la aparición de las bandas inespecíficas amplificadas con la pareja OLE 1B-F y OLE 1C-R tanto en hoja como en polen de olivo, se decidió utilizar en los ensayos posteriores únicamente la pareja de cebadores OLE 1 A-F y OLE 1C-R que generan una única banda específica.

5.3.1.2. Control negativo de los cebadores

Se procedió a comprobar la capacidad de amplificación de la pareja de cebadores OLE 1 A-F y OLE 1C-R con ADN de otras especies de plantas cuyo polen puede hallarse disponible como alimento de los ácaros fitoseidos, bien en el campo (polen de aguacate de la variedad Hass) o bien en el laboratorio (polen de *C. edulis*).

Los resultados mostraron que se dio amplificación en la muestra control positivo de polen de olivo (Fig. 5.8 calle 1) y no hubo amplificación para el ADN de *C. edulis* (calle 2), el de polen de aguacate (calle 3) ni para el de hoja de aguacate (calles 4 y 5). Por lo tanto, se concluyó que la pareja de cebadores OLE 1 A-F y OLE 1C-R es válida para su utilización en los ensayos posteriores al ser específica para ADN de olivo.

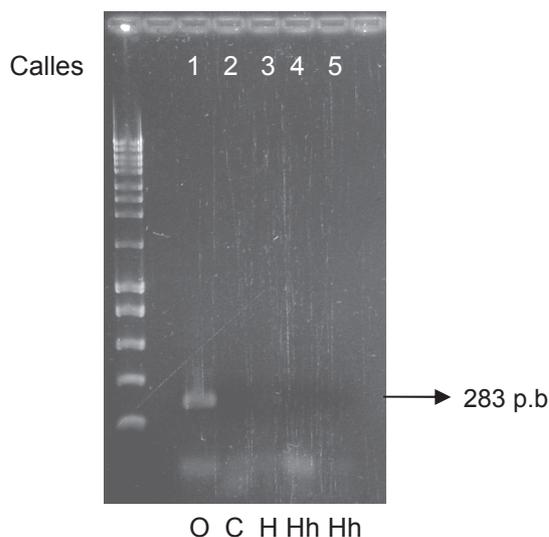


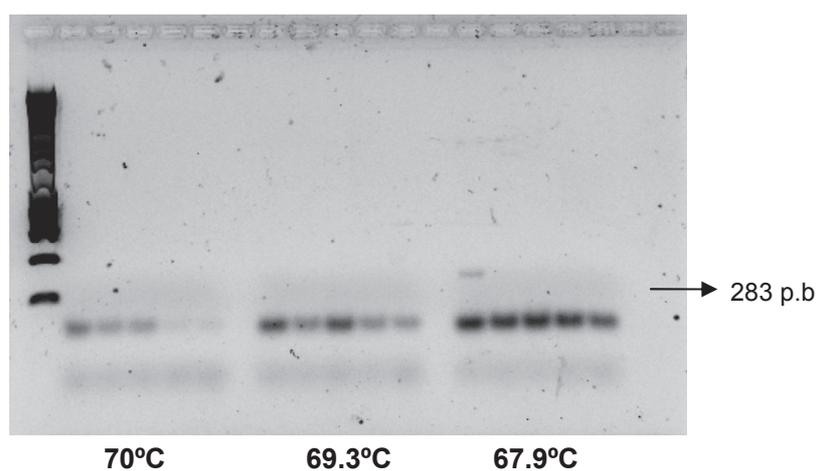
Figura 5.8. Electroforesis resultado de los ensayos de de PCR con la pareja de cebadores OLE 1 A-F y OLE 1C-R y con ADN de polen de olivo (O), de *C.edulis* (C) y de aguacate (H polen y Hh hoja) como molde.

5.3.1.3. Prueba de amplificación mediante PCR en gradiente

Para determinar de manera experimental la temperatura de anillamiento idónea para la amplificación de ADN de polen de olivo mediante los cebadores OLE 1 A-F y OLE 1C-R, se procedió a la realización de PCR en gradiente de temperatura desde 58°C hasta 70°C, y con muestras de ADN de polen olivo a cuatro concentraciones distintas: D1: 8.58 ng/μl, D2: 0.858 ng/μl, D3: 0.0858 ng/μl y D4: 0.00858 ng/μl.

Se observó que a 70°C y 69,3°C no se consiguió amplificar la banda esperada en ninguna de las muestras (Fig. 5.9). A 67.9°C aparece amplificación únicamente en la muestra menos diluida (D1, Fig. 5.9). A partir de 62.6°C ya se amplificó tanto en la dilución D1 como en D2 (Fig. 5.9). A 60.5°C incluso se detectó una ligera banda en la dilución D3 (Fig. 5.9). Por último a 59°C y a 58°C solo se observó amplificación en las diluciones D1 y D2. (Fig. 5.9).

Para incrementar la sensibilidad de la reacción de PCR en ensayos de detección de presa se recomienda no utilizar la temperatura de anillamiento más elevada que permita la amplificación, sino una menor a ésta, sin llegar a comprometer la especificidad del ensayo (Sint et al. 2011). Por ello, para el resto de los ensayos se fijó la T_a en 60-61°C, una temperatura que cumple estos requisitos y a la cual es posible detectar ADN de polen de olivo partiendo de una baja concentración como son 0.0858 ng/μl (concentración mínima para obtener amplificación).



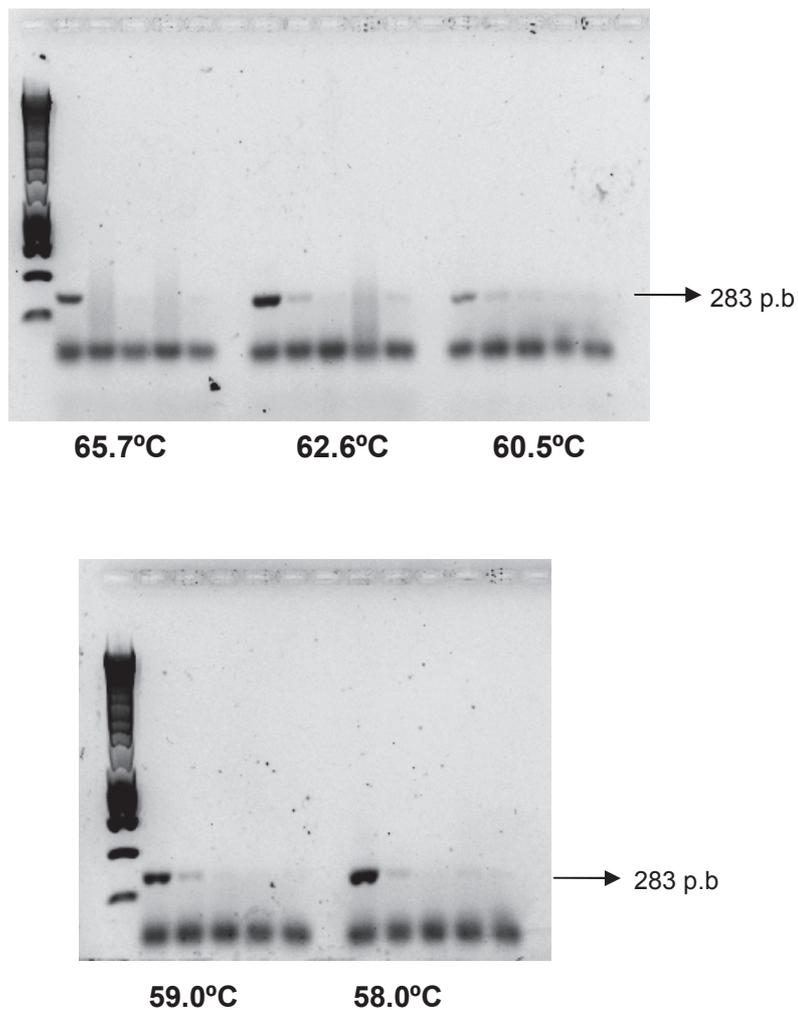


Figura 5.9. Electroforesis resultado del ensayo de PCR en gradiente de temperatura. El orden de de las diluciones de ADN de polen de olivo en cada temperatura es D1, D2, D3, D4 y control negativo de PCR (sin ADN molde).

5.3.2. Métodos de lavado

Las 48 UM de fitoseidos recubiertos con polen de olivo fueron tratadas con distintas soluciones de lavado, combinando distintos tiempos de actuación y número de lavados (Tabla 1). Los controles de estos ensayos fueron muestras de fitoseidos recubiertos de polen sin lavar (9 UM). Debido al volumen de trabajo, los distintos métodos de lavado se probaron en distintos ensayos (I a IV). Tras la extracción de ADN y las reacciones de PCR se obtuvieron los siguientes resultados:

Ensayo de lavados I:

En este ensayo se probó la solución de lavado 1 (etanol al 70%, 1 minuto de tiempo de actuación – Tabla 1). En la figura 5.10 se puede observar que hubo amplificación en las 3 réplicas control de fitoseidos recubiertos con polen de olivo sin lavar (calles 1, 2 y 3), como era de esperar. Sin embargo, el método de lavado probado no fue efectivo ya que también se amplificó ADN en las 3 muestras de de fitoseidos recubiertos con polen de olivo y posteriormente lavados con la solución de lavado 1 (Fig. 5.10, calles 4, 5 y 6). En el control negativo de la PCR (sin ADN molde) no se observó amplificación (Fig.5.10, calle 7).

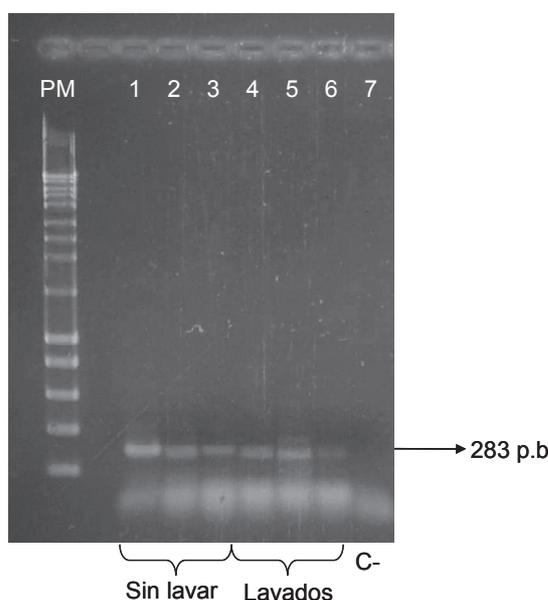


Figura 5.10. Electroforesis resultado del ensayo de PCR con ADN de muestras de fitoseidos recubiertos de polen de olivo y posteriormente lavadas con etanol al 70% durante 1 minuto.

Ensayo de lavados II:

Las soluciones ensayadas fueron (Tabla 1):

Lavado 2: Hipoclorito sódico 0,21% + Tween 20 (0,1%) 1 lavado de 1 minuto.

Lavado 3: Hipoclorito sódico 0,21% 1 lavado de 1 minuto.

Lavado 4: Etanol 70% 1 lavado de 10 minutos.

Lavado 5: Hipoclorito sódico 0,0175% + Tritón 0,01% 1 lavado de 1 minuto.

Para cada solución de lavado se realizaron 2 réplicas.

En la figura 5.11 se observa que hubo amplificación en las 2 réplicas control de fitoseidos recubiertos con polen de olivo sin lavar (calles 1 y 2), como era de esperar. Sin embargo, las soluciones ensayadas no resultaron efectivas ya que en todos los

métodos de lavado se detectó amplificación en al menos una de las réplicas de ADN de fitoseidos recubiertos de polen de olivo y posteriormente lavados (calles 3-10). No hubo amplificación en el control negativo de PCR (calle 13).

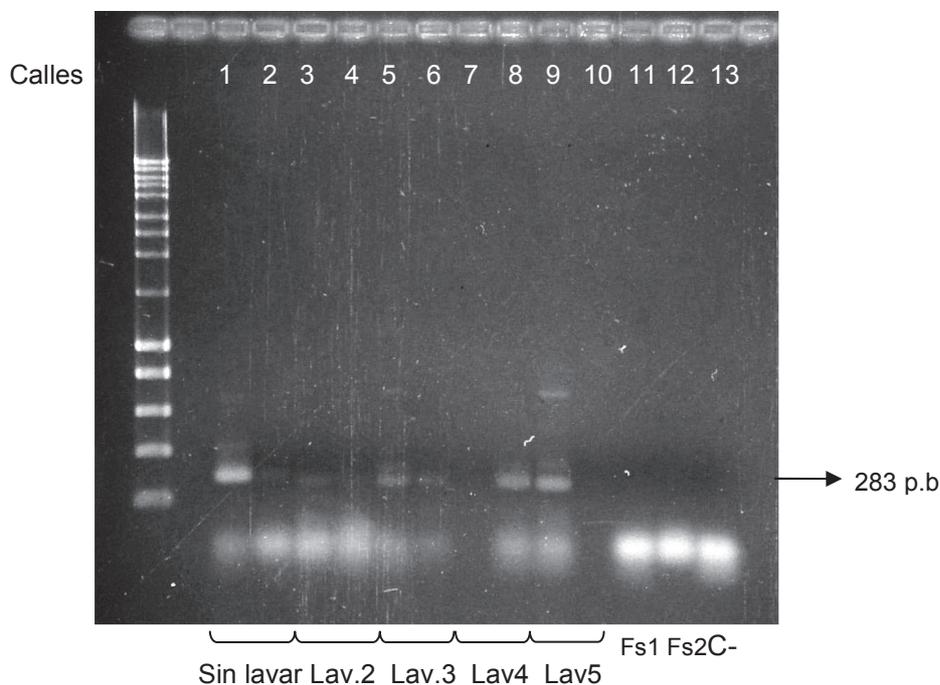


Figura 5.11. Electroforesis resultado del ensayo de PCR con ADN de muestras de fitoseidos recubiertos de polen de olivo y posteriormente lavadas con los métodos de lavado 2 a 5. Las calles 11 y 12 se explican más adelante, en el apartado 5.3.3.1.

Ensayo de lavados III:

Las soluciones ensayadas fueron (Tabla 1):

- Lavado 6: Hipoclorito sódico 0,2% + Tween 20 0,1%
- Lavado 7: Hipoclorito sódico 0,2% + Tween 20 0,25%
- Lavado 8: Hipoclorito sódico 3,5% + Tween 20 0,1%
- Lavado 9: Hipoclorito sódico 2% + Tween 20 0,1%
- Lavado 10: Hipoclorito sódico 0,5% + Tritón 0,01 %

En la tabla 1 se pueden ver los tiempos de actuación y número de lavados de cada método.

El resultado mostró amplificación en las 2 réplicas control de fitoseidos recubiertos con polen de olivo sin lavar (Fig. 5.12, calles 14 y 15), y también en la mayoría de las soluciones ensayadas (Fig. 5.12, calles 1 a 13). Solo en la calle 4 (correspondiente a la solución de lavado 7, con 2 lavados de 10 y 5 minutos) y la calle

13 (correspondiente al lavado 8, un 1 lavado de 3 minutos) no se observó amplificación. No hubo amplificación en el control negativo de PCR (Fig. 5.12, calle 16)

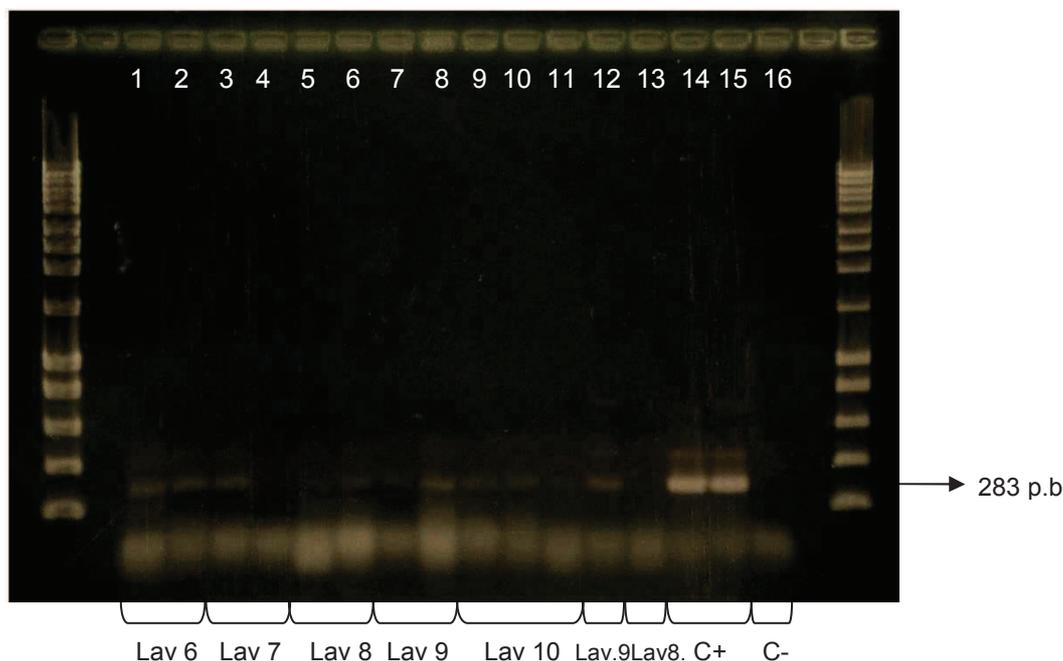


Figura 5.12. Electroforesis resultado del ensayo de PCR con ADN de muestras de fitoseidos recubiertos de polen de olivo y posteriormente lavadas con los métodos de lavado 6 a 10.

Ensayo de lavados IV:

Soluciones ensayadas (Tabla 1):

Lavado 11: Hipoclorito sódico 0,2% + Tween 20 al 1%, 3 lavados de 6 min. 10 réplicas

Lavado 12: Hipoclorito sódico 0,5% + tritón x-100 al 1%, 2 lavados de 10 min. 6 réplicas.

Lavado 13: Hipoclorito sódico 2% + tween 20 1% 2 lavados de 3 min. cada uno. 9 réplicas.

En las figuras 5.13 y 5.14 se observa que el ADN se amplificó en las muestras control de fitoseidos recubiertos de polen de olivo sin lavar y que no hubo amplificación de ADN en ninguna de las réplicas ensayadas con los métodos de lavado 11, 12 y 13. Se concluyó por tanto que los tres métodos de lavado son efectivos.

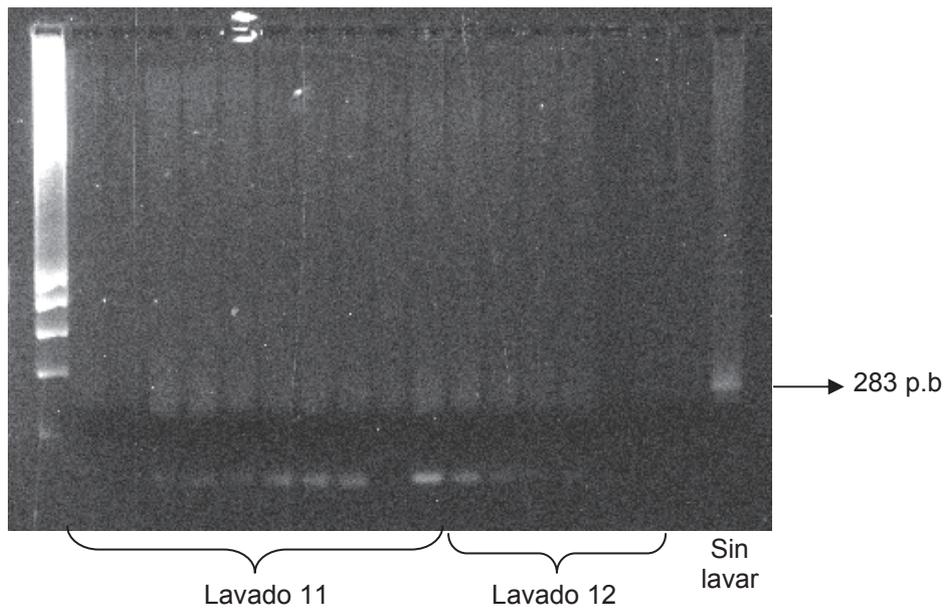


Figura 5.13. Electroforesis resultado del ensayo de PCR con ADN de muestras de fitoseidos recubiertos de polen de olivo y posteriormente lavadas con los métodos de lavado 11 y 12.

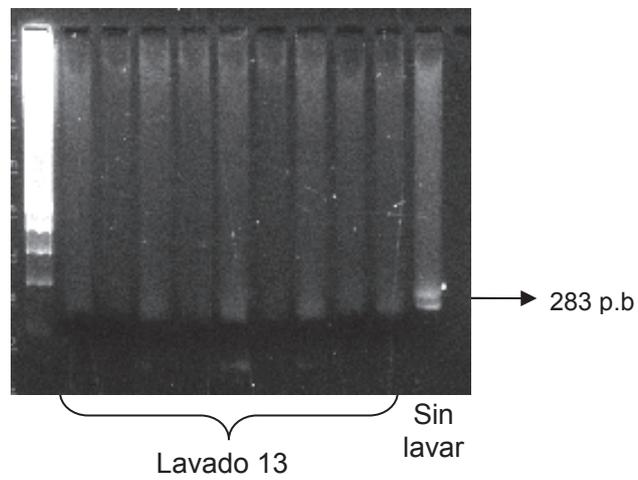


Figura 5.14. Electroforesis resultado del ensayo de PCR con ADN de muestras de fitoseidos recubiertos de polen de olivo y posteriormente lavadas con el método de lavado 13.

5.3.3. Detección de polen de olivo bajo condiciones controladas

5.3.3.1. Tratamientos

Los resultados del primer ensayo (Fig.5.15) muestran que no hubo amplificación en ninguna de las dos muestras de fitoseidos que no habían estado en contacto con polen de olivo, i.e Fs1 y Fs2 del tratamiento a) (calles señaladas en amarillo). Por lo tanto, se verificó que no hay amplificación de ADN endógeno de los ácaros fitoseidos. En el control negativo de la PCR (C-) tampoco hay amplificación y sí la hay en la muestra de fitoseidos recubiertos de polen de olivo sin lavar (C+), como se esperaba.

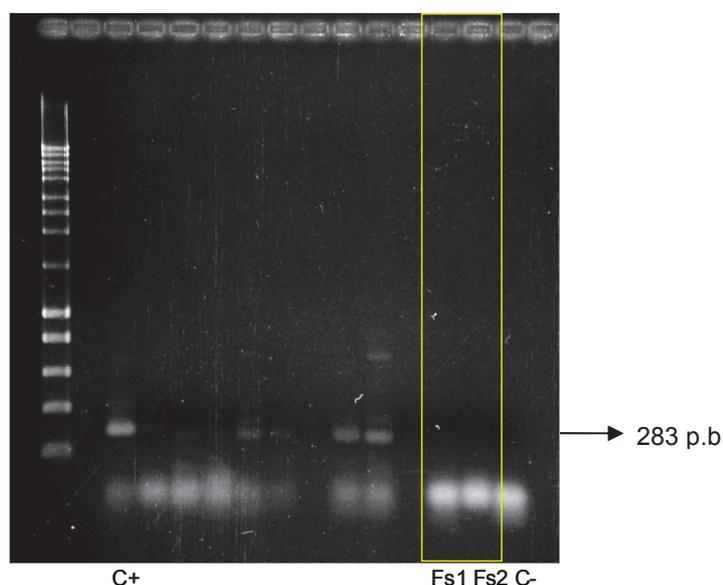


Figura 5.15. Electroforesis resultado del ensayo de PCR con muestras de ADN de ácaros fitoseidos que no habían estado en contacto con el polen de olivo (Fs1 y Fs2 señaladas en amarillo), en las que no se observa amplificación. Las calles que no presentan leyenda pertenecen a otro ensayo por lo que no deben ser tenidas en cuenta en esta figura.

El segundo ensayo (Fig. 5.16) se llevó a cabo en el mes de junio de 2010, e incluyó el resto de tratamientos detallados en el apartado 5.2.5.1 (material y métodos). Con este ensayo se pretendió determinar si es posible la amplificación del ADN de polen de olivo ingerido por los ácaros fitoseidos. Se observó que la muestra de polen de olivo (calle 12) y las 2 réplicas de fitoseidos recubiertos de polen sin lavar (calles 10 y 11) amplificaron la banda de 283 pares de bases, como se esperaba. Por otro lado, las 2 muestras de fitoseidos recubiertos de polen y posteriormente lavados con el método 11 (control del lavado), no amplificaron (calles 6 y 7) confirmando que el lavado 11 fue efectivo. En 4 de 5 muestras de fitoseidos alimentados con polen de olivo (calles 1 a 5) se observó amplificación de ADN, que se correspondería al polen de olivo ingerido, lo

cual implica que el método de detección que se está poniendo a punto parece ser adecuado. Sin embargo, se observó también amplificación en las muestras de fitoseidos que no habían estado en contacto con polen de olivo [(calles 8 y 9 (Fs1 y Fs 2)]. Este resultado fue muy sorprendente porque en el ensayos anterior *estas mismas muestras* a las mismas condiciones de PCR no presentaban amplificación (ver Fig. 5.15, calles marcadas en amarillo). Por ello se pensó que estas dos muestras habían podido sufrir contaminación, bien de ADN de olivo de otras muestras, o bien de polen de olivo presente en el ambiente del área de trabajo. Cabe mencionar que las muestras fueron preparadas en el mes de diciembre de 2010, época en la que no hay polen de olivo en el ambiente, pero que fueron manipuladas durante los meses de abril y mayo, época en la que el polen en el ambiente es abundante.

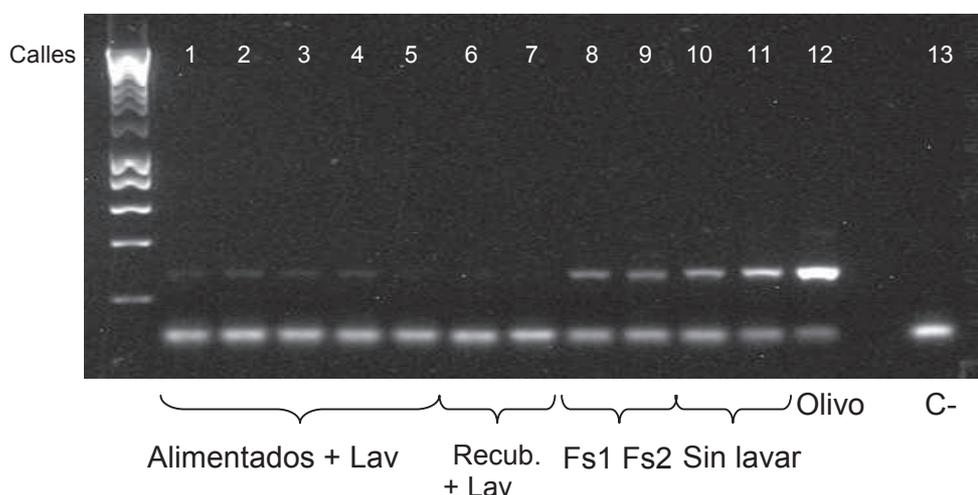


Figura 5.16. Electroforesis resultado del ensayo de PCR de detección de polen de olivo en el interior de ácaros fitoseidos alimentados con polen de olivo y posteriormente lavados con el método 11 (Alimentados + Lav). Se incluyó también el tratamiento de fitoseidos recubiertos de polen de olivo y posteriormente lavados con el mismo método (Recub. + Lav), el de recubiertos sin lavar (sin lavar), las dos muestras de ácaros fitoseidos que no habían estado en contacto con polen de olivo (Fs1 y FS2), ADN de polen de olivo (como control positivo) y el control negativo de la PCR.

5.3.4 Ensayo de detección de fuente de contaminación

Estudio nº1: Tras la electroforesis se observó amplificación en todas las muestras de fitoseidos que no habían estado en contacto con polen de olivo (Fig. 5.17, calles 1 a 7), por lo que podemos afirmar la existencia de contaminación. En las tres muestras controles del proceso de preparación, viales a los que se les realizaron los mismos pasos que para las muestras pero sin introducir los fitoseidos, no presentaron amplificación (Fig. 5.17, calles 8 a 10). En cuanto a los controles negativos de la PCR en ninguno de

los 4 se detectó amplificación (Fig. 5.17 calles 15 a 18), por lo tanto se descartó que la contaminación con polen de olivo se hubiera dado en esta etapa. En cambio en las 4 réplicas controles de la extracción, viales vacíos a los que se les practicó el proceso de extracción a la vez que al resto de muestras, sí apareció la banda de 283 pares de bases que delata la presencia de ADN de olivo (Fig. 5.17, calles 11 a 14). Por lo tanto se concluyó que en este ensayo la contaminación se produjo en la etapa de extracción de ADN.

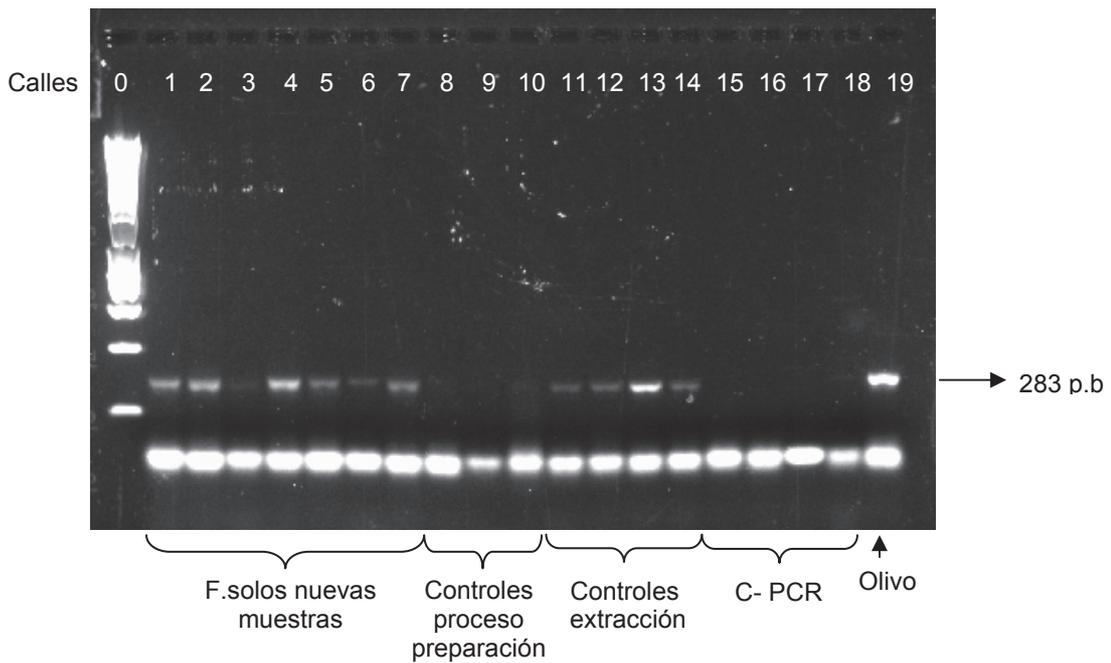


Figura 5.17. Resultado del ensayo n°1 de detección de fuente de contaminación.

Estudio n°2: No se obtuvo amplificación en ninguna de las 15 muestras de viales nuevos vacíos Sin embargo se obtuvo amplificación en los 1 de los 5 controles negativos de PCR (Fig. 5.18). Esto indica que la contaminación no ocurrió en la etapa de extracción de ADN sino en la etapa de PCR. Que solo se observe contaminación en 1 de 5 controles indica que la contaminación parece ocurrir de forma aleatoria.

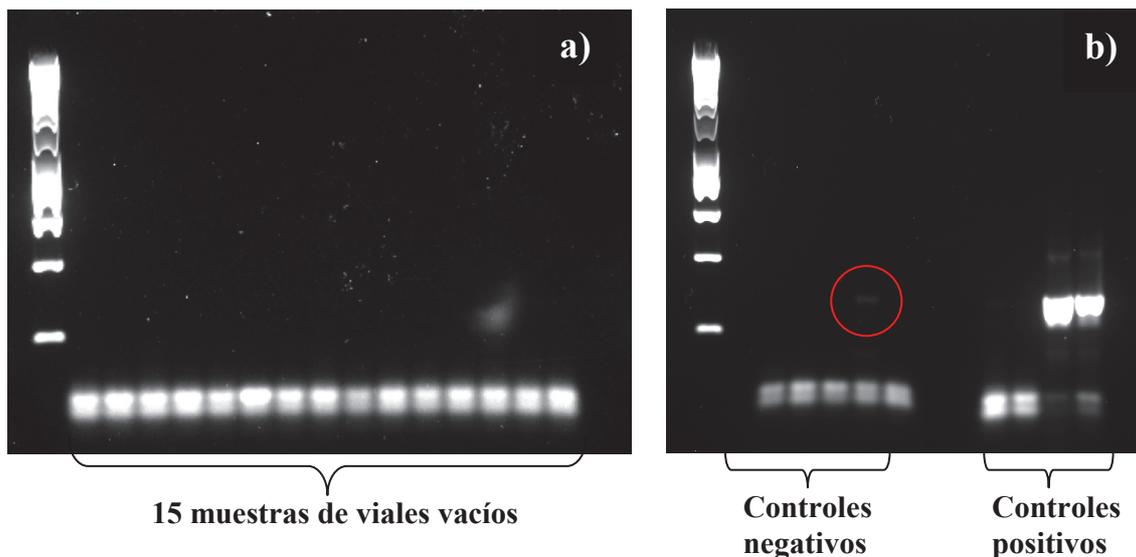


Figura 5.18. Resultado del ensayo nº 2 de detección de fuente de contaminación. En el panel a) se muestra los resultados de la PCR de los viales vacíos, en los que no se observa amplificación. En el panel b) se muestran los resultados de la misma reacción de PCR para los controles negativos y positivos. El círculo rojo muestra la presencia de amplificación en uno de los cinco controles negativos de PCR.

Estudio nº3: De las 137 réplicas controles negativos de PCR llevados a cabo en los diferentes ensayos de amplificación de este capítulo, 44 réplicas presentaron amplificación mientras que 93 de ellas no presentaron amplificación. Por lo tanto el porcentaje de contaminación en la etapa de PCR se estableció en un 32,11%. Además hay que destacar que la contaminación sigue un patrón de aparición aleatorio, ya que en algunos casos aparecen todos los controles negativos de la reacción contaminados, mientras que en otras reacciones solo hay contaminación en alguno de ellos (por ejemplo en 1 de 2 o en 1 de 5).

5.3.5. Detección de ADN de polen de olivo en individuos de campo.

Los resultados de la electroforesis realizada mostraron amplificación en 3 de las 6 réplicas de fitoseidos recogidos en campo y posteriormente lavados (Fig. 5.19). Por otro lado no se encontró amplificación en ninguno de los 5 controles de la extracción ni de los 5 controles negativos de PCR, lo que valida la amplificación del ADN de olivo hallado en el interior de los fitoseidos del campo. Sin embargo sí se obtuvo amplificación en los dos controles del lavado, que se correspondieron a fitoseidos recubiertos de polen de olivo y posteriormente lavados, lo cual indica que el lavado no fue efectivo.

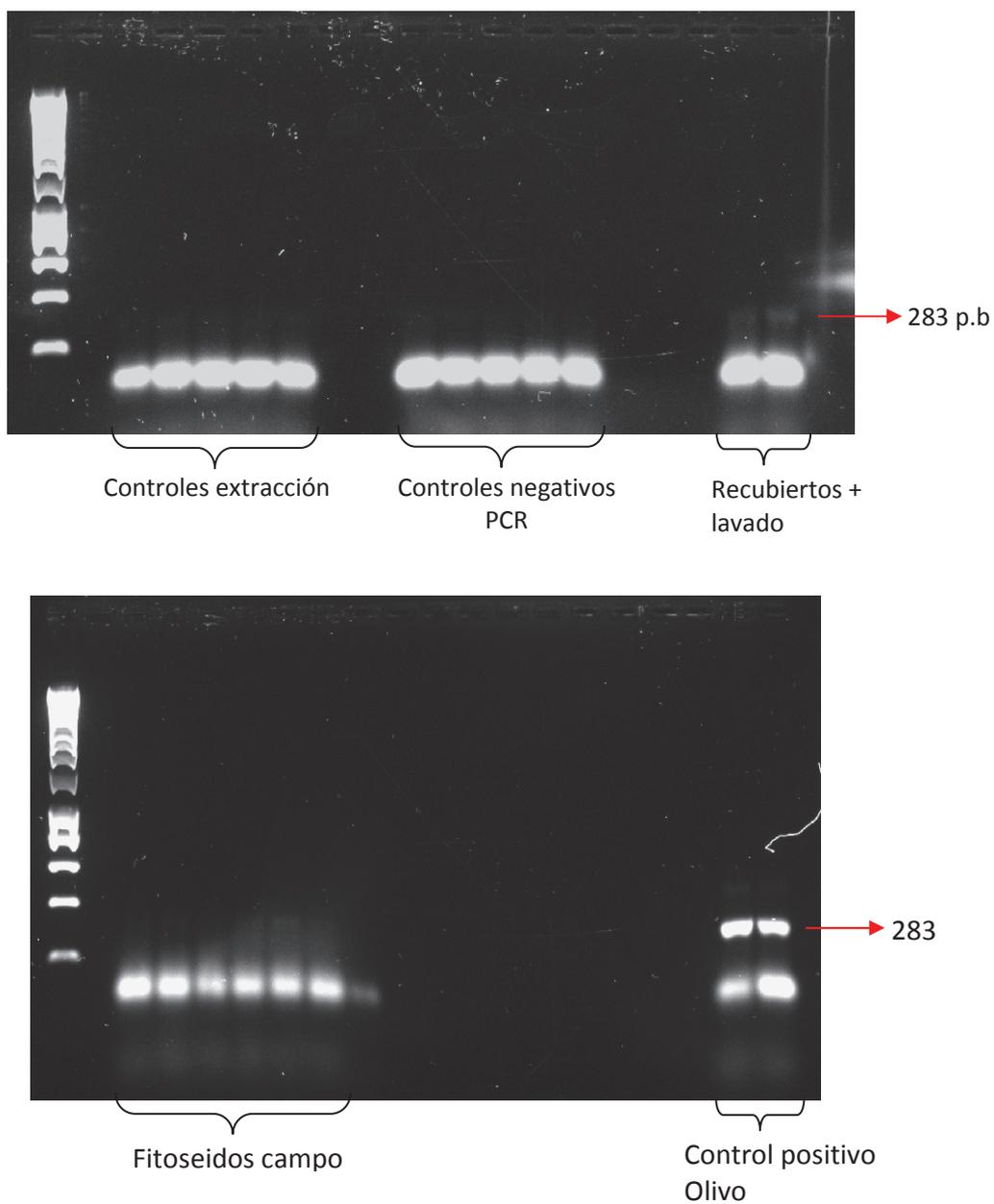


Figura 5.19. Detección de ADN de polen de olivo en individuos recogidos en campo y sus respectivos controles.

5.4 Discusión

Detección de polen en el interior del tracto digestivo de ácaros fitoseidos:

El objetivo principal de este trabajo fue poner a punto un método basado en la técnica de PCR que permitiera la detección del ADN de polen de olivo ingerido por ácaros fitoseidos, para poder demostrar, de manera directa, que la comunidad de fitoseidos que habitan en el agro-ecosistema del aguacate sigue una dinámica a nivel de meta-ecosistema. Para ello, en este trabajo diseñó, por un lado, la pareja de cebadores OLE 1A-F y OLE 1C-R capaz de amplificar ADN de diversas variedades de *O. europaea* (e.g. Picholine, Menara, Lucio, Picual, Loaime, Hojiblanca, Arbequina y Bella de España), generando una banda específica con un tamaño inferior a 300 pares de bases, lo que permite mejorar la eficacia del método de detección ya que ésta disminuye a medida que aumenta el tamaño de la banda esperada (Agustí et al. 1999b).

Por otro lado, se diseñó y desarrolló un proceso de lavado del exoesqueleto de los ácaros fitoseidos que fue efectivo con tres soluciones de lavado (cada una con hipoclorito sódico a distintas concentraciones más un detergente) permitiendo eliminar los granos de polen que hayan podido quedar adheridos a su superficie. La solución de lavado más idónea es la que contiene menor concentración de hipoclorito sódico (la número 11- Tabla 5.1) En estudios previos se han descrito otros métodos de eliminación de contaminantes externos, como hongos exógenos antes de proceder a la detección de hongos endosimbiontes en psílidos (Meyer & Hoy, 2008), restos de plantas de la superficie externa de diversos insectos herbívoros (Matheson et al. 2008), o restos de hongos sobre ácaros oribátidos (Remén et al. 2010) antes de evaluar sus hábitos alimenticios mediante PCR. Sin embargo estos métodos no resultaron eficaces para el lavado de ácaros fitoseidos, de forma que en este trabajo se desarrolló el método citado anteriormente que sí resultó efectivo.

En cuanto al método de detección, se ha conseguido amplificar, y por tanto detectar, ADN de polen de olivo en el interior de los ácaros fitoseidos alimentados con dicho polen bajo condiciones controladas de laboratorio (en 4 de 5 muestras, Fig. 5.16) y también en el interior de ácaros fitoseidos recogidos en campo (3 de 6 muestras, Fig. 5.19). La detección de polen en el tracto digestivo de ácaros fitoseidos mediante PCR es un trabajo que no había sido realizado hasta la fecha, ya que estudios previos se centraron en la detección de presa animal en el interior de diversos artrópodos

depredadores (no ácaros) (Chen et al. 2000, Hoogendoorn & Heimpel, 2001, Agustí et al. 2003a, 2003b, Jarman et al. 2004, Sheppard et al. 2005, Sint et al. 2011, Quan et al. 2011, Romeu-Dalmau et al. 2012) y también en ácaros fitoseidos (Pérez-Sayas et al. 2011). En Matheson et al. (2008) se buscó detectar ADN de origen vegetal en el tracto digestivo de insectos herbívoros, pero dichos insectos se alimentaban de tejidos de diversas plantas, no del polen producido.

Lamentablemente, estos resultados de detección no pueden considerarse totalmente fiables debido a la aparición de contaminaciones. La primera contaminación se observó en las dos muestras de fitoseidos que nunca habían estado en contacto con polen de olivo (Fs1 y Fs2): en un primer ensayo de PCR con ADN de estas dos muestras no hubo amplificación en ninguna de las dos, que era lo esperado (Fig. 5.15). Sin embargo en un segundo ensayo *con estas mismas dos muestras* sí hubo amplificación en ambas (Fig. 5.16). Al detectar este resultado anómalo se realizaron los 3 estudios del ensayo de detección de fuente de contaminación. En estos ensayos se llegaron a las siguientes conclusiones: existe claramente una contaminación, que ocurre tanto en la etapa de extracción de ADN como en el proceso de PCR. Esta contaminación tiene un carácter aleatorio, sin seguir un patrón claro de aparición, sino que incluso, en una misma reacción de PCR, puede darse en algunos controles negativos mientras que en otros no. El porcentaje de contaminación se calculó en un 32,11% de las muestras. Como es sabido, la amplificación de cantidades muy pequeñas de ADN está obstaculizada por problemas de contaminación. La gravedad de estos problemas está inversamente relacionado con la concentración de ADN y puede ocurrir como (i) contaminación de muestras (ii) contaminación de las superficies del laboratorio (iii) contaminación cruzada (e.g la difusión de aerosoles desde una muestra positiva a una muestra negativa) (iv) contaminación de los reactivos (Champlot et al. 2010). Además en estudios de la dieta de pequeños organismos basados en ADN hay graves riesgos de que cualquier ADN externo al organismo pueda producir contaminación generando una amplificación, y por tanto un falso positivo, asumiendo erróneamente que la amplificación viene de ADN del interior del organismo (O'Rorke et al. 2013). En nuestro caso se procuró seguir las recomendaciones de buenas prácticas de laboratorio para evitar contaminación (Neumaier et al. 1998, King et al. 2008) en cuanto a los métodos de esterilización (autoclave, luz ultravioleta), la disposición del laboratorio, el manejo de las muestras, el almacenaje de los reactivos etc. Asimismo, la recolección de

los individuos se realizó de manera manual, siguiendo la recomendación de no utilizar métodos de recolección masiva (e.g métodos de succión) (King et al. 2012) que puedan llevar a contaminación de la superficie externa de los individuos. Además en el diseño de los experimentos se incluyeron todo tipo de muestras control, como se detalló en los materiales y métodos de este capítulo. Estas muestras control son fundamentales, ya que permitieron la detección de la contaminación, lo que de alguna manera minimiza el error, ya que el mayor peligro no es la contaminación en sí, sino que ésta sea subestimada o ignorada, llevando a resultados equivocados (Champlot et al. 2010). A pesar de nuestros esfuerzos por corregir y evitar esta contaminación, ésta se siguió produciendo. Como se comentó anteriormente es un problema muy común en estudios de amplificación de ADN, y más aún de ADN proveniente de la dieta, habiendo un listado muy amplio de las posibles fuentes de contaminación. A pesar de que no descartamos ninguna de estas fuentes, nuestra hipótesis, basándonos en el carácter aleatorio de la contaminación, es que la presencia tan cercana al área de trabajo de árboles de olivo hace imposible que ésta se halle libre de polen de *O. europaea*. En Andalucía hay aproximadamente 1.5 millones de hectáreas de cultivo de olivo (Estudio del Sector agrario en Andalucía 2011, Junta de Andalucía) y el polen de *O. europaea* es un polen anemófilo de muy pequeño tamaño (20-22 μm), por lo que puede ser transportado a lo largo de largas distancias por el viento (Addison et al. 2000). De hecho, se han encontrado volúmenes de hasta 1350 granos de polen de olivo/m³ de aire en un captador de polen que fue instalado a 1.5 m del suelo en el interior de una de las parcelas de aguacate del IHSM-La Mayora (M. Montserrat, datos sin publicar). Todo ello podría explicar que el polen de olivo presente en el ambiente pueda contaminar las muestras a lo largo de todo el año, ya que aunque el polen de olivo se halle en grandes cantidades entre los meses de marzo a septiembre según el calendario polínico de Málaga (Recio et al. 1998), hay estudios que han detectado este polen en épocas alejadas de la floración, como por ejemplo en época de cosecha (en Málaga de noviembre a marzo) de las distintas variedades de aceituna (García-Sánchez 2012). Existen varios estudios en los que se detecta el contenido de esporas fúngicas en muestras de aire mediante métodos de amplificación por PCR (Calderon et al. 2002 y referencias en el texto) por lo que creemos probable que los granos de polen presentes en el ambiente del laboratorio, a pesar de extremar las precauciones, puedan estar produciendo la contaminación de las muestras analizadas.

Para poder llevar a cabo una detección fiable de ADN de polen de olivo del interior de los ácaros fitoseidos en campo y así determinar la posible existencia de un meta-ecosistema olivo-aguacate, creemos que sería conveniente repetir los ensayos detallados en este capítulo en un laboratorio que se encuentre en un área no expuesta a polen de olivo.

Conexión entre ecosistemas

En el caso de obtener amplificaciones fiables de ADN de olivo en muestras de fitoseidos recogidos en campo, podríamos confirmar de manera directa que las poblaciones de fitoseidos en los árboles de aguacate se sostienen por la llegada de recursos externos al ecosistema en el que habitan. Con ello se demostraría que los ecosistemas pueden afectarse unos a otros a través de interacciones tróficas que cruzan los límites de los ecosistemas. Como se ha dicho anteriormente, en los trabajos experimentales publicados se comparan dos sistemas iguales en el que en uno de ellos se permite el intercambio con otro sistema, mientras que en el otro no. Por ejemplo, Janssen et al. (1997) demostraron que la persistencia del sistema depredador-presa compuesto por la araña roja *Tetranychus urticae* y su depredador específico *Phytoseiulus persimilis* aumentaba cuando se conectaron poblaciones locales mediante puentes. Como ya se ha mencionado, en nuestro sistema experimental este tipo de manipulación es imposible, ya que no se puede impedir la entrada de polen atmosférico en las parcelas experimentales, por lo que se hace necesario recurrir a métodos moleculares. En este trabajo se han sentado las bases para poder llevarlo a cabo.

Aplicaciones prácticas

Cuando la especie plaga es escasa en el cultivo, la población de depredadores necesita de una fuente de alimento alternativa para su mantenimiento y reproducción (Kuusk & Agustí, 2008). McMurtry & Croft (1997) clasifican a los ácaros de la familia *Phytoseiidae* en cuatro grupos en función de sus hábitos alimenticios. Los ácaros de género *Euseius* estudiados en este trabajo pertenecen como único género al grupo IV, compuesto de depredadores generalistas, especialistas en polen, y es con dicho alimento con el que alcanzan su máximo potencial reproductivo. Este género contiene sobre 200 especies descritas que se encuentran preferentemente en hábitats arbóreos tropicales y subtropicales. El incremento de las poblaciones de las especies de *Euseius* puede correlacionarse más con la deposición de polen sobre las hojas de los cultivos que con la

presencia de cualquier presa (McMurtry & Croft 1997). Por otro lado, el grupo III incluye depredadores generalistas que también pueden incluir el polen en su dieta, el cual es un alimento óptimo para algunas especies. Dentro de estos dos grupos se incluyen muchas especies que se comercializan como agentes de control biológico, como *Euseius swirski* y algunas especies del género *Typhlodromus* y *Amblyseius*. Sin embargo, hay muchas especies que también tienen un importante papel en la regulación de las plagas pero que no se hallan disponibles comercialmente. Este es el caso de *E. stipulatus*, del que se conoce su papel regulador de, por ejemplo, una de las dos plagas más importantes en cítricos, el ácaro *Panonychus citri* (Ferragut et al. 1992, Abad-Moyano et al. 2009), o del ácaro cristalino *O. perseae* en aguacate (González-Fernández et al. 2009). Lo mismo ocurre con la especie *E. scutalis* distribuída ampliamente en el norte de África (Marruecos y Algeria) y en Oriente Medio (Líbano, Jordania, Israel, Egipto, Irán y Turquía), además de en el sur de España e India (Bonfour & McMurtry 1987, Satar et al. 2013) donde está presente en cultivos de alta importancia económica (algodón y aguacate entre otros) y controla algunas plagas de tetraníquidos y de mosca blanca (Bonfour & McMurtry 1987).

Una manera de optimizar el uso de estas especies que no se comercializan para el control biológico podría ser averiguar cual es su alimento principal cuando las poblaciones de la presa local son bajas. Como se sabe que muchas de estas especies consumen el polen de las plantas de, por ejemplo, la cubierta vegetal de los cultivos (Aguilar-Fenollosa et al. 2011), una aplicación práctica del estudio llevado a cabo en este trabajo podría ser:

- a) Prospeccionar las especies de plantas que se encuentran tanto en la cubierta del cultivo como en sus alrededores.
- b) Desarrollar cebadores específicos para la detección del ADN de las especies de plantas halladas en la prospección como se propone en este trabajo.
- c) Recolectar depredadores fitoseidos en el cultivo de estudio y posteriormente utilizar el método de lavado de hipoclorito sódico al 0,2 % y Tween 20 al 1% desarrollado para eliminar restos de polen de su esqueleto externo.
- d) Llevar a cabo el método de detección mediante PCR con los individuos recolectados y lavados para conocer qué especie/s están presentes en su dieta.

Una vez determinadas las especies de plantas más consumidas por los fitoseidos depredadores, el siguiente paso podría ser la siembra de dichas plantas para mantener

las poblaciones de enemigos naturales a altas densidades y de esta forma conseguir un óptimo control de las especies plaga.

Conclusiones

Conclusiones:

- 1) 1.1. La adición de polen comercial disuelto en agua sobre los árboles de aguacate generó una respuesta numérica en las poblaciones de ácaros fitoseidos, la cual tuvo un efecto opuesto en la tasa de crecimiento de las poblaciones del ácaro cristalino. Sin embargo el efecto numérico de la presencia de polen sobre los depredadores se dio solamente durante la primera mitad del verano y no se tradujo en un incremento de la abundancia total de la población de depredadores, ni en un mejor control del ácaro cristalino.
1.2. Se observó un efecto de las condiciones abióticas (temperatura y humedad relativa) sobre la tasa de crecimiento de las poblaciones de los depredadores y de la presa, siendo este efecto más acusado en los depredadores. Temperaturas por encima de sus valores críticos provocan que ambas poblaciones disminuyan. Por tanto concluimos que las condiciones abióticas pueden ser cruciales para el éxito del control biológico de plagas, sobretodo en áreas más sensibles al calentamiento global.
- 2) Las condiciones abióticas afectaron a los parámetros individuales relacionados con la eficacia biológica de las especies de *Euseius* de nuestro sistema, tales como la tasa de oviposición, la supervivencia de las hembras y la de su descendencia. El efecto fue diferente entre las dos especies: la sensibilidad al aumento de las temperaturas fue mucho mayor en *E. stipulatus* que en *E. scutalis*, y la humedad relativa fue muy importante para la primera especie pero no tanto para la segunda. Los resultados son una evidencia más de que *E. scutalis* es una especie mejor adaptada a condiciones extremas de altas temperaturas y bajas humedades relativas que *E. stipulatus*.
- 3) 3.1. Tanto a condiciones “cálidas-secas” como a “óptimas” se observó depredación recíproca entre individuos de *E. stipulatus* y de *E. scutalis* en ausencia del recurso común, polen de *C. edulis*. La magnitud de esta interacción es similar entre ambas especies y a ambas condiciones abióticas. Sin embargo en presencia del recurso común es probable que la IGP no se dé sino que la interacción predominante sea la competencia, encontrándose el módulo comunitario de cadena trófica, con los juveniles de ambas especies alimentándose de polen.

- 3.2. Los IG-depredadores de ambas especies presentaron una mayor tasa de oviposición cuando se alimentaron de polen de *C. edulis* que alimentándose solo de la presa intragremial. El beneficio energético que los individuos obtienen del polen es mucho mayor que el que obtienen de la IG-presa.
- 4) Las condiciones abióticas influyen en la habilidad competitiva relativa de *E. stipulatus* y *E. scutalis*.
- 4.1. Por separado y a condiciones “óptimas” ambas especies parecen explotar el recurso con similar eficiencia. En cambio a “cálidas-secas” la población de *E. scutalis* alcanzó valores más altos que la de *E. stipulatus*.
- 4.2 Cuando ambas especies se hallaban juntas, a condiciones “cálidas-secas” la especie dominante es *E. scutalis*, creemos debido a su superioridad en la explotación del recurso por ser una especie adaptada a dichas condiciones. En cambio a condiciones “óptimas”, domina *E. stipulatus*, una especie mediterránea, que por ser probablemente la especie residente, impide la colonización de *E. scutalis* (efectos prioritarios)
- 5) 5.1 El método de lavado consistente en 3 lavados de 6 minutos cada uno con la solución de hipoclorito sódico 0.2% y Tween 20 1% es efectivo en la eliminación de granos de polen adheridos al exoesqueleto de ácaros fitoseidos.
- 5.2 Mediante la pareja de cebadores OLE1A-F y OLE 1C-R diseñada en este trabajo, válida para la amplificación de un fragmento de 283 pares de bases de la secuencia que codifica para la proteína OLE e 1 de *Olea europaea*, se consiguió amplificar ADN de olivo del interior de ácaros fitoseidos depredadores bajo condiciones controladas y bajo condiciones de campo. Sin embargo, las contaminaciones producidas (tanto en los procesos de extracción de ADN como en las reacciones de PCR), creemos debidas al polen de olivo presente en la atmósfera, no permitieron validar estos resultados. Para ello sería necesaria la repetición de los experimentos en áreas geográficas no expuestas a polen de olivo.

Bibliografía

Bibliografía

- Abad-Moyano R., Pina T., Dembilio O., Ferragut F & Urbaneja A. (2009) Survey of natural enemies of spider mites (*Acari: Tetranychidae*) in citrus orchards in eastern Spain. *Experimental and Applied Acarology* Volume: 47 Issue: 1 Pages: 49-61
- Abad-Moyano R., Urbaneja A., & Schausberger P. (2010). Intraguild interactions between *Euseius stipulatus* and the candidate biocontrol agents of *Tetranychus urticae* in Spanish clementine orchards: *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. *Experimental and applied acarology*, 50(1), 23-34.
- Abbassy M. R., Hendy H. H., Mowafi M. H., & Nawar M. A. (2012). Biology of *Euseius scutalis* (*Acari: Phytoseiidae*) on *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (*Acari: Tetranychidae*) at different temperatures. *Acarines*, 6, 15-19.
- Abdallah A.A., Zhang Z.-Q., Masters G.J. & McNeill S. (2001). *Euseius finlandicus* (*Acari: Phytoseiidae*) as a potential biocontrol agent against *Tetranychus urticae* (*Acari: Tetranychidae*): life history and feeding habits on three different types of food. *Exp. Appl. Acarol.* 25: 833–847.
- Abou-Setta M.M. & Childers C.C. 1987. Biology of *Euseius mesembrinus* (*Acari: Phytoseiidae*): life tables on ice plant pollen at different temperatures with notes on behavior and food range. *Exp. Appl. Acarol.* 3: 123–130.
- Abou-Setta M.M. & Childers C.C. 1989. Biology of *Euseius mesembrinus* (*Acari: Phytoseiidae*): life tables and feeding behavior on tetranychid mites in citrus. *Environ. Entomol.* 18: 665–669.
- Addison JA, Hardman JM & Walde SJ. (2000). Pollen availability for predaceous mites on apple: spatial and temporal heterogeneity. *Exp. Appl. Acarol.* 24:1–18
- Aguilar-Fenollosa, E., Ibáñez-Gual, M.V., Pascual-Ruiz, S., Hurtado, M. & Jacas, J.A. (2011). Effect of ground-cover management on spider mites and their phytoseiid natural enemies in clementine mandarin orchards (I): top-down regulation mechanisms. *Biological Control.* 59(2), 158-170.
- Agustí N, De Vicente MC, Gabarra R (1999b) Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. *Molecular Ecology*, 8, 1467–1474.
- Agustí, N., Unruh, T.R. & Welter, S.C. (2003a) Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts using COI mitochondrial markers. *Bulletin of Entomological Research* 93, 179–185.
- Agustí N., Shayler S. P., Harwood J. D., Vaughan I. P., Sunderland K. D., & Symondson W. O. C. (2003b). Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Molecular Ecology*, 12(12), 3467-3475.

- Allaby M. (1994). *A Dictionary of Ecology*, 1^a ed. Oxford University Press, Oxford
- Amarasekare P. (2008). Coexistence of intraguild predators and prey in resource-rich environments. *Ecology* 89:2786–2797
- Amezcuca A. & Holyoak M. (2000). Empirical evidence for predator–prey source-sink dynamics, *Ecology* 81 (11) 3087–3098.
- Aponte O. & McMurtry J.R. (1997) Damage on ‘Hass’ avocado leaves, webbing and nesting behaviour of *Oligonychus perseae* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol* 21:265–272
- Arim M. & Marquet P.A. (2004) Intraguild predation: a widespread interaction related to species biology. *Ecology Letters*, 7, 557–564.
- Armstrong, W.W. (1964). Distribution of oil cells in *Persea*. Master Thesis. University of California, Riverside, CA, USA.
- Attrill M.J. (2009) Changes in coral reef ecosystems as an indicator of climate and global change. In: Letcher T (ed) *Climate change: observed impacts on planet Earth*. Elsevier B.V, Amsterdam
- Bakker F.M., Klein M.E., Mesa N.C. & Braun A.R. (1993) Saturation deficit tolerance spectra of phytophagous mites and their phytoseiid predators on cassava. *Experimental and Applied Acarology* 17: 97–113.
- Bale J.S., van Lenteren J.C. & Bigler F., (2008). Biological control and sustainable food production. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 761–776.
- Barbar Z. (2013). Survey of phytoseiid mite species (Acari: Phytoseiidae) in citrus orchards in Latakia governorate, Syria. *Acarologia*, 53(3), 247-261.
- Begon M., Harper J.L., Townsend C.R (1986). *Ecology: individuals, populations and communities*. Pages: 1-876
- Berg M.P., Kiers E.T., Driessen G., van der Heijden M., Kooi B.W., Keunen F., Liefjing M., Verhoef H.A. & Ellers J. (2010). Adapt or disperse: understanding species persistence in a changing world. *Glob. Change Biol.* 16, 587–598.
- Berkvens N., Bonte J., Berkvens D., Deforce K., Tirry L. & De Clercq P. (2008). Pollen as an alternative food for *Harmonia axyridis*. *BioControl* 53, 201–210.
- Beveridge O.S., Humphries S. & Petchey, O.L. (2010). The interacting effects of temperature and food chain length on trophic abundance and ecosystem function. *J. Anim. Ecol.* 79, 693–700.
- Bounfour, M. & McMurtry J.A. (1987). Biology and ecology of *Euseius scutalis* (Athias-Henriot) (Acarina: Phytoseiidae). *Hilgardia* 55(5): 23 pp.

- Boughton D.A (1999). Empirical evidence for complex source-sink dynamics with alternative states in a butterfly metapopulation. *Ecology*, 80: 2727-2739.
- Bouras S.L. & Papadoulis G.T. (2005) Influence of selected fruit tree pollen on life history of *Euseius stipulatus* (Acari: Phytoseiidae). *Exp Appl Acarol* 36:1–14
- Brodeur, J. & Rosenheim, J. A. 2000. Intraguild interactions in aphid parasitoids. *Entomol. Exp. Appl.* 97: 93-108
- Broufas G. D., Pappas M. L., & Koveos D. S. (2007). Development, survival, and reproduction of the predatory mite *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) at different constant temperatures. *Environmental entomology*, 36(4), 657-665.
- Brown M. & Mathews S. (2008). Conservation biological control of spirea aphid, *Aphis spiraeicola* (Hemiptera: Aphididae) on apple by providing natural alternative food resources. *Eur. J. Entomol.* 105 (3), 537–540.
- Buitenhuis R., Shipp L., & Scott-Dupree C. (2010). Intra-guild vs extra-guild prey: effect on predator fitness and preference of *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) and *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans)(Acari: Phytoseiidae). *Bulletin of entomological research*, 100(2), 167.
- Calderon C., Ward E., Freeman J., & McCartney A. (2002). Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Journal of Aerosol Science*, 33(2), 283-296.
- Cagan L., Tancik J. & Hassan S.A. (1998). Natural parasitism of European corn borer eggs *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lep., Pyralidae) by *Trichogramma* in Slovakia-need for field releases of the natural enemy. *Journal of Applied Entomology* 122, 315–318.
- Cagnolo L., Molina S.I. & Valladares G.R., (2002). Diversity and guild structure of insect assemblages under grazing and exclusion regimes in a montane grassland from Central Argentina. *Biodivers. Conserv.* 11, 407–420.
- Champlot, S., Berthelot, C., Pruvost, M., Bennett, E. A., Grange, T., & Geigl, E. M. (2010). An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS One*, 5(9), e13042.
- Chase R. D., Abrams P. A., Grover J., Diehl S., Holt R. D., Richards S., Case T., Wilson W., Nisbet R. & Chesson P. (2002) The influence between predation and competition: a review and synthesis. *Ecol. Lett.* 5, 302–315
- Chen Y, Giles KL, Payton ME & Greenstone MH (2000) Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Molecular Ecology*, 9, 1887–1898.
- Coll M & Hughes L. (2008). Effects of elevated CO₂ on an insect omnivore: a test for nutritional effects mediated by host plants and prey. *Agriculture Ecosystems and Environment* 123, 271–279.

Consejería de Agricultura y Pesca (2006). Memoria de los trabajos realizados dentro del plan de actuación del convenio de producción integrada en aguacate, 2005. Informe no publicado. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Departamento de Sanidad vegetal de Málaga 131pp.

Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía (2009). Memoria anual 2009. Disponible en:
<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/servicios/estadisticas/>

Consejería de Agricultura y Pesca 2012. Boletín bimestral de información agraria nº217. Disponible en:
<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/servicios/estadisticas/>

Consejería de Agricultura y Pesca 2013. Observatorio de precios. Ficha del aguacate 2011/2012. Disponible en:
<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio>

Davey R. B. (1988). Effect of temperature on the ovipositional biology and egg viability of the cattle tick *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & applied acarology*, 5(1-2), 1-14.

DeBach P. (1964) Biological control of insect pests and weeds. London, UK: Chapman and Hall.

DeCourcy-Williams M.E., Kravar-Garde L. & Fenlon J.S. & Sunderland, K.D. 2004. Phytoseiid mites in protected crops: the effect of humidity and food availability on egg hatch and adult life span of *Iphiseius degenerans*, *Neoseiulus cucumeris*, *N. californicus* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). *Exp. Appl. Acarol.* 32, 1–13.

De Moraes G.J., McMurtry J.A., Denmark H.A. & Campos C.B (2004) A revised catalog of the family *Phytoseiidae*. *Zootaxa* 434:1–494

Desneux N. & O'Neil R.J. (2008). Potential of an alternative prey to disrupt predation of the generalist predator, *Orius insidiosus*, on the pest aphid, *Aphis glycines*, via short-term indirect interactions. *Bull. Entomol. Res.* 98, 631–639.

de Vis R. M. J., de Moraes G. J., & Bellini M. R. (2006). Effect of air humidity on the egg viability of predatory mites (Acari: Phytoseiidae, Stigmaeidae) common on rubber trees in Brazil. *Experimental & applied acarology*, 38(1), 25-32.

Díaz Robledo J. (1997) Historia del aguacate español. Ediciones Eilea. Madrid, España.

Diehl S. & Feissel M. (2000). Effects of enrichment on three-level food chains with omnivory. *Am. Nat.* 155: 200-218.

Diehl S. & Feissel M. (2001). Intraguild prey suffer from enrichment of their resources: A microcosm experiment with ciliates. *Ecology* 82: 2997-2983.

- Duek L., Kaufman G., Palevsky E. & Berdicevsky I. (2001). Mites in fungal cultures. *Mycoses* 44:390–394.
- Dunson W.A. & Travis J. (1991) The role of abiotic factors in community organization. *Am. Nat.* 138, 1067–1091
- Edwards M. (2009) Sea life (pelagic and planktonic ecosystems) as an indicator of climate and global change. In: Letcher T (ed) *Climate change: observed impacts on planet Earth*. Elsevier B.V, Amsterdam
- EEA (2007) Europe's environment-The fourth assessment. Chapter 3. European Environmental Agency, Copenhagen.
- El-Taj H.F. & Jung C. (2012). Effect of temperature on life-history traits of *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) fed on *Panonychus ulmi*. *Exp. Appl. Acarol.* 56, 247–260.
- Faraji, F., Janssen A. & Sabelis M.W., (2002). Oviposition patterns in a predatory mite reduce the risk of egg predation caused by prey. *Ecol. Entomol.* 27(6): 660– 664.
- Ferragut F., García-Mari F., Costa-Comelles J. & Laborda R. (1987). Influence of food and temperature on development and oviposition of *Euseius stipulatus* and *Typhlodromus phialatus* (Acari. Phytoseiidae). *Exp. Appl. Acarol.* 3, 317–329.
- Ferragut F., Laborda R., Costa-Comelles J., & Garcia-Mari F. (1992). Feeding behavior of *Euseius stipulatus* and *Typhlodromus phialatus* on the citrus red mite *Panonychus citri* [Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae]. *Entomophaga*
- Ferragut, F. & Escudero, A. (1997) Taxonomía y distribución de los ácaros depredadores del género *Euseius* Wainstein 1962, en España (Acari: Phytoseiidae). *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 23, 227–235.
- Ferragut F, Pérez Moreno I, Iraola V, Escudero A (2010) Ácaros depredadores en las plantas cultivadas. Familia *Phytoseiidae*. Ed. Agrotécnicas. Madrid. Spain.
- Ferrero M., Gigot C., Tixier M.S., van Houten Y.M. & Kreiter S. (2010). Egg hatching response to a range of air humidities for six species of predatory mites. *Entomol. Exp. Appl.* 135, 237–244.
- Fiedler W. (2009) Bird ecology as an indicator of climate and global change. In: Letcher T (ed) *Climate change: observed impacts on planet Earth*. Elsevier B.V, Amsterdam
- Finke D. L., & Denno R. F. (2006). Spatial refuge from intraguild predation: implications for prey suppression and trophic cascades. *Oecologia*, 149(2), 265-275.
- Flechtmann, C. H., & McMurtry, J. A. (1992). Studies on how phytoseiid mites feed on spider mites and pollen. *International journal of acarology*, 18(3), 157-162.

- Frank S.D., Shrewsbury P.M. & Denno R.F. (2011). Plant versus prey resources: influence on omnivore behaviour and herbivore suppression. *Biol. Control* 57, 229–235.
- Fundación MADECA (2013) Fundación Málaga Desarrollo y Calidad. Observatorio socioeconómico. Fichas territoriales. Axarquía. Disponible en: <http://www.fundacionmadeca.es/fichas-estadisticas-territoriales>
- Gadino A. N., & Walton V. M. (2012). Temperature-related development and population parameters for *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) found in Oregon vineyards. *Experimental and Applied Acarology*, 58(1), 1-10.
- Gagnon A. È., Heimpel G. E. & Brodeur J. (2011). The ubiquity of intraguild predation among predatory arthropods. *PloS one*, 6(11), e28061.
- García-Sánchez J. (2012) Estudio de los principales aeroalérgenos de la atmósfera de Málaga. Relación con el contenido polínico y con los parámetros meteorológicos. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga (España).
- Gause G. F. (1934). *The Struggle for Existence*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Ghazy N.A., Suzuki T., Shah M., Amano H. & Ohyama K. (2012). Using high relative humidity and low air temperature as a long-term storage strategy for the predatory mite *Neoseiulus californicus* (Gamasidae: Phytoseiidae). *Biol. Control* 60, 241–246.
- Gilman S.E., Urban M.C., Tewksbury J., Gilchrist G.W. & Holt R.D. (2010) A framework for community interactions under climate change. *Trends Ecol Evol* 25:325–331
- González-Fernández J.J, de la Peña F., Hormaza J.I., Boyero J.R., Vela J.M., Wong E., Trigo M.M. & Montserrat M. (2009). Alternative food improves the combined effect of an omnivore and a predator on biological pest control. A case study in avocado orchards. *Bulletin of entomological research*, volume 99, issue 05, pp. 433-444
- Guderley H. (1998). Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle. In: Portner, H.O., Playle, R. (Eds.), *Cold Ocean Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 58–87
- Gutiérrez J. (1985) Mounting techniques. In: Helle W, Sabelis M (eds) *Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control*, volumen 1A. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 351–353
- Hagler J.R & Naranjo S.E (1997). Measuring the sensitivity of an indirect predator gut content ELISA: detectability of prey remains in relation to predator species, temperature, time, and meal size. *Biological control* 9, 112–119
- Hairston N.G., Smith F.E. & Slobodkin L.B. (1960) Community structure, population control, and competition. *American Naturalist* 94: 421–425.

- Hamman-Khalifa A. , Castro A.J, Jiménez-López J.C, Rodríguez-García M.I & Alché J.D. (2008). Olive cultivar origin is a major cause of polymorphism for Ole e 1 pollen allergen. *BMC Plant Biology* 8:10
- Hansky, I. & Gilpin, M. (1991). Metapopulation Dynamics: Brief History and Conceptual Domain, *Biol. J. Linn. Soc.*, vol. 42, pp. 3–16.
- Hatherly I. S., Bale J. S., & Walters K. F. (2005). Intraguild predation and feeding preferences in three species of phytoseiid mite used for biological control. *Experimental & applied acarology*, 37(1-2), 43-55.
- Hayward S. A., Rinehart J. P., & Denlinger D. L. (2004). Desiccation and rehydration elicit distinct heat shock protein transcript responses in flesh fly pupae. *Journal of Experimental Biology*, 207(6), 963-971.
- Hazel J.R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Ann.Rev. Physiol.* 57, 19–42.
- HilleRisLambers R. & Dieckmann U. (2003) Competition and predation in simple food webs: intermediately strong trade-offs maximize coexistence. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 270, 2591–2598
- Hille Ris Lambers R. & de Roos A.M (2005) Community structure, species coexistence, and the balance between direct and indirect interactions. Chapter 1 of Persistence of omnivory. PhD Dissertation R. Hille Ris Lambers, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.
- Hin V., Schellekens T., Persson L., & de Roos A. M. (2011). Coexistence of predator and prey in intraguild predation systems with ontogenetic niche shifts. *The American Naturalist*, 178(6), 701-714.
- Hoffmann, A.A. & Sgrò C.M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470, 479–485.
- Holt R.D. (1977). Predation, apparent competition, and the structure of prey communities. *Theor. Popul. Biol.* 12, 197–229
- Holt R.D. (1997). Community modules. Pages 333-350 in M. Begon, A. Gange, & V. Brown, eds. *Multitrophic interactions in terrestrial systems* .
- Holt R.D., & Polis G.A. (1997). A theoretical framework for interguild predation. *American Naturalist* 149:745-764.
- Holt R.D. & Huxel G.R. (2007). Alternative prey and the dynamics of intraguild predation: theoretical perspectives. *Ecology* 88, 2706–2712.
- Hoogendoorn M & Heimpel GE (2001) PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-I fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology*, 10, 2059–2068.

- Hughes L. (2000). Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends Ecol. Evol.*, 15, 56–62.
- Humphries M.M. (2009) Mammal ecology as an indicator of climate change. In: Letcher T (ed) *Climate change: observed impacts on planet Earth*. Elsevier B.V, Amsterdam
- IPCC (2007): *Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático* [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 104 págs.
- IPCC (2013) *Climate Change 2013. The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Summary for Policymakers*. Disponible en www.ipcc.ch y en www.climatechange2013.org.
- Jacas J. & Urbaneja A. (2008) Tipos de control biológico y métodos para su implementación. En *Control biológico de plagas agrícolas*. Ed M.V Phytoma-España, Valencia. Págs 15-24.
- Janssen A., van Gool, E., Lingeman R., Jacas J., van de Klashorst G. (1997) Metapopulation dynamics of a persisting predator-prey system in the laboratory: time series analysis. *Experimental & Applied Acarology* Volume: 21 Issue: 6-7 Pages: 415-430
- Janssen A., Sabelis M.W., Magalhaes S., Montserrat M. & van der Hammen, T. (2007) Habitat structure affects intraguild predation. *Ecology*, 88, 2713–2719.
- Jarman S.N., Deagle B.E. & Gales N.J. (2004) Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Molecular Ecology*, 13, 1313–1322
- Jervis M. A., Kidd N. A. C. & Walton M. (1992) A review of methods for determining dietary range in adult parasitoids. *Entomophaga* 37 (4), 565-574
- Johnston I.A. (1990). Cold adaptation in marine organisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 326, 655–667.
- Kasap I. & Sekeroglu E. (2004). Life history of *Euseius scutalis* feeding on citrus red mite *Panonychus citri* at various temperatures. *Biocontrol*, 49: 645:654.
- Kasap İ. (2009a). Influence of temperature on life table parameters of the predaceous mite *Euseius finlandicus* (Oudemans)(Acari: Phytoseiidae). *Turk. J. Agr. For.*, 33(1), 29-36.
- Kasap I. (2009b). The biology and fecundity of the citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor)(Acari: Tetranychidae) at different temperatures under laboratory conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(6), 593-600.

- King R.A, Read D.S, Traugott M & Symondson W.O.C (2008) Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology*, 17, 947–963.
- Knight, T. M., McCoy, M. W., Chase, J. M., McCoy, K. A., & Holt, R. D. (2005). Trophic cascades across ecosystems. *Nature*, 437(7060), 880-883.
- Krebs R. A. & Loeschke V. (1994). Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, 730-737.
- Kregel K. C. (2002). Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, 92(5), 2177-2186.
- Kuusk A.K & Agusti N (2008) Group-specific primers for DNA-based detection of springtails (*Hexapoda: Collembola*) within predator gut contents. *Molecular Ecology Resources* 8, 678–681
- Kuusk A.K. & Ekbom B. (2010). Lycosid spiders and alternative food: feeding behavior and implications for biological control. *Biol. Control* 55, 20–26.
- Kuijper L. D. J., Kooi B. W., Zonneveld C. & Kooijman S. (2003). Omnivory and food web dynamics. *Ecol. Model.* 163: 19-32.
- Landis D.A., Wratten S.D. & Gurr G.M. (2000). Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology* 45, 175–201.
- Leibold M.A. Holyoak, Mouquet N., Amarasekare P., Chase J.M., Hoopes M.F., Holt R.D, Shurin J.B., Law R., Tilman D., Loreau M. & Gonzalez A. (2004). The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters*, 7: 601–613
- Letcher T.M. (2009). *Climate Change: Observed Impact on Planet Earth*, 1st ed. Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Liu Z., & Zhang F. (2013). Species coexistence of communities with intraguild predation: The role of refuges used by the resource and the intraguild prey. *Biosystems*, 114(1), 25-30.
- Lotka A.J. (1932). The growth of mixed populations: Two species competing for a common food supply. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 22: 461–469.
- Loreau M, Mouquet N & Holt RD (2003). Meta-ecosystems: a theoretical framework for a spatial ecosystem ecology. *Ecology Letters*, 6: 673–679
- Loreau M. (2004). Does functional redundancy exist?. *Oikos*, 104(3), 606-611.

- Lucas E., Frechette B. & Alomar O. (2009). Resource quality, resource availability, and intraguild predation among omnivorous mirids. *Biocontrol Sci. Techn.* 19, 555–572.
- Maoz Y., Gal S., Argov Y., Coll M. & Palevski E. (2011). Biocontrol of perseid mite, *Oligonychus perseae*, with an exotic spider mite predator and an indigenous pollen feeder. *Biol. Control* 59, 147–157.
- MARM, 2011. Anuario de Estadística del Ministerio de de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Disponible en:
<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2009/indice.asp>
- Matheson C.D., Müller G., Junnila A., Vernon K., Hausmann A., Miller M.A., Greenblatt C. & Schlein Y. (2008). A PCR method for detection of plant meals from the gut of insects. *Organisms Diversity Evolution* 7, 294e303.
- McMurtry J. A. (1977). Some predaceous mites [*Phytoseiidae*] on citrus in the Mediterranean region. *Entomophaga*, 22(1), 19-30.
- McMurtry J.A. & Croft B.A., (1997). Life-styles of Phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 291–321.
- McMurtry J.A. & Rodriguez J. (1987). Nutritional ecology of phytoseiid mites. In: Slansky F. And Rodriguez J. (eds), *Nutritional Ecology of Insects, Mites and Spiders*. John Wiley & Sons, New York, pp. 609–644.
- MacRae I. V., & Croft B. A. (1997). Intra-and interspecific predation by adult female *Metaseiulus occidentalis* and *Typhlodromus pyri* (*Acari: Phytoseiidae*) when provisioned with varying densities and ratios of *Tetranychus urticae* (*Acari: Tetranychidae*) and phytoseiid larvae. *Experimental & applied acarology*, 21(4), 235-246.
- Magalhaes S, Tudorache C, Montserrat M, van Maanen R, Sabelis MW & Janssen A (2005) Diet of intraguild predators affects antipredator behavior in intraguild prey. *Behav Ecol* 16(2):364–370
- Memmott J., Craze P.G., Waser N.M. & Price M.V. (2007). Global warming and the disruption of plant–pollinator interactions. *Ecol. Lett.*, 10, 710–717.
- 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.
- Messelink G.J., van Maanen,R., van Holstein-Saj R., Sabelis M.W. & Janssen A. (2010). Pest species diversity enhances control of spider mites and whiteflies by a generalist phytoseiid predator. *BioControl* 55, 387–398.
- Meyer, J.M. & Hoy, M.A., (2008). Removal of fungal contaminants and their DNA from the surface of *Diaphorina citri* (*Hemiptera: Psyllidae*) prior to a molecular survey of endosymbionts. *Florida Entomologist* 91, 702e705.

- Montserrat, M., Janssen, A., Magalhaes, S., & Sabelis, M. W. (2006). To be an intraguild predator or a cannibal: is prey quality decisive?. *Ecological entomology*, 31(5), 430-436
- Montserrat, M., Bas, C., Magalhães, S., Sabelis, M. W., de Roos, A. M., & Janssen, A. (2007). Predators induce egg retention in prey. *Oecologia*, 150(4), 699-705.
- Montserrat M., Magalhaes S., Sabelis M.W., de Roos A.M. & Janssen A. (2008) Patterns of exclusion in an intraguild predator-prey system strongly depend on initial conditions. *Journal of Animal Ecology* 77, 624–630.
- Montserrat M., de la Peña F., Hormaza J.I. & González-Fernández J.J. (2008) How do *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) females penetrate densely webbed spider mite nests? *Experimental and Applied Acarology* 44,101–106.
- Montserrat M., Magalhaes S., Sabelis M.W., De Roos A.M. & Janssen A. (2012) Invasion success in communities with reciprocal intraguild predation depends on the stage structure of the resident population. *Oikos*, 121, 67–76.
- Montserrat M., Ma Sahún R. & Guzmán C. (2013a) Can climate change jeopardize predator control of invasive herbivore species? A case study in avocado agroecosystems in Spain. *Exp Appl Acarol* 59: 27-42
- Montserrat M., Guzman C., Sahun R. M., Belda J.E & Hormaza J.I (2013b) Pollen supply promotes, but high temperatures demote, predatory mite abundance in avocado orchards. *Agriculture Ecosystems & Environment* 164: 155-161
- Morecroft M.D. & Keith S.A. (2009) Plant ecology as an indicator of climate and global change. In: Letcher T (ed) *Climate change: observed impacts on planet Earth*. Elsevier B.V, Amsterdam
- Morin P. J. (1999). Productivity, intraguild predation, and population dynamics in experimental foodwebs. *Ecology* 80: 752-760.
- Moseley P. L. (1997). Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *Journal of applied physiology*, 83(5), 1413-1417
- Musser F.R. & Shelton A.M. (2003). Predation of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) eggs in sweet corn by generalist predators and the impact of alternative foods. *Environ. Entomol.* 32 (5), 1131–1138.
- Murray, R.A. & Solomon, M.G. (1978) A rapid technique for analysing diets of invertebrate predators by electrophoresis. *Annals of Applied Biology* 90, 7–10.
- Mylius S. D., Klumpers K., de Roos A. M. & Persson L. (2001). Impact of omnivory and stage structure on food web composition along a productivity gradient. *Am. Nat.* 158: 259-276
- Neumaier M., Braun A., & Wagener C. (1998). Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry*, 44(1), 12-26.

- Nomikou M., Janssen A., Schraag R. & Sabelis M.W. (2001). Phytoseiid predators as potential biological control agents for *Bemisia tabaci*. *Exp. Appl. Acarol.* 25: 271–291.
- Nomikou M., Janssen A., Schraag R. & Sabelis M.W. (2002). Phytoseiid predators suppress populations of *Bemisia tabaci* on cucumber plants with alternative food. *Exp. Appl. Acarol.* 27, 57–68.
- Nomikou M., Janssen A. & Sabelis M.W. (2003). Phytoseiid predator of whitefly feeds on plant tissue. *Experimental and Applied Acarology* Volume: 31 Issue: 1-2 Pages: 27-36
- Nomikou M., Janssen A. & Sabelis M.W. (2010). Pollen subsidies promote whitefly control through the numerical response of predatory mites. *BioControl* 55, 253–260.
- Novak M. (2013). Trophic omnivory across a productivity gradient: intraguild predation theory and the structure and strength of species interactions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1766).
- Oksanen L., Fretwell S.D., Arruda J. & Niemela P. (1981) Exploitation ecosystems in gradients of primary productivity. *American Naturalist* 118(2), 240–261.
- Onzo A., Hanna R., Negloh K., Toko M., & Sabelis M. W. (2005). Biological control of cassava green mite with exotic and indigenous phytoseiid predators— effects of intraguild predation and supplementary food. *Biological control*, 33(2), 143-152.
- O'Rourke R., Jeffs A. G., Fitzgibbon Q., Chow S. & Lavery S. (2013). Extracting DNA from whole organism homogenates and the risk of false positives in PCR based diet studies: A case study using spiny lobster larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 441, 1-6.
- Overmeer W.P.J., (1985). Alternative prey and other food resources. In: Helle, W., Sabelis, M.W. (Eds.), *Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier, Amsterdam, pp. 131–139. Vol. 1B
- Pelini S.L., Prior K.M., Parker D.J, Dzurisin J.D.K, Lindroth R.L & Hellmann J.J (2009) Climate change and temporal and spatial mismatches in insect communities. In: Letcher T (ed) *Climate change: observed impacts on planet Earth*. Elsevier B.V, Amsterdam.
- Pérez-Sayas C., Hurtado M.A., Gómez-Martínez M.A., Ibáñez-Gual M.V., Simó A., Jacas J.A. & Pina, T. (2013) ¿Quién se come a quién? El análisis molecular del contenido intestinal de los ácaros fitoseidos permite desvelar las interacciones tróficas de la acarofauna de cítricos. VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada.
- Pimm S. L. & Lawton J. H. (1978). On feeding on more than one trophic level. *Nature* 333.
- Platt-Aloia K.A. & Thompson W.W. (1992). Idioblast oil cells of avocado: Distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry, and biochemistry. *International Journal of Plant Sciences* 153, 301–310.

- Platt-Aloia K.A., Gross J.W. & Thompson W.W. (1983). Ultrastructure and development of oil cells in mesocarp of avocado fruit. *Botanical Gazette* 144, 49–55
- Polis G. A., Myers C. A., & Holt. R. D. (1989). The ecology and evolution of intraguild predation-potential competitors that eat each other. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 20: 297-330.
- Polis G.A. & Holt R.D. (1992) Intraguild predation – the dynamics of complex trophic interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 7, 151–154.
- Polis GA; Anderson WB and Holt R.D. (1997). Toward an integration of landscape and food web ecology: The dynamics of spatially subsidized food webs. *Annual review of ecology and systematics* Volume: 28 Pages: 289-316.
- Pozzebon A., Loeb G.M.& Duso C. (2009). Grape powdery mildew as a food source for generalist predatory mites occurring in vineyards: effects on life-history traits. *Ann. Appl. Biol.* 155, 81–89.
- Quan X., Wu L., Zhou Q., Yun Y., Peng Y., & Chen J. (2011). Identification of predation by spiders on the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Bulletin of Insectology*, 64(2), 223-227.
- Raza A. B. M., Afzal M., & Bashir M. H. (2005). Biology of *Euseius septicus* Chaudhari (*Acari: Phytoseiidae*) preying on two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (*Acari: Tetranychidae*) at different temperatures. *Pak. Entomol.* 27(1), 85-88.
- Recio M., Cabezudo B., Trigo M. M., & Toro F. J. (1998). Pollen calendar of Malaga (Southern Spain), 1991–1995. *Aerobiologia*, 14, 101–107.
- Reichstein B., Schröder A., Persson L., & Roos A. M. (2013). Habitat complexity does not promote coexistence in a size structured intraguild predation system. *Journal of Animal Ecology*, 82(1), 55-63.
- Remén C, Kruger M & Cassel-Lundhagen A (2010) Successful analysis of gut contents in fungal-feeding oribatid mites by combining body-surface washing and PCR. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1952–1957.
- Rodríguez-Saoana C., Millar J.G. & Trumble J.T. (1997). Growth inhibitory, insecticidal, and feeding deterrent effects of (12Z,15Z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15,-diene, a compound from avocado fruit, to *Spodoptera exigua*. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1819–1831.
- Rodríguez-Saoana C., Millar J.G., Maynard D.F. & Trumble J.T. (1998) Novel antifeedant and insecticidal compounds from avocado idioblast cell oil. *Journal of Chemical Ecology* 24, 867–889.

- Rodríguez-Saoana C. & Trumble J.T. (2000). Secretory avocado idioblast oil cells: evidence of their defensive role against non-adapted insect herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 94, 183–194.
- Rogers SO & Bendich AJ (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* 5:69–7
- Romeu-Dalmau C., Piñol J., & Agustí N. (2012). Detecting aphid predation by earwigs in organic citrus orchards using molecular markers. *Bulletin of entomological research*, 102(05), 566-572.
- Romero GQ & Srivastava DS (2010). Food-web composition affects cross-ecosystem interactions and subsidies. *Journal of Animal Ecology*, 79: 1122-1131.
- Rosenheim J.A., Kaya H.K., Ehler L.E., Marois J.J. & Jaffee B.A. (1995) Intraguild predation among biological control agents – theory and evidence. *Biological Control*, 5, 303–335.
- Roy M., Brodeur J., & Cloutier C. (2003). Effect of temperature on intrinsic rates of natural increase (rm) of a coccinellid and its spider mite prey. *Biocontrol*, 48(1), 57-72.
- Rudolf V. H. & Armstrong J. (2008). Emergent impacts of cannibalism and size refuges in prey on intraguild predation systems. *Oecologia*, 157(4), 675-686.
- Rozen S & Skaletsky H (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*;132
- Sabelis M.W. (1985). Development. In: W. Helle and M.W. Sabelis (Editors), Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control World Crop Pests Vol. IB. Elsevier, Amsterdam, pp.43-53
- Sabelis, M.W. & Janssen, A. (1994). Evolution of life history patterns in the Phytoseiidae. In: Life History and Reproductive Patterns of Mites, M.A. Houck (ed.), pp. 70–97. Chapman & Hall, New York.
- Saito Y. (1985) Life types of spider mites. In: Helle, W., Sabelis, M.W. (Eds.), Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier, Amsterdam, pp. 253-264. Vol. 1A
- Sanchez J.A., Gillespie D.R. & McGregor R.R. (2003). The effects of mullein plants (*Verbascum thapsus*) on the population dynamics of *Dicyphus hesperus* (Heteroptera: Miridae) in tomato greenhouses. *Biol. Control* 28, 313–319
- Satar S., Ada M., Kasap İ., & Çobanoğlu S. (2013). Acarina fauna of citrus trees in eastern Mediterranean region of Turkey. *IOBC-WPRS Bulletin*, 95, 171-178.
- Schausberger P. (1998). The influence of relative humidity on egg hatch in *Euseius filandicus*, *Typhlodromus pyri* and *Kampimodromus aberrans* (Acari, Phytoseiidae). *Journal of Applied Entomology*, 122(1-5), 497-500.

- Schausberger P. (1999). Juvenile survival and development in *Euseius finlandicus*, *Typhlodromus pyri* and *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) feeding on con- and heterospecific immatures. *Experimental & applied acarology*, 23(4), 297-307.
- Schausberger P & Croft BA (2000) Cannibalism and intraguild predation among phytoseiid mites: are aggressiveness and prey preference related to diet specialization? *Exp Appl Acarol* 24:709–725.
- Schellekens T. & van Kooten T. (2012). Coexistence of two stage-structured intraguild predators. *Journal of Theoretical Biology*, 308, 36-44.
- Schröder A., Nilsson K. A., Persson L., Van Kooten T., & Reichstein B. (2009). Invasion success depends on invader body size in a size-structured mixed predation–competition community. *Journal of Animal Ecology*, 78(6), 1152-1162.
- Shchekinova E. Y., Löder M. G., Boersma M., & Wiltshire K. H. (2013). Facilitation of intraguild prey by its intraguild predator in a three-species Lotka–Volterra model. *Theoretical population biology*.
- Sheppard SK, Bell J, Sunderland KD *et al.* (2005) Detection of secondary predation by PCR analyses of the gut contents of invertebrate generalist predators. *Molecular Ecology*, 14, 4461–4468
- Silbermann R. & Tatar M. (2000). Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54: 2038–2045
- Sint D, Raso L, Diger Kaufmann R.U & Traugott M. (2011) Optimizing methods for PCR-based analysis of predation. *Molecular Ecology* 20: 111–122.
- Snyder W.E. & Evans E.W. (2006). Ecological effects of invasive arthropod generalist predators. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37,95–122.
- Spellman B., Brown M.W., Mathews C.R. (2006). Effect of floral and extrafloral resources on predation of *Aphis spiraecola* by *Harmonia axyridis* on apple. *Bio-Control* 51, 715–724.
- Stavriniades M.C., Daane K.M., Lampinen B.D. & Mills N.J. (2010). Plant water stress, leaf temperature, and spider mite (Acari: Tetranychidae) outbreaks in California vineyards. *Environ. Entomol.* 39 (4), 1232–1241.
- Stireman J.O., Dyer L.A., Janzen D.H., Singer M.S., Lill J.T., Marquis R.J., Ricklets R.E., Gentry G.L., Hallwachs W., Coley P.D., Barone J.A., Greeney H.F., Connahs H., Barbosa P., Morais H.C. & Diniz I.R. (2005). Climatic unpredictability and parasitism of caterpillars: implications of global warming. *Proceedings of the National Academy of Science* 102, 17384–17387
- St.-Pierre J., Charest P.-M. & Guderley H. (1998). Relative contribution of quantitative and qualitative changes in mitochondria to metabolic compensation during seasonal acclimatisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 201,2961–2970.

- Storelli C., Acierno R., Maffia M. (1998). Membrane lipids and protein adaptations in Antarctic fish. In: Portner, H.O., Playle, R. (Eds.), Cold ocean physiology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 166–189.
- Swirski E., & Amitai S. (1997). Annotated list of phytoseiid mites (*Mesostigmata: Phytoseiidae*) in Israel. *Israel Journal of Entomology*, 31, 21-46.
- Symondson W. O. C. (2002). Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology* 11, 627–641
- Szabó Á., Ripka G., Hajdu Z., Tempfli B., Varga M., Mészáros I. & Péntes B. (2013). New data on the mesostigmatid mite fauna of Hungary (Acari: Mesostigmata). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 48(1), 149-154.
- Tammariello S. P., Rinehart J. P., & Denlinger D. L. (1999). Desiccation elicits heat shock protein transcription in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* but does not enhance tolerance to high or low temperatures. *Journal of insect physiology*, 45(10), 933-938.
- Tiku P.E., Gracey A.Y., Macartney A.I., Beynon R.J., Cossins A.R. (1996). Cold-induced expression of D9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271, 815–818.
- Tilman, D. (1982). Resource Competition and Community Structure.(MPB-17) (No. 17). Princeton University Press.
- Tittler R., Fahrig L & Villard M.A (2006) Evidence of large-scale source–sink dynamics and long-distance dispersal among wood thrush populations *Ecology* 87:12, 3029-3036
- Tsoukanas V. I., Papadopoulos G. D., Fantinou A. A., & Papadoulis G. T. (2006). Temperature-dependent development and life table of *Iphiseius degenerans* (Acari: Phytoseiidae). *Environmental entomology*, 35(2), 212-218.
- Tylianakis J.M, Didham R.K, Bascompte J. & Wardle D.A (2008) Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11(12):1351–1363
- Ulmasov K. A., Shammakov S., Karaev K., & Evgen'Ev M. B. (1992). Heat shock proteins and thermoresistance in lizards. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1666–1670.
- Van de Wolfshaar K. E., De Roos A. M., & Persson L. (2006). Size dependent interactions inhibit coexistence in intraguild predation systems with life history omnivory. *The American Naturalist*, 168(1), 62-75.
- van der Geest, L. P. S. & Overmeer, W. P. J. (1985). Experiences with polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the detection of gut contents of phytoseiid mites. *Med. Fac. Landbouw.Rijksuniv. Gent*, 50, 469-471

- Van Dinh N., Sabelis M. W., & Janssen A. (1988). Influence of humidity and water availability on the survival of *Amblyseius idaeus* and *A. anonymus* (Acarina: Phytoseiidae). *Experimental & applied acarology*, 4(1), 27-40.
- Van Driesche R.G, Hoddle MS & Center T.D (2007) Control de plagas y malezas por enemigos naturales. The Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET)
- Van Rijn P.C.J & Tanigoshi L.K. (1999). Pollen as food for the predatory mites *Iphiseius degenerans* and *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae): dietary range and life history. *Exp. Appl. Acarol.* 23:785–802
- Van Rijn P. C. J., van Houten Y. M., & Sabelis M. W. (2002). How plants benefit from providing food to predators even when it is also edible to herbivores. *Ecology* 83:2664–2679.
- Vela J.M., González-Fernández J.J, Wong E., Montserrat M., Farré J.M. & Boyero J.R. (2007). El ácaro del aguacate (*Oligonychus perseae*): Estado actual del problema e investigación en Andalucía. *Agrícola Vergel* 306, 301–308.
- Verhulst P.E. (1838) Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Correspondance Mathématique et Physique*, 10 pp. 113–117
- Villalba, M., Rodríguez, R., & Batanero, E. (2013). The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods*.
- Voigt W., Perner J., Davis A.J., Eggers T., Schumacher J., Bahrmann R., Fabian B., Heinrich W., Kohler G., Lichter D., Marstaller R. & Sander F.W. (2003). Trophic levels are differentially sensitive to climate. *Ecology* 84 (9), 2444–2453.
- Vollhardt I.M.G., Bianchi F.J.J.A., Wäckers F.L., Thies C. & Tschardt T. (2010). Spatial distribution of flower vs. honeydew resources in cereal fields may affect aphid parasitism. *Biol. Control* 53, 204–213.
- Volterra V. (1926). Fluctuations in the abundance of a species considered mathematically. *Nature*, 118, 558-560.
- Walzer A., Castagnoli M., Simoni S., Liguori M., Palevsky E. & Schausberger P.(2007). Intraspecific variation in humidity susceptibility of the predatory mite *Neoseiulus californicus*: survival, development and reproduction. *Biol. Control* 41, 42–52.
- Wesner J.S. (2010). Aquatic predation alters a terrestrial prey subsidy. *Ecology*, 91: 1435-1444

Anexos

ANEXO I

Protocolo de obtención de polen de *Carpobrotus edulis* como alimento para crías de *E. stipulatus* y *E. scutalis*

1. Recolección diaria en campo de flores de *C. edulis* color púrpura durante los meses de primavera (marzo y abril).
2. Procesado de las flores recogidas: primero se retiran los sépalos y pétalos a mano (Fig. 1). A continuación se extraen los estambres con una pinza y se colocan en placas de Petri de vidrio (Fig. 2).
3. Secado de los estambres en estufa a 37°C durante 48 h.
4. Tamizado: Se coloca el tamiz más grueso sobre el más fino. Se vierten los estambres secos sobre el primer tamiz de 0.25 mm de luz de rejilla, y con un pincel grueso (núm. 22) se realizan movimientos circulares (Fig. 3). Se realiza otro tamizado en el segundo tamiz, de luz más pequeña 0.075 mm, para separar los restos vegetales (Fig. 4) y se obtiene el polen (Fig. 5).
5. Almacenaje del polen en frascos de plástico (Fig. 6) y mantenimiento en refrigerador a 4°C.



Figura 1. Flor de *C. edulis* con parte de pétalos y sépalos retirados. Estambres en el interior.



Figura 2. Estambres en placa de Petri.



Figura 3. Tamizado con tamiz de 0.25 mm de luz de rejilla.



Figura 4. Segundo tamizado.



Figura 5. Obtención del polen



Figura 6. Almacenado del polen

ANEXO II

Protocolo de montaje de arenas experimentales

1. Preparación del aro de plástico: Realizar el corte de una placa de Petri plástica con un soldador (Figuras 1-2), según el diámetro interno elegido (4 cm, 6.5 cm o 12 cm) en función del tipo de experimento. Recubrir el aro con plástico transparente (Fig. 3) para facilitar su limpieza al finalizar el experimento.



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

2. Colocar una tira de plastilina sobre el borde interno del aro plástico (Fig. 4). En la cara interna del aro alisar la plastilina (Fig. 5) y poner pegamento de barra sobre ella (Fig. 6).



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6

3. Adherir el disco de hoja de aguacate limpio a la plastilina. La limpieza del disco se realiza con un pincel bajo lupa binocular. El envés de la hoja debe estar dirigido hacia el exterior (Fig. 7)



Fig. 7

4. Colocar en contacto con el disco de hoja de aguacate un disco de goma espuma del diámetro de la placa de Petri recubierto con algodón húmedo. También se puede usar un disco de espuma floral, sobretodo para discos de diámetro pequeño (4 cm). Situar la tapa plástica de la placa de Petri (Fig. 8) y cerrar con parafilm® (Fig. 9)



Fig. 8



Fig. 9

5. Con la base de un pincel presionar la plastilina para unirla al disco de hoja (Fig. 10). Con una jeringuilla aplicar una barrera del compuesto tanglefoot® en la unión entre la hoja y la plastilina (Fig. 11). Para mantener la turgencia de la hoja añadir agua con ayuda de una jeringuilla y aguja (Fig. 12). Realizar este último paso cada dos días.



Fig. 10



Fig. 11



Fig. 12

