UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Contribuciones para la optimización del manejo de *Orius (Orius) laevigatus* y *Anthocoris nemoralis* (Hemiptera: Anthocoridae) como agentes de control biológico de plagas
Autor/es
Luis Rubén Román Fernández
Director/es
Ignacio Pérez Moreno y Vicente Santiago Marco Mancebón
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico

Contribuciones para la optimización del manejo de *Orius (Orius) laevigatus* y *Anthocoris nemoralis* (Hemiptera: Anthocoridae) como agentes de control biológico de plagas, tesis doctoral de Luis Rubén Román Fernández, dirigida por Ignacio Pérez Moreno y Vicente Santiago Marco Mancebón (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2017
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Departamento de Agricultura y Alimentación

“Contribuciones para la optimización del manejo de *Orius (Orius) laevigatus* y *Anthocoris nemoralis* (Hemiptera: Anthocoridae) como agentes de control biológico de plagas”

TESIS DOCTORAL

Luis Rubén Román Fernández 2017

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Departamento de Agricultura y Alimentación

“Contribuciones para la optimización del manejo de *Orius (Orius) laevigatus* y *Anthocoris nemoralis* (Hemiptera: Anthocoridae) como agentes de control biológico de plagas”

Memoria presentada por Luis Rubén Román Fernández para optar al grado de doctor por la Universidad de La Rioja

Programa de Doctorado en Ecosistemas Agrícolas Sostenibles

Fdo.: Luis Rubén Román Fernández

Vº Bº del Director

Vº Bº del Director

Fdo.: Vicente S. Marco Mancebón

Fdo.: Ignacio Pérez Moreno

La presente tesis doctoral se ha llevado a cabo en el laboratorio de Protección de Cultivos del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja con una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador de La Universidad de La Rioja (FPI-UR/2012).

On ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux.

Antoine de Saint-Exupéry. Le petit prince

If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants.

Sir Isaac Newton

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN GENERAL……1

1. Desarrollo Sostenible y Manejo Integrado de Plagas 1

2. El Control Biológico en el contexto del Manejo Integrado de Plagas..... 5

2.1. Los antocóridos como organismos de Control Biológico 7

2.1.1. El género Orius en Control Biológico de Plagas 8

2.1.2 .El género Anthocoris en Control Biológico de Plagas 10

3. Especies de estudio: *Orius laevigatus* y *Anthocoris nemoralis* 12

3.1. Orius (Orius) laevigatus (Fieber, 1860) 12

3.1.1. Posición taxonómica 12

3.1.2. Descripción..... 13

3.1.3. Hábitat y distribución geográfica 18

3.2. *Anthocoris nemoralis* (Fabricius, 1794) 20

3.2.1. Posición taxonómica 20

3.2.2. Descripción..... 20

3.2.3. Hábitat y distribución geográfica 25

OBJETIVOS……..……29

CAPÍTULO I. Modelos matemáticos para la predicción del desarrollo de O*rius laevigatus* en función de la temperatura 29

1. Introducción 29

1.1. Modelos de relación tasa de desarrollo-temperatura 31

1.2. Método de grados día como instrumento de predicción 33

2. Materiales y métodos 34

2.1. Cría masiva de Orius laevigatus 34

2.2. Ensayos de laboratorio 35

2.2.1. Temperaturas constantes..... 35

2.2.2. Temperaturas variables 37

2.2.3. Validación del modelo 38

2.3. Métodos estadísticos 39

2.3.1. Modelización y modelos de desarrollo 39

2.3.2. Análisis estadísticos 42

3. Resultados 43

3.1. Efecto de la temperatura sobre la mortalidad 43

3.2. Tiempo y tasa de desarrollo 44

3.3. Estimación y ajuste de los modelos a temperaturas constantes 47

3.3.1. Modelo lineal 48

3.3.2. Modelo de Logan tipo III..... 49

3.3.3. Modelo de Lactin 50

3.3.4. Modelo de Brière 51

3.4. Temperaturas variables 52

3.5. Validación del modelo..... 52

4. Discusión 54

CAPÍTULO II. Efectos secundarios de productos fitosanitarios sobre *Anthocoris nemoralis* 57

1. Introducción 57

1.1. Contaminación de los enemigos naturales por los productos fitosanitarios 57

1.2. Metodologías de evaluación de los efectos secundarios 58

2. Materiales y métodos 60

2.1. Productos ensayados 60

2.2. Individuos de *A. nemoralis* empleados en los bioensayos 62

2.3. Aplicación de los productos 62

2.4. Descripción de los recintos de tratamiento 64

2.5. Determinación del efecto sobre la mortalidad 65

2.6. Determinación de los efectos subletales 67

2.7. Análisis estadísticos 71

3. Resultados 72

3.1. Efecto sobre la mortalidad 72

4. Discusión 82

CAPITULO III. Ensayo de Control Biológico de *Cacopsylla pyri* mediante *Anthocoris nemoralis* en condiciones de campo 91

1. Introducción 91

1.1. Cacopsylla pyri (Linnaeus, 1761) 91

1.2. El problema de las resistencias y la disminución de la presencia de los enemigos naturales 95

1.3. Los enemigos naturales de la psila 96

1.4. Estrategia de CB de tipo inundativo con *Anthocoris nemoralis* 97

1.5. Métodos de seguimiento de la psila del peral y *Anthocoris nemoralis* 100

2. Materiales y métodos 102

2.3. Descripción de las parcelas de ensayo 102

2.4. Toma de muestras 104

2.5. Análisis estadísticos 105

3. Resultados 106

3.3. Dinámica poblacional de *C. pyri* en las parcelas del ensayo .. ……...106

3.4. Dinámica poblacional de enemigos naturales en la parcela de manejo con *A. nemoralis* 107

4. Discusión 118

CONCLUSIONES 127

BIBLIOGRAFIA 131

RESUMEN

Durante el pasado siglo se desarrolló un sistema de producción agraria intensivo y productivista. Aún en la actualidad, se utiliza este sistema, en el que la lucha química ha sido y sigue siendo la herramienta mayoritariamente utilizada en la protección contra las plagas, enfermedades y malas hierbas. El empleo masivo de algunos productos fitosanitarios, sobre todo plaguicidas neurotóxicos (generalmente poco selectivos y persistentes), ha traído consigo graves problemas que dificultan la puesta en práctica de una Agricultura Sostenible. Por ello, uno de los objetivos importantes en el contexto actual de la lucha contra las plagas, es la disminución del empleo de productos fitosanitarios. Para que ello sea posible, es necesario potenciar el uso de otros métodos de control más acordes con la Agricultura Sostenible, como es el caso del control biológico de plagas.

La familia Anthocoridae (Hemiptera) incluye varias especies utilizadas como agentes de control biológico, destacando *Orius laevigatus* y *Anthocoris nemoralis* por su amplia utilización en plantaciones comerciales de varios cultivos. *O. laevigatus* se emplea de forma habitual, desde hace varios años, para controlar las poblaciones de trips, fundamentalmente *Frankliniella occidentalis*, en diversos cultivos protegidos. Por su parte, *A. nemoralis* está adquiriendo en la actualidad una enorme importancia para controlar la plaga de mayor gravedad en el cultivo del peral, *Cacopsylla pyri*.

El conocimiento de la evolución del desarrollo de las poblaciones de los enemigos naturales, resulta fundamental para optimizar su uso en condiciones reales de cultivo. Dado que la duración de dicho desarrollo depende muy estrechamente de la temperatura, es posible predecir su evolución mediante modelos matemáticos que relacionan la tasa de desarrollo con la temperatura. Por ello, se ajustaron los modelos matemáticos no lineales Logan tipo III, Lactin y Briére, así como el modelo lineal, estimando los parámetros que los definen para el estado de huevo y los 5 estadios ninfales de *O. laevigatus*.Los modelos no lineales predijeron

adecuadamente el tiempo de desarrollo, siendo la variación respecto a la duración real observada en condiciones de exterior, inferior al 6% en el estado de huevo, según todos los modelos, e inferior al 9% para el estado ninfal, con los modelos de Logan tipo III y Lactin.

La compatibilización del empleo de productos fitosanitarios con los enemigos naturales es, en las circunstancias actuales, uno de los aspectos clave a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo con éxito un programa de control biológico de plagas. En este contexto, se determinó el efecto por contacto residual sobre sustrato inerte, en la fase de laboratorio,de los insecticidas clorpirifos, imidacloprid, azadiractina, spinetoram, spirotetramat, metoxifenocida y diflubenzurón, así como de los fungicidas mancozeb, captan, tebuconazol y trifloxistrobín, sobre la mortalidad y sobre la tasa intrínseca de crecimiento (r_m) poblacional (efectos subletales) de *A. nemoralis*. Estas materias activas están autorizadas en plantaciones comerciales de peral.Los insecticidas clorpirifos, imidacloprid y spinetoram resultaron tóxicos sobre adultos, mientras que azadiractina, spirotetramat y diflubenzurón resultaron ligeramente tóxicos, y metoxifenocida inocuo. Azadiractina y spirotetramat provocaron una reducción ligeramente significativa de la r_m. Por su parte, los fungicidas mancozeb, captan, tebuconazol y trifloxistrobin resultaron inocuos sobre los adultos. Sin embargo, trifloxistrobin produjo una drástica reducción de la r_m, presentando diferencias significativas respecto al resto de compuestos evaluados, incluidos los insecticidas, exceptuando spirotetramat.

Por último, se llevó a cabo un ensayo de campo en dos parcelas comerciales de peral pertenecientes a la Denominación de Origen Protegida Peras de Rincón de Soto y situadas en dicha localidad de La Rioja, con dos estrategias de control de *C. pyri* diferentes:1) manejo convencional de la plaga, mediante la aplicación de insecticidas; y 2) manejo mediante la incorporación del agente de control biológico *A. nemoralis*.La parcela manejada mediante la liberación del depredador presentó, en general, una densidad poblacional de *C. pyri* significativamente inferior a la encontrada en la parcela de manejo convencional, especialmente en la segunda y tercera

generación de la plaga. Por otra parte, en la parcela de manejo con *A. nemoralis* se encontró una comunidad de enemigos naturales y polinizadores diversa y abundante, mientras que en la parcela de manejo convencional su presencia fue prácticamente nula.

La incorporación de organismos de control biológico en el cultivo del peral, junto con un correcto manejo de los productos fitosanitarios y de la totalidad de técnicas de cultivo empleadas, podrían ser las claves para mantener las poblaciones de *C. pyri* en niveles tolerables y de este modo conseguir la sostenibilidad en este cultivo.

Introducción general

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Desarrollo Sostenible y Manejo Integrado de Plagas

El gran desarrollo industrial y tecnológico que se ha producido en el pasado siglo ha tenido como resultado un fuerte desarrollo económico en las actividades humanas. Sin embargo, las consecuencias negativas asociadas a este avance se han puesto de manifiesto en muchos aspectos sociales y medioambientales, tal y como se recoge en el informe titulado "Nuestro futuro común" o "Informe Brundtland" presentado en el año 1987 por la Comisión Mundial sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo en la Asamblea General de la Organización de las Naciones Unidas (Naciones Unidas, 1987). En este documento, se postuló que la protección ambiental se había convertido en un problema global y, por lo tanto, se debería afrontar igualmente de forma global. Asimismo, se acuña un nuevo término denominado Desarrollo Sostenible que ha llegado a alcanzar una enorme repercusión social.

El Desarrollo Sostenible consiste en asegurar que la humanidad satisfaga las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer las propias. Para conseguir estos objetivos es imprescindible cambiar el modelo de desarrollo actual por uno que permita conseguir un equilibrio entre la rentabilidad económica, el respeto por el medio ambiente y la justicia social (Naciones Unidas, 1987).

En el marco de la producción agraria, durante el pasado siglo se desarrolló un sistema de producción intensivo y productivista. Aún en la actualidad se utiliza este sistema, en el que la lucha química ha sido y sigue siendo la herramienta mayoritariamente empleada en la protección contra las plagas, enfermedades y malas hierbas. Ello a pesar de que, en aquellas zonas agrícolas en las que hay un mayor consumo de productos fitosanitarios, la pérdida potencial de la producción es mayor (Oerke & Dehne, 2004).

El empleo masivo de algunos productos fitosanitarios, sobre todo neurotóxicos (generalmente poco selectivos y persistentes), ha traído consigo

graves problemas que dificultan la puesta en práctica de una agricultura que contribuya a la consecución de un Desarrollo Sostenible. Entre otros, podemos citar los siguientes:

- ✓ Rápida resurgencia de poblaciones plaga
- ✓ Aumento de la importancia de plagas antes secundarias
- ✓ Aparición de resistencias
- ✓ Destrucción de fauna auxiliar
- ✓ Contaminación del suelo, agua y atmósfera
- ✓ Problemas toxicológicos para el aplicador
- ✓ Presencia de residuos en los alimentos
- ✓ Incremento de los costes económicos en la producción

Frente a este modelo productivista aparece el concepto de Agricultura Sostenible, cuyos objetivos fundamentales, según el Consejo para la Ciencia y Tecnología Agraria de los EEUU, son mantener y mejorar la calidad y productividad del suelo y del agua superficial y subterránea; conservar la energía y otros recursos naturales, así como los hábitats acuáticos y terrestres de vida salvaje; proteger la salud y seguridad de las personas implicadas en los sistemas de producción de alimentos y fibra; promover el respeto por los animales; e incrementar las oportunidades de empleo en la agricultura (Abelson, 1995). Se observa, por tanto, que la Agricultura Sostenible busca la producción agraria a largo plazo y que la variable medioambiental se considere un factor de producción tan importante como la tierra, el capital o el trabajo.

Un modo de llevar a cabo la actividad agraria productiva de modo acorde con la Agricultura Sostenible es la Producción Integrada (PI). Efectivamente, el concepto de PI aparece reseñado por primera vez en el año 1977 en un documento publicado por la Organización Internacional para la Lucha Biológica e Integrada (OILB) (Steiner *et al*., 1977). Este documento

puede considerarse como la piedra angular de la PI en Europa y recoge los primeros conceptos sobre los que asentar un modelo de Agricultura Sostenible (Boller *et al.*, 1998). Los principios y objetivos de la PI evolucionaron durante los años 80 y se formularon y publicaron por la OILB en el año 1993 por primera vez (Boller & Gendrier, 1993).

Previamente al origen de la PI, ya había surgido el concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP) como alternativa al empleo masivo de productos fitosanitarios y cuyo enfoque encuadraba perfectamente en los principios de la PI y, por tanto, de la Agricultura Sostenible. El MIP aborda el control de plagas desde la perspectiva en la que, por un lado, se da prioridad a la acción limitante del propio medio ambiente y, por otro, se incorporan otras técnicas de control compatibles entre sí y que cumplen determinadas exigencias ecológicas, toxicológicas y económicas (Dent, 1993).

Según Kogan (1998) "el MIP es el sistema de apoyo para la toma de decisiones concernientes a la selección y empleo de tácticas de control de plagas, individual o conjuntamente coordinadas dentro de una estrategia de manejo, y basado en análisis costes/beneficios que tienen en cuenta los intereses y posibles impactos sobre los productores, la sociedad y el medio ambiente".

En este contexto, el Parlamento Europeo y el Consejo adoptaron varios actos legislativos que modificaron profundamente la normativa comunitaria en materia de utilización y comercialización de productos fitosanitarios, atendiendo a lo establecido en el VI Programa Comunitario de Acción Medioambiental: la Directiva 2009/128/CE, por la que se establece el marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios, la Directiva 2009/127/CE, por la que se modifica la Directiva 2006/42/CE en lo que respecta a las máquinas para la aplicación de plaguicidas, y el Reglamento (CE) nº 1107/2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios.

El aspecto de mayor importancia, en relación con el MIP, viene dado por el artículo 14 (punto 4) de la Directiva 2009/128/CE: "Los Estados miembros describirán en sus planes de acción nacionales de qué forma garantizan que todos los usuarios profesionales aplicarán los principios generales de la gestión integrada de plagas (GIP) establecidos en el anexo III, a más tardar el 1 de enero de 2014".

En España, el RD 1311/2012 establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios y procede al desarrollo normativo de la Ley 43/2002 de Sanidad Vegetal; y a su vez traspone al ordenamiento jurídico interno la Directiva 2009/128/CE. También se ha elaborado y publicado en noviembre del año 2012 el Plan de Acción Nacional (PAN) para el uso sostenible de los productos fitosanitarios. En el anexo I del citado RD se recogen los principios generales de la GIP.

Según los principios generales de la GIP se da prioridad a las medidas preventivas o medidas indirectas de control, tales como:

- ✓ Utilización óptima de los recursos naturales.
- ✓ Eliminación de prácticas agrícolas con impacto negativo sobre el agroecosistema.
- ✓ Protección y aumento de los enemigos naturales.

Cuando las medidas preventivas o indirectas resultan insuficientes, se aplican medidas directas de protección, utilizando herramientas adecuadas de seguimiento, predicción y toma de decisiones. Entre las medidas de protección se da prioridad a aquéllas que son selectivas sobre el organismo perjudicial, como por ejemplo, el uso de depredadores, parasitoides y entomopatógenos, así como el empleo de feromonas u otros semioquímicos.

Como último recurso, se contempla la utilización de otras medidas de protección menos selectivas, entre las que se encuentra el uso de plaguicidas químicos con un mayor espectro de acción.

2. El Control Biológico en el contexto del Manejo Integrado de Plagas

Uno de los objetivos importantes en el contexto actual de la lucha contra las plagas es la potenciación del empleo del Control Biológico (CB) como instrumento incorporable al MIP. El CB está directamente relacionado con una de las mayores fuerzas ecológicas de la naturaleza: la regulación del tamaño de las poblaciones de los organismos vivos por la acción de otros, ya que todas las especies vivas se ven afectadas por enemigos naturales, además de por otras que compiten con ellas por los recursos limitados. En sentido aplicado, el Control Biológico de Plagas (CBP) es la utilización de organismos vivos para reducir las poblaciones de organismos plaga hasta niveles inferiores a los que alcanzarían en ausencia de esos organismos vivos (Van Driesche *et al.*, 2007), idealmente por debajo del Umbral Económico.

Según Van Driesche *et al.* (2007), la puesta en práctica del CBP puede ser llevada a cabo de acuerdo a diferentes estrategias:

- ✓ Inoculativa, clásica o de importación: consistente en la introducción deliberada de enemigos naturales exóticos en la zona donde está la plaga, con el objetivo de que se establezcan y dispersen para lograr un control a medio o largo plazo.
- ✓ Inundativa: basada en la recogida, cría masiva y suelta periódica en grandes números del enemigo natural para conseguir un control inmediato de la plaga.
- ✓ De conservación: que consiste en el manejo del ambiente para mejorar la eficacia de los enemigos naturales ya presentes, proporcionándoles los requisitos que necesitan para su supervivencia, como huéspedes alternativos, alimento suplementario o habilitación de refugios, y eliminando o mitigando, en la medida de lo posible, los factores que les afectan negativamente, como pueden ser el empleo de productos fitosanitarios poco selectivos o algunas prácticas culturales, como un mal manejo del suelo, entre otros.

A este respecto, cada vez está adquiriendo mayor importancia el manejo a escala paisajística. La implementación de ciertas acciones de mejora, a la vez que contribuye a la utilización del control biológico de conservación, también reporta beneficios ambientales y promueve valores intrínsecos del paisaje rural. El empleo de cubiertas vegetales, el mantenimiento de la vegetación espontánea en los bordes de las parcelas, el establecimiento de refugios o el aprovechamiento de los barbechos como praderas naturales, son algunas de las acciones de mejora que se pueden utilizar. Todas ellas están encaminadas al aumento de la biodiversidad de los agroecosistemas, dado que muchos investigadores han comenzado a reconocer el papel y la importancia que juega dicha biodiversidad en el funcionamiento de los mismos, al proporcionar una gran variedad de servicios ecosistémicos, entre ellos, los reportados por el grupo funcional de los enemigos naturales (Altieri, 1991; Hooper *et al*., 2005).

Actualmente, el CBP es una práctica en expansión. Así, hasta 2006, y en los poco más de 100 años de su existencia, se han realizado más de 5.000 introducciones de unas 2.000 especies de enemigos naturales exóticos, en 196 países o islas, y existiendo en 2006 más de 150 agentes de control biológico disponibles comercialmente (Van Lenteren *et al.*, 2006). Desde entonces y hasta el momento actual, el CPB ha ido ganando importancia a nivel mundial y en España en particular, como demostraban los más de 400 registros comerciales referidos a unas 30 especies de artrópodos que se podían emplear como organismos de control biológico y que aparecían en la base de datos del Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA) en el año 2012. Actualmente, en el registro de determinados medios de defensa fitosanitaria (MDF) del MAPAMA aparecen más de 600 entradas, dentro de los cuales se encuentran los agentes de CBP (MAPAMA, 2017).

2.1. Los antocóridos como organismos de Control Biológico

El orden de insectos Hemiptera incluye, además de fitófagos y hematófagos, especies depredadoras de importantes plagas agrícolas, siendo las pertenecientes a las familias Anthocoridae y Miridae algunas de las más estudiadas, debido, principalmente, al éxito de su uso como agentes de CB en cultivos protegidos (Jacas *et al.*, 2008).

La familia Anthocoridae incluye unos 100 géneros, con unas 500-600 especies distribuidas por todo el mundo, aproximadamente entre los paralelos 70º N y 56º S. En general, son insectos de pequeño tamaño (1,4 a 6 mm) y ocupan una gran diversidad de hábitats como flores y arbustos, bajo la corteza de árboles (vivos o muertos) frecuentemente cubiertos de musgos y líquenes, agallas producidas por áfidos, hormigueros, nidos de aves, madrigueras de mamíferos e instalaciones de almacenamiento de alimentos, entre otros. Aunque la mayoría son depredadores o zoofitófagos, algunas especies son mirmecófilas y otras se cree que son exclusivamente fitófagas. Los antocóridos depredadores suelen presentar un elevado grado de polifagia, ya que muchos de ellos pueden alimentarse de un gran número de presas, como trips, psílidos, pulgones, moscas blancas, ácaros o huevos y pequeñas larvas de lepidópteros (Saulich & Musolin, 2009).

Los hábitos depredadores de varias especies de esta familia han resultado de gran interés en el MIP, particularmente en estrategias que incluyen el CB como una de las herramientas principales, debido, fundamentalmente, a su alta eficiencia en la búsqueda de presas, su buena capacidad de dispersión y su concentración en las áreas de mayor densidad de presas, así como el gran potencial para el incremento de la población en caso de abundancia de alimento (Saulich & Musolin, 2009).

Dentro de la familia Anthocoridae destacan los géneros *Orius* Wolff, 1811 y *Anthocoris* Fallen,1814, ya que varias de sus especies (*O. laevigatus* (Fieber, 1860), *O. insidiosus* (Say 1832), *O. albidipennis* (Reuter 1884), *O. niger* (Wolff 1811), *O. majusculus* (Reuter 1879), *A. nemoralis* (Fabricius,

1794), *A. nemorum* (Linnaeus, 1761) y *A. confusus* Reuter, 1884, entre otras) aparecen de forma espontánea en numerosos cultivos, tanto al aire libre como protegidos (Jacas *et al.*, 2008) y algunas de ellas se han estudiado en profundidad para su aplicación como organismos de CBP. Como resultado de estas investigaciones y su aplicación en cultivos comerciales, hoy se dispone en el mercado de varias especies de antocóridos para su utilización con este fin.

2.1.1. El género Orius en Control Biológico de Plagas

Aunque la relación trófica existente entre algunas especies del género *Orius* y los trips es bien conocida desde hace muchos años, fue la expansión del trips de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande 1895) (Thysanoptera: Thripidae) la que indujo al desarrollo de técnicas propias de CBP aplicables a los cultivos donde la incidencia de la plaga era mayor (Ferragut & González, 1994). *F. occidentalis* es una especie muy polífaga que provoca daños directos que deprecian comercialmente los frutos debido a las manchas “plateadas” producidas por sus picaduras. Sin embargo, el mayor daño causado por este trips procede de su condición de vector del virus del bronceado del tomate (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV). En España, tras la introducción de la plaga en el año 1986, la lucha química con productos específicos resolvió el problema inicialmente, pero tras 10 años de uso, los niveles de resistencia que desarrolló este insecto contra todas las materias activas disponibles hicieron inútil el control químico.

Los primeros estudios sobre el género se llevaron a cabo a finales de los años 70 y, fundamentalmente, se centraron en la eficacia depredadora de dos especies de origen americano, *O. insidiosus* (Say, 1832) y *O. tristicolor* (White 1879), que fueron criadas en diversas biofábricas. En los años siguientes, los países de la Cuenca Mediterránea orientaron la investigación hacia especies autóctonas de este género, su posibilidad de cría masiva en laboratorio y su eficacia en el control de plagas (Ferragut & González, 1994).

Las especies del género *Orius* son conocidas por ser fitófagas facultativas (Coll, 1996; Lattin, 1999). Así, por ejemplo, *O. insidiosus*, desde sus primeros estadios ninfales, puede alimentarse de contenidos del xilema, del floema y del mesófilo, como agua, azúcares, almidón y aminoácidos (Armer *et al.*, 1998; Lundgren *et al.*, 2008), y *O. laevigatus* puede completar su desarrollo alimentándose de polen fresco de pimiento dulce (Vacante *et al.*, 1997). Este hecho supone una gran ventaja para el mantenimiento de los depredadores en el cultivo en periodos de escasez o ausencia de plaga.

A principios de los años 90, comenzaron a comercializarse varias de estas especies para su empleo en los invernaderos del sur de España como alternativa al control químico. La primera especie disponible comercialmente fue *O. insidiosus* y en el año 1993 comenzó a utilizarse *O. laevigatus*. También han sido empleadas las especies *O. albidipennis* (Reuter, 1884) y *O. majusculus* (Reuter, 1879), bien de forma aislada o junto con *O. laevigatus* (Van der Blom, 2008).

O. laevigatus se utiliza con éxito desde hace varios años para el control biológico de *F. occidentalis* en diversos cultivos protegidos hortícolas y ornamentales, tales como pimiento, pepino, fresa, melón, berenjena, rosa y gerbera. De entre todos estos cultivos destaca el pimiento, ya que el uso de *O. laevigatus* ha permitido el establecimiento de programas de MIP basados, exclusivamente, en el uso de la estrategia inundativa de CBP (Jacas *et al.*, 2008).

Las dos zonas productoras de pimiento protegido más importantes de España son la región de Murcia y la provincia de Almería, con unas 1.000 y 9.300 ha, respectivamente (MAPAMA, 2015). En el año 2008, el 100% de la producción en ambas regiones se realizaba mediante técnicas de CBP (Van der Blom, 2008); siendo *O. laevigatus* uno de los principales agentes de control.

2.1.2 .El género Anthocoris en Control Biológico de Plagas

El género *Anthocoris* comprende unas 70 especies descritas en todo el mundo, estando la mayoría de ellas asociadas a varias plantas herbáceas, árboles y arbustos (Lattin, 1999). Aunque todas las especies del género son depredadoras de artrópodos y tanto las ninfas como los adultos son polífagos, algunos estudios señalan que algunas son más restrictivas en sus hábitats y presas que otras. Así, por ejemplo, *A. minki* Dohrn, 1860 aparece solamente en el fresno común (*Fraxinus excelsior* L.); *A. sarothamni* Douglas & Scott, 1865 está asociado con la retama negra (*Cytisus scoparius* L.) Link; y *A. confusus* Reuter, 1884 prefiere un conjunto restringido de especies leñosas de hoja caduca (Anderson, 1962a). En cualquier caso, también se sabe que la mayoría de las especies de esta familia pueden ser criadas en laboratorio con presas que no son las habituales en condiciones naturales (Anderson, 1962b; Dempster, 1963; Saulich & Musolin, 2009).

Aunque en la bibliografía se encuentran diferentes trabajos evaluando la capacidad depredadora de distintas especies del género *Anthocoris* sobre varias plagas de diversos cultivos, la especie *A. nemoralis* (Fabricius, 1794) es la más ampliamente estudiada debido a su alto potencial como organismo de CB contra la psila del peral, *Cacopsylla pyri* (Linnaeus, 1761) (Hemiptera, Psyllidae). Esto es debido a su clara preferencia por alimentarse de psílidos. Anderson (1962b) señala, además, que la tasa de desarrollo ninfal es mayor cuando se alimenta de psila que cuando lo hace de otras especies en condiciones de laboratorio, y Pericart (1972) indica una preferencia por los árboles de hoja caduca, principalmente frutales.

Los psílidos constituyen una amplia familia perteneciente al suborden Sternorrhyncha, asociados a una amplia diversidad de plantas. Las principales especies asociadas al peral son *Cacopsylla pyri, C. pyricola* (Foerster, 1848) *y C. pyrisuga* (Foerster, 1848), siendo *C. pyri* la plaga más importante de este cultivo en la actualidad.

Son varios los autores que coinciden en señalar que se da una fuerte relación entre la presencia de una alta diversidad de enemigos naturales con el control de las poblaciones de insectos fitófagos (Letourneau *et al.,* 2009). Asimismo, en la bibliografía se encuentran numerosos trabajos que indican que las poblaciones de psila presentes en el peral se pueden mantener en niveles bajos por la acción de los enemigos naturales que aparecen de forma espontánea en el cultivo, siendo *A. nemoralis* el principal agente de control en la mayoría de los casos, siempre que las intervenciones químicas sean compatibles con este depredador (Brunner & Burts, 1975; Herard, 1985; Herard, 1986; Solomon *et al.*, 1989; Novak & Achtziger, 1995; Vilajeliu *et al.*, 1998; Horton, 1999; Erler, 2004; Shaltiel & Coll, 2004; Saulich & Musolin, 2009; Sánchez *et al.*, 2010; Sigsgaard, 2010; Civolani, 2012; Emami, 2017). Asimismo, en la bibliografía se pueden encontrar estudios que determinan la capacidad de control de la psila del peral utilizando una estrategia de CBP de tipo inundativo mediante *A. nemoralis* y *A. nemorum* en diferentes fases de desarrollo, desde huevo hasta adulto (Sigsgaard *et al*., 2006). Por todo ello, desde hace varios años se comercializa *A. nemoralis* como agente de CBP para el control de la psila en plantaciones comerciales de peral como alternativa al control químico convencional.

3. Especies de estudio: *Orius laevigatus* y *Anthocoris nemoralis*

3.1. *Orius (Orius) laevigatus* (Fieber, 1860)

3.1.1. Posición taxonómica

Según la última actualización de la base de datos de Fauna Europaea (Fauna Europaea 2016), *O. laevigatus* se puede ordenar taxonómicamente de la siguiente manera:

Regnum	Animalia
Subregnum	Eumetazoa
Phyllum	Arthropoda
Subphylum	Hexapoda
Clase	Insecta
Orden	Hemiptera
Suborden	Heteroptera
Infraorden	Cimicomorpha
Superfamilia	Cimicoidea
Familia	Anthocoridae
Subfamilia	Anthocorinae
Tribu	Oriini
Género	*Orius*
Subgénero	*Orius*
Especie	*O. laevigatus*

3.1.2. Descripción

El desarrollo de *O. laevigatus* consta de los estados de huevo, ninfa y adulto, y es de tipo heterometábolo. Según la descripción del insecto hecha por Ferragut & González (1994) los adultos presentan una gran plasticidad en algunos de sus caracteres morfológicos externos más visibles, como el tamaño y la coloración. El tamaño varía de 2 a 3 mm de longitud y el cuerpo es fusiforme y aplanado dorsoventralmente. De forma natural, se encuentran ejemplares de color marrón claro, marrón oscuro e incluso negro, siendo los de color marrón oscuro los más comunes (Figura 1).

Figura 1. Adulto de *O. laevigatus*

Las zonas más lisas del cuerpo, como la cabeza y el pronoto, presentan un tegumento brillante. Las antenas están formadas por cuatro artejos, generalmente más gruesos en los machos que en las hembras. Los ojos compuestos son gruesos, prominentes y de un característico color rojizo. La coloración de las antenas es también variable, a veces con el primer segmento más oscuro y la extremidad del último rojiza. El tamaño de los segmentos antenales es bastante constante: el segundo artejo es más del doble de largo que el primero, mientras que el tercero y el cuarto, que son aproximadamente iguales, un poco más cortos que el segundo (Figura 2.EF).

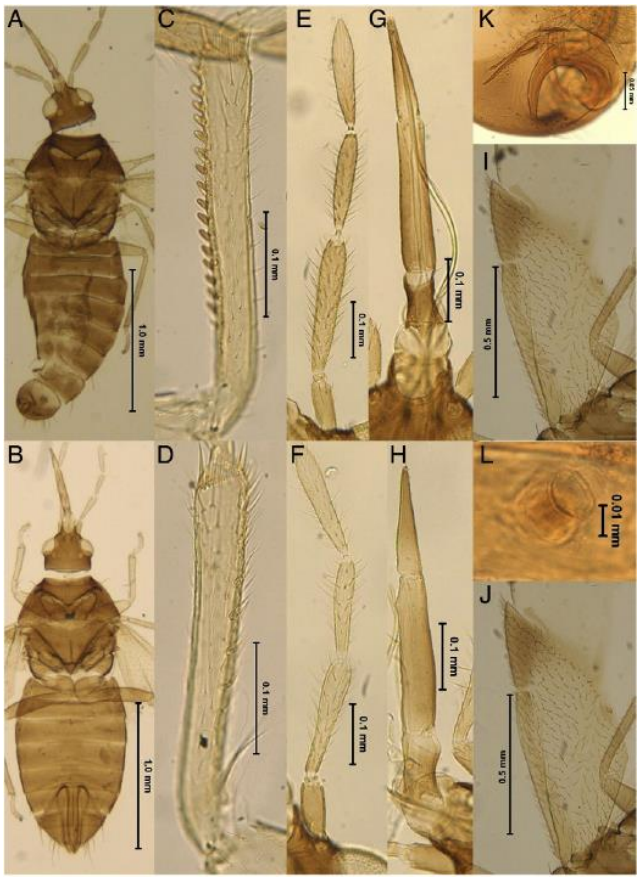


Figura 2. Macho (A, C, E, G, K, I.) y hembra (B, D, F, H, I, J.) adultos de *O. laevigatus*. A, B. Cuerpo; C, D. Tibia del primer par de patas; E, F. Antena; G, H. Estilete; I, J. Hemiélitro; K. Genitalia del macho; L. Tubo copulador de la hembra (De Jung *et al,.* 2011)**.**

El aparato bucal es de tipo picador-suctor, de manera que las piezas bucales se transforman para formar una especie de pico o estilete largo y móvil que puede doblar bajo su cuerpo cuando no se alimenta (Figura 2.GH). Con este estilete perfora el cuerpo de sus presas, succionando su contenido interno.

La parte más visible del tórax es el protórax y su parte dorsal o pronoto. Este último tiene forma trapezoidal y presenta en su parte anterior un abultamiento alargado transversalmente que recibe el nombre de callo que está formado por una sola pieza. En los márgenes del pronoto se presentan cuatro macroquetas situadas en cada uno de sus ángulos. El mesotórax es visible dorsalmente por una pequeña pieza triangular llamada escudete, mientras que el metatórax es reducido y está totalmente cubierto por las alas.

El primer par de alas o hemiélitros son casi transparentes, excepto el cúneo, que es muy oscuro. Toda la superficie de este primer par de alas está cubierta de pequeñas quetas oscuras. La parte membranosa de los hemiélitros presenta una de las características más típicas de esta especie: la mitad basal es transparente, mientras que la mitad apical es oscura, siendo la separación entre ambas zonas rectilínea (Figura 3).

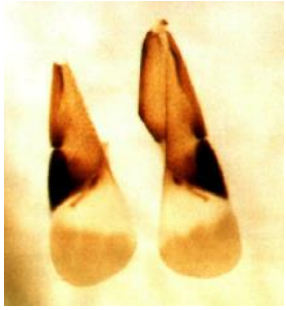


Figura 3. Hemiélitros de *O. laevigatus* con la base de la membrana incolora y el extremo oscuro. (De Ferragut & González, 1994).

Las patas son marchadoras, en general de color claro, amarillentas, pudiendo ser el tercer par más oscuro que los precedentes (Figura 2.CD). El abdomen está formado por 9 segmentos y presenta un notable dimorfismo sexual, lo que permite distinguir machos y hembras sin dificultad bajo el microscopio estereoscópico (Figura 2.AB). En las hembras es simétrico y termina en un ovipositor ligeramente curvado y de bordes aserrados, que emplea para cortar los tejidos vegetales e insertar en ellos los huevos. Por su parte, el abdomen de los machos es asimétrico, estando desplazado hacia el lado izquierdo debido a una torsión que hace que la parte ventral de los segmentos pase a ser dorsal, quedando por tanto en posición dorsal las piezas que constituyen la genitalia masculina (Figura 2.K). Formando parte de esas piezas genitales se encuentra el parámero, una estructura esclerotizada de forma espiral que se dispone horizontalmente sobre los segmentos finales del abdomen y que consta de una parte basal ancha llamada lámina o lamela. El parámero tiene dos flagelos de distinta longitud y carece de diente. En la base de los flagelos existe una dilatación muy evidente cuando se observa de perfil. Al observarse ventralmente, los últimos segmentos abdominales

presentan una serie de quetas marginales de aproximadamente el mismo tamaño.

El estado de huevo es difícil de observar a simple vista, ya que las hembras lo insertan en la planta, preferentemente en la epidermis de los tejidos tiernos. Los huevos son prácticamente transparentes inicialmente, miden en torno a 0,3-0,4 mm de longitud, tienen forma oval alargada y presentan un opérculo muy característico que es plano, ligeramente punteado y con los bordes hendidos. A medida que se desarrollan, adquieren una coloración amarillenta, característica de la ninfa que se está desarrollando en su interior, y cuando la eclosión está próxima, se aprecian dos puntos rojos que se corresponden con los ojos (Figura 4).

Figura 4. Huevos de *Orius laevigatus*. a: huevos insertados en el tejido vegetal a punto de eclosionar. b: opérculo característico del huevo. c: forma oval del huevo con el punto rojo correspondiente a uno de los ojos.

El estado de ninfa, a su vez, consta de cinco estadios ninfales (N1-N5). Las formas ninfales inicialmente presentan una coloración amarilla muy clara que va tornándose anaranjada hasta llegar a una coloración castaña. Su aspecto es similar al de los adultos, son de menor tamaño y no presentan hemiélitros, aunque sí se observan con claridad los esbozos alares en las ninfas de cuarto y quinto estadio (N4 y N5). Estos esbozos alares toman una coloración muy oscura cuando la N5 está desarrollada y a punto de mudar, hecho que es más evidente cuando la ninfa presenta una coloración clara (Figura 5).

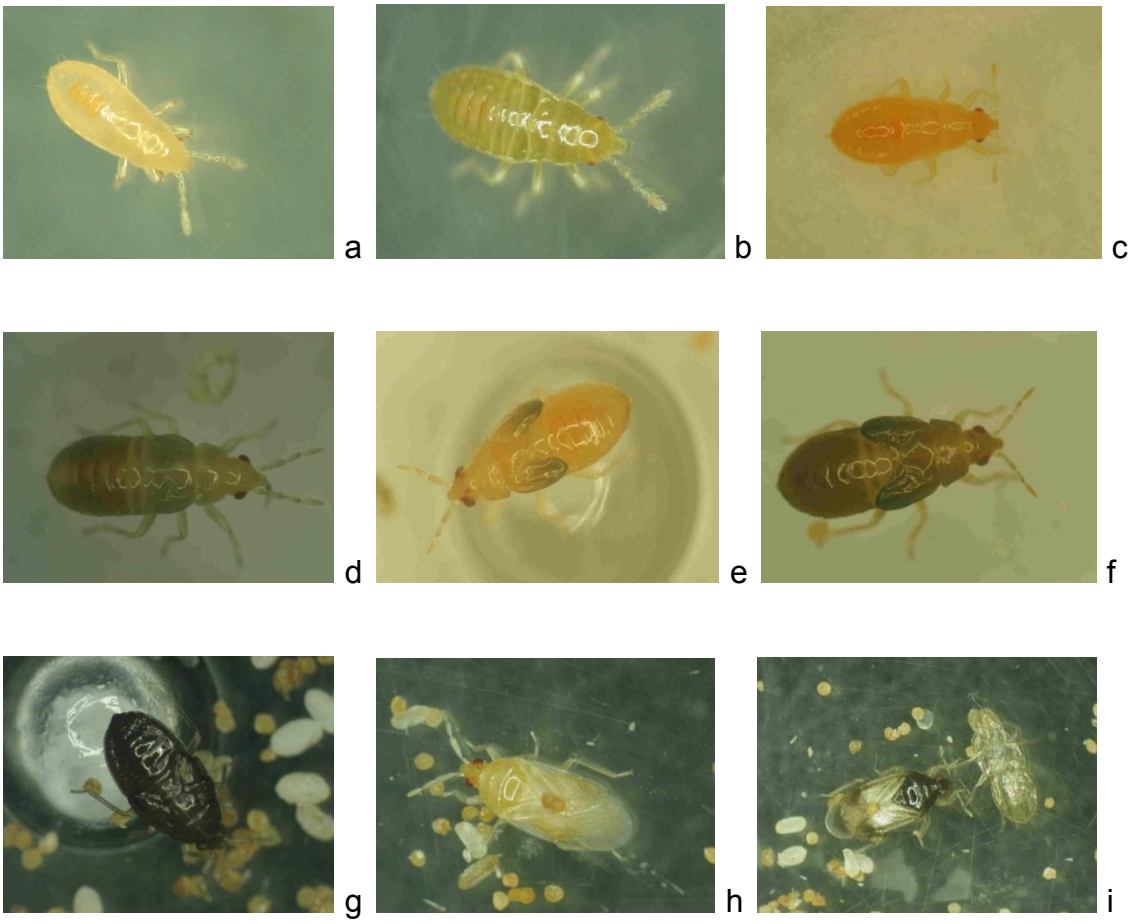
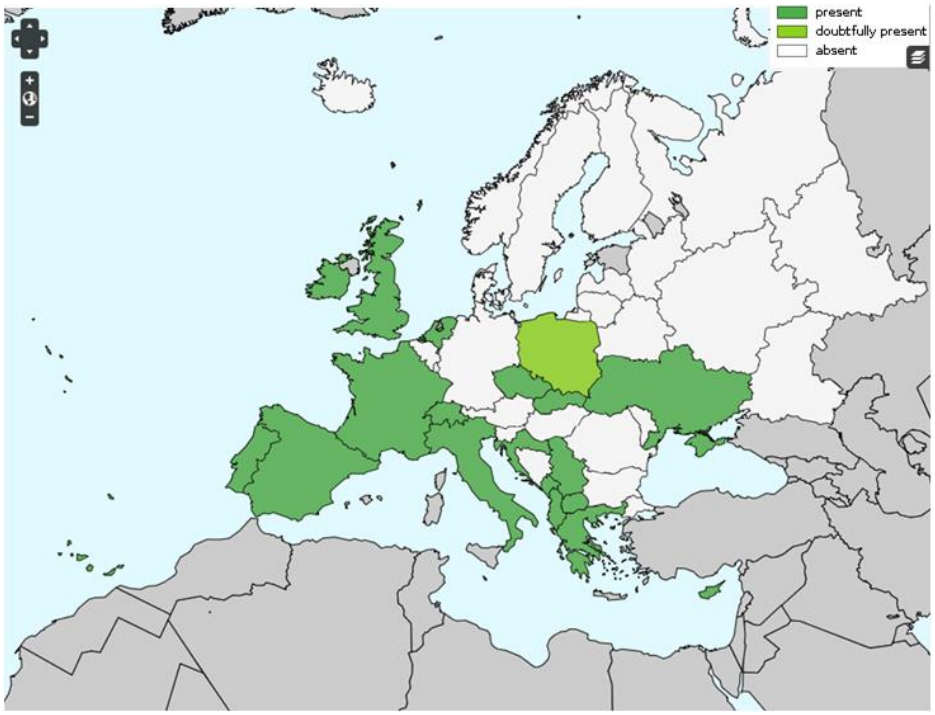


Figura 5. Diferencias de coloración en *O. laevigatus* en función de la temperatura. a: ninfa N2 a 30 ºC; b: ninfa N2 a 18 ºC; c: ninfa N4 recién mudada a 12 ºC; d: ninfa N4 a 21 ºC de 1 día de edad. e: ninfa N5 a 30 ºC a punto de mudar; f: ninfa N5 a 21 ºC a punto de mudar; g: ninfa N5 a 12 ºC a punto de mudar. h: adulto recién mudado a 24 ºC. i: adulto de 1 día a 24 ºC.

Según observaciones personales, parece que existe cierta variabilidad en la coloración de los individuos de *O. laevigatus*, que está directamente relacionada con la temperatura a la que se desarrolla el insecto, ya que la coloración resulta ser amarillenta o anaranjada en ensayos realizados a temperaturas altas (>27 ºC), y casi negra cuando lo hace a temperaturas más bajas (12-15 ºC), existiendo una mayor variabilidad cuando las temperaturas son intermedias. Este hecho es muy evidente en los estadios ninfales. Por su parte, los adultos recién mudados presentan una coloración amarillenta que adquiría tonos marrones con el paso de las horas, para acabar siendo más o menos oscuros en función de la temperatura, tal y como se ha señalado anteriormente.

3.1.3. Hábitat y distribución geográfica

El área de distribución de *O. laevigatus* abarca toda la Cuenca Mediterránea, extendiéndose a las islas de la Macaronesia, la fachada atlántica de Francia y las islas Británicas (Ferragut & González, 1994). También se encuentra en el este de Asia y el norte de África, y se ha introducido en la península de Korea (Jung et al. 2011). En las Figura 6 y Figura 7 se muestra la distribución geográfica de *O. laevigatus* según la base de datos de Fauna Europaea (Fauna Europaea, 2016).



Presencia Dudoso Ausencia

Figura 6. Distribución de *O. laevigatus* en Europa (Fauna Europaea, 2016)

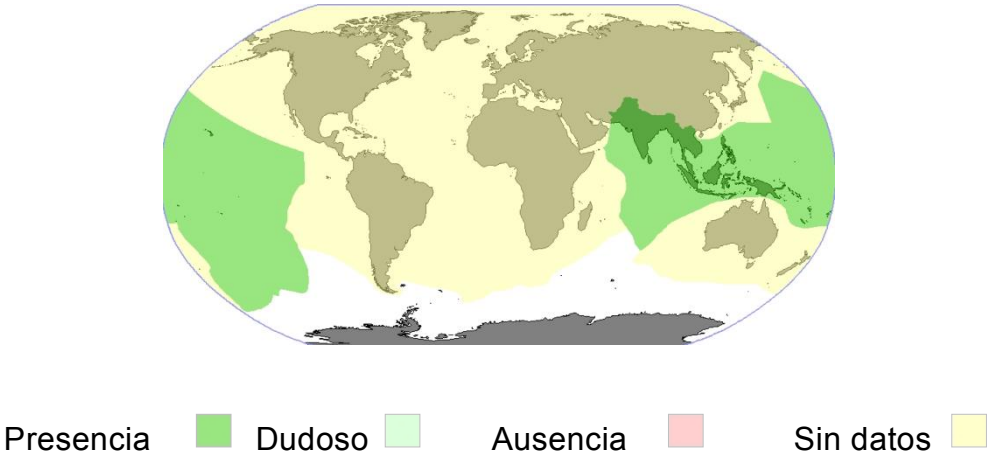


Figura 7. Distribución de *O. laevigatus* en el mundo (exceptuando la distribución en Europa) (Fauna Europaea 2012).

Ferragut & González (1994) examinaron más de 100 muestras recogidas en una amplia área geográfica de España para analizar la distribución de las especies peninsulares de *Orius*. Dicha área geográfica abarcó la Comunidad Valenciana, Murcia, Andalucía y Extremadura, además de prospecciones puntuales en otros lugares de la Península. Los resultados obtenidos mostraron que *O. laevigatus* era la especie predominante, ya que estaba presente en el 47% de las muestras. Concretamente, estas muestras procedían de las siguientes provincias: Alicante, Almería, Córdoba, Granada, Málaga, Murcia, Sevilla, Teruel y Valencia; y los cultivos muestreados fueron fresón, pimiento, judía, habas, sandía, tomate, crisantemo, peral, manzano, mango, naranjo, girasol, algodón, remolacha, alfalfa, maíz, así como varios tipos de vegetación espontánea.

3.2. *Anthocoris nemoralis* (Fabricius, 1794)

3.2.1. Posición taxonómica

Según la última actualización de la base de datos de Fauna Europaea en 2016 (Fauna Europaea 2016), *A. nemoralis* se puede ordenar taxonómicamente de la siguiente manera:

Regnum	Animalia
Subregnum	Eumetazoa
Phyllum	Arthropoda
Subphylum	Hexapoda
Clase	Insecta
Orden	Hemiptera
Suborden	Heteroptera
Infraorden	Cimicomorpha
Superfamilia	Cimicoidea
Familia	Anthocoridae
Subfamilia	Anthocorinae
Tribu	Anthocorini
Genero	*Anthocoris*
Especie	*A. nemoralis*

3.2.2. Descripción

Al igual que en *O. laevigatus*, el desarrollo de *A. nemoralis* consta de los estados de huevo, ninfa y adulto, y es de tipo heterometábolo. De igual modo consta de cinco estadios ninfales N1 a N5. Según la descripción realizada por Pericart (1972), los adultos de *A. nemoralis* tienen un tamaño variable, con una longitud comprendida entre 3,3 y 4 mm. La coloración de los adultos varía del rojo claro, cuando alcanzan el estado adulto y durante pocas horas posteriores a la muda, al castaño oscuro, coloración que normalmente toma al día siguiente (Figura 8)

Figura 8: Evolución de la coloración de *Anthocoris nemoralis* después de la muda a estado adulto.

La cabeza es de pequeño tamaño, siendo su forma más larga que ancha. Los ojos compuestos sobresalen de la cabeza, están situados lateralmente, y son de color rojizo. Entre ellos, presenta dos ocelos de gran tamaño y distantes entre sí. El aparato bucal es de tipo picador-suctor, igual que el descrito para *O. laevigatus,* de forma que con él succiona el contenido de la presa (Figura 9).

Figura 9: Adulto y ninfa de *Anthocoris nemoralis* alimentándose de ninfas de *Cacopsylla pyri*

Las antenas son más largas que la cabeza y el protórax juntos. El primer artejo sobrepasa un poco el ápice de las mejillas, el segundo es casi igual de largo que la anchura de la cabeza o un poco más corto. En ocasiones

la coloración de las antenas es completamente amarillo-rojiza o rojiza, pero lo más frecuente es que sea acastañada o negra, con la zona basal y los extremos del segundo y del tercer artejo de color rojizo. En los individuos de coloración más clara, las zonas oscuras se transforman en castaño-rojizas y las zonas rojizas en rojo-amarillentas. Pronoto normalmente de color oscuro, pero a veces rojizo y con la base y el cuello oscuros, o por el contrario marrón oscuro con la base rojiza.

Hemiélitros con una fina pubescencia de color claro, semi-erecta, mezclada con sedas más largas. El clavus es mate, rojizo en su parte central y más o menos oscuro en el resto; la exocoria es granulada, pero muy brillante, y la endocoria mate; la coria es de color castaño o rojizo, más clara hacia su base; el cúneo es brillante, castaño o rojizo, a veces con finos bordes rojo-claros. La membrana es acastañada, con una mancha basal y dos laterales de color blanco que pueden llegar a confluir, delimitando manchas castañas. Patas de color amarillo, rojizo o rojo oscuro. A menudo, las tibias se oscurecen en su base y los fémures en su extremo.

Se observa dimorfismo sexual que permite distinguir machos y hembras exteriormente, ya que las hembras, al igual que *O. laevigatus*, presentan un ovipositor en los últimos segmentos abdominales con el que insertan los huevos en el tejido vegetal. Sin embargo, el macho presenta una forma más o menos redondeada al final del abdomen (Figura 10). El parámero del macho es falciforme y no dentado.

Figura 10. En la imagen izquierda se muestra el dimorfismo sexual entre machos (izquierda) y hembras (derecha) adultos de *Anthocoris nemoralis*. En la imagen derecha se observa en detalle el ovipositor de la hembra.

Los huevos son similares a los de otros antocóridos. Tienen un tamaño de aproximadamente 0,8 mm, son de forma oval alargada, sensiblemente arqueada y con un opérculo característico. La malla de la corona exterior del opérculo es regular y alargada radialmente. Los huevos son inicialmente blancos, tornando a una coloración amarillenta a medida que se desarrollan y finalmente de color anaranjado, con dos puntos rojos correspondientes a la futura ninfa a punto de nacer (Figura 11).

Figura 11. Huevos de *Anthocoris nemoralis.*

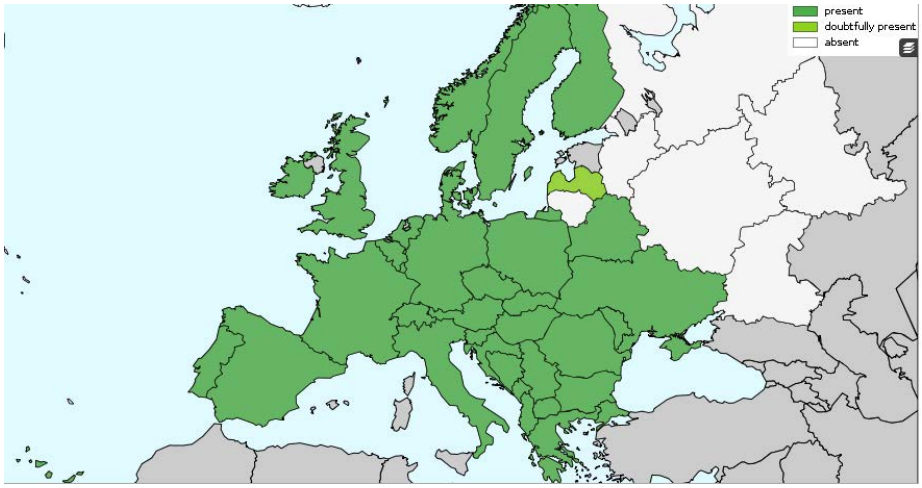
Las ninfas recién nacidas son de color amarillo pálido, con la cabeza, el extremo de las antenas y el abdomen de color anaranjado, así como las patas ligeramente oscurecidas. Tienen un tamaño aproximado de 1 a 1,5 mm. Las ninfas, a medida que van creciendo, toman coloraciones anaranjadas o castaño rojizas, con los últimos segmentos del abdomen notablemente más oscuros que el resto del cuerpo. Al alcanzar el estadio N4 se aprecian los esbozos alares. La ninfa de quinto estadio tiene una coloración variable, de castaño rojizo a castaño verdoso muy oscuro, dependiendo de la alimentación. Las antenas son oscuras, salvo el extremo de cada artejo. El pronoto es de color más o menos claro en su parte posterior, así como los esbozos de las alas y los ángulos posteriores de cada terguito abdominal. Las patas suelen ser generalmente oscuras, con el ápice de las tibias y la base de los tarsos ligeramente más claros. Cuerpo enteramente revestido de una pubescencia dispersa, más desarrollada sobre las antenas y las patas. La longitud de las ninfas N5 ronda los 4 mm, es decir, prácticamente lo mismo que el estado adulto (Figura 12).

Los órganos sexuales no son visibles externamente en los primeros estadios ninfales, pero en las ninfas de quinto estadio el ovipositor de la hembra aparece como un esbozo. Este esbozo se caracteriza por la prolongación del esternito VIII en un lóbulo medio posterior que divide el esternito IX en dos partes. Por otra parte, el esternito IX presenta, a cada lado de este lóbulo medio, un proceso de forma ovalada. Por el contrario, los esternitos VIII y IX de los machos son simples, aunque el esternito IX posee en su parte posterior un proceso bilobulado con forma de cresta transversal y una longitud igual a la anchura del pequeño esclerito anular X.

Figura 12. Estadios ninfales de *Anthocoris nemoralis.*

3.2.3. Hábitat y distribución geográfica

A. nemoralis es una especie nativa de la región Paleártica y su área de distribución abarca prácticamente la totalidad del continente Europeo, el Reino Unido y el oeste de Rusia (Figura 13), así como los países de la Cuenca Mediterránea, incluyendo la península Arábiga y el norte de África. Este depredador está asociado a varios tipos de árboles y arbustos y, ocasionalmente, a plantas herbáceas, aunque habitualmente se decanta por árboles frutales de hoja caduca, siendo habitual encontrarlo en peral y manzano, donde se alimenta de pequeños artrópodos con una clara preferencia por los psílidos (Anderson 1962a; Anderson 1962b; Péricart, 1972; Horton *et al*., 2004).



Presencia Dudoso Ausencia

Figura 13. Distribución geográfica de *Anthocoris nemoralis* en Europa (Fauna Europaea 2016)

La primera cita de *A. nemoralis* en Norteamérica procede de recolecciones realizadas en 1958 en cultivos de melocotón de la península del Niágara, en Ontario, volviendo a ser citado en los años 70 en las zonas limítrofes de la cita anterior en cultivos de melocotón, peral, manzano y nogal. Aunque se desconoce el origen de estas poblaciones, se cree que pueden proceder de una introducción accidental anterior a 1958, a partir de alguna planta procedente de vivero. Por el contrario, se sabe que en 1963 se hicieron liberaciones intencionadas de *A. nemoralis* procedentes de Suiza en cultivos de peral localizados en Summerland, en el este de Canadá, con el objetivo de controlar la psila del peral. Actualmente, *A. nemoralis* se encuentra prácticamente en toda la costa oeste norteamericana, así como en la península del Niágara (Horton *et al*., 2004).*A. nemoralis* es una especie frecuente en la Península Ibérica y según Gómez-Menor (1956) está presente principalmente en las provincias de La Coruña, Barcelona, Teruel, Cuenca, Madrid, Cáceres, Cádiz, Murcia, Ceuta y Melilla.

Desde hace varios años, y especialmente en la actualidad, *A. nemoralis* se comercializa como organismo de CB en varios países europeos para el control de la psila del peral, por lo que su distribución ha podido expandirse a zonas en las que anteriormente no se encontraba presente.

Objetivos

OBJETIVOS

- Estimar los parámetros de funciones matemáticas que relacionan la tasa de desarrollo de *Orius laevigatus* con la temperatura, utilizando temperaturas constantes.
- Determinación si la variación intradiaria de la temperatura influye en la tasa de desarrollo de *O. laevigatus*.
- Validar los modelos ajustados para *O. laevigatus* comparando los resultados predichos con la duración del desarrollo en condiciones de exterior.
- Evaluar, en la fase de laboratorio, los efectos secundarios sobre la mortalidad y la capacidad de incremento poblacional de insecticidas y fungicidas de uso habitual en el cultivo del peral sobre *Anthocoris nemoralis.*
- Analizar y comparar las estrategias de control de *Cacopsylla pyri* en un sistema de manejo convencional y en un sistema de manejo integrado de plagas que incorpora la utilización del organismo de control biológico *A. nemoralis*.

Capítulo I

CAPÍTULO I. Modelos matemáticos para la predicción del desarrollo de O*rius laevigatus* en función de la temperatura

1. Introducción

Para evaluar el potencial de un enemigo natural como agente de control biológico es fundamental tener un buen conocimiento de algunos aspectos de su biología, tales como su desarrollo y supervivencia en diferentes condiciones ambientales (Argyro *et al.,* 2007). Los insectos, como otros organismos vivos, se ven afectados por diversos factores ambientales como la temperatura, la humedad relativa o el fotoperiodo, y solamente se desarrollan en unos rangos determinados de dichos factores.

El conocimiento de la tasa de desarrollo y de la mortalidad de los organismos plaga y sus enemigos naturales en función de la temperatura, resulta de gran interés para comprender sus dinámicas poblacionales y desarrollar estrategias de control eficaces (Kim *et al.,* 2009). De todos estos factores, la temperatura es el factor que mayor influencia tiene sobre su desarrollo, ya que, al ser organismos poiquilotermos, la incidencia sobre sus procesos bioquímicos es de gran importancia (Wagner *et al.,* 1984). El rango de temperaturas efectivas varía según las especies y el estado y estadio de desarrollo en el que se encuentre el insecto. El conocimiento de los umbrales térmicos, así como la evolución del desarrollo a cada temperatura, es una herramienta fundamental para aplicar con éxito el CBP (Tobin *et al*., 2001).

Por todo ello, diferentes investigadores han intentado predecir la evolución de los sucesivos eventos que tienen lugar a lo largo del ciclo de vida de los insectos mediante modelos matemáticos que utilizan la temperatura ambiental como única variable independiente. Dichos modelos se basan en la construcción de curvas que relacionan los tiempos o tasas de desarrollo con la temperatura.

Si se mide el tiempo de desarrollo utilizando valores puntuales próximos de temperatura y se representan los resultados en unos ejes cartesianos, se obtiene una curva en forma de "J" invertida (Figura 14.a). Si lo que se representa en función de la temperatura es la tasa de desarrollo, la curva resultante tiene forma de sigmoide asimétrica (Howe, 1967) (Figura 14.b). Dado que la tasa de desarrollo (r) es la inversa del tiempo de desarrollo, esta variable mide la porción de desarrollo avanzada por unidad de tiempo.

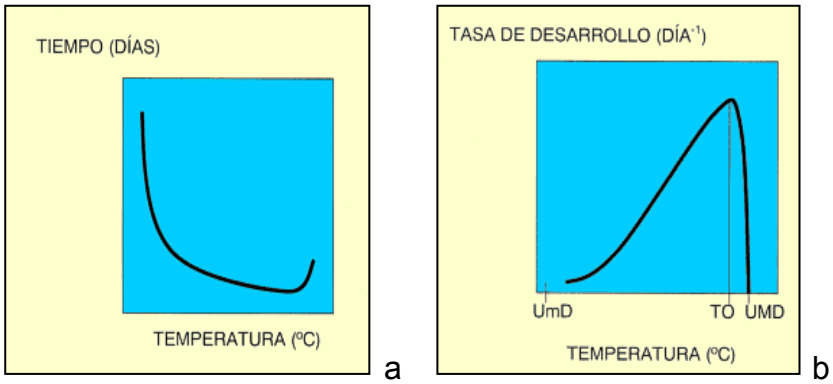


Figura 14. a: Relación entre tiempo de desarrollo y temperatura; b: Relación entre tasa de desarrollo y temperatura. UmD: Umbral mínimo de desarrollo; TO: temperatura óptima; UMD: Umbral máximo de desarrollo (De Marco, 2001).

En el caso de la Figura 14.b, puede observarse cómo en el límite térmico inferior la curva se aproxima al punto cero de desarrollo asintóticamente, ya que, generalmente, los insectos sobreviven durante largos periodos de tiempo a bajas temperaturas con un desarrollo lento. Por esta razón, la temperatura más baja a la que ocurre el desarrollo, llamada umbral mínimo de desarrollo (UmD), es difícil de medir con precisión. A medida que las temperaturas suben desde este límite inferior, la tasa de desarrollo aumenta, pudiéndose ajustar la función a una recta en la zona intermedia. A medida que nos acercamos a la temperatura óptima (aquella en que la tasa de desarrollo es máxima), el desarrollo comienza a ralentizarse, para caer después bruscamente. Además, a temperaturas superiores a la óptima, los porcentajes de mortalidad son muy elevados (Wagner *et al.,* 1984), lo que hace también difícil el estudio del desarrollo a altas temperaturas y, por tanto, la determinación del umbral máximo de

desarrollo (UMD), que es la temperatura por encima de la cual el insecto no puede desarrollarse (Pedigo, 1996).

1.1. Modelos de relación tasa de desarrollo-temperatura

El UmD varía entre especies de insectos y entre los distintos estados y estadios de una misma especie. También la integral térmica es diferente para distintos eventos y entre especies diferentes para un mismo evento. Para la determinación de estos valores se han propuesto numerosos modelos empíricos y biofísicos que describen la relación de la tasa de desarrollo frente a la temperatura.

El primer modelo utilizado fue el lineal. Este modelo está basado en el trabajo de diversos autores (Candolle, 1885; Reibisch, 1902; Sanderson & Peairs, 1913; Arnold, 1960; Baskerville & Emin, 1969; Abrami, 1972; Allen, 1976, Sevacherian *et al*., 1977) y asume como relación válida entre la tasa de desarrollo y la temperatura a la descrita por una recta. El umbral mínimo de desarrollo se determina tomando el valor del punto de corte de la recta con el eje de abscisas. Aunque es un modelo válido para temperaturas intermedias, no se ajusta a la realidad tanto a temperaturas bajas como altas, lo que impide un correcto cálculo del umbral mínimo, de la temperatura óptima y de la integral térmica, y no permite calcular el umbral máximo. No obstante, este modelo ha sido utilizado desde hace mucho tiempo por muy diversos autores dada su sencillez de cálculo y manejo, y porque representa una aproximación aceptable en muchos casos prácticos (Allen 1976, Higley *et al*. 1986, Cullen & Zalom 2000, Jones *et al*. 2005).

A lo largo del tiempo han ido apareciendo diversos modelos cuyo objetivo principal es el de resolver los problemas que presenta el modelo lineal. Se describieron, así, los modelos catenario simétrico y asimétrico (Janisch, 1925), exponencial (Belehradek, 1935) y logístico (Davidson, 1944). Estos modelos también presentan problemas en los ajustes en las zonas de temperaturas altas y bajas. Por su parte, el modelo sigmoide

modificado (Stinner *et al.*, 1974) corrige el desajuste de los modelos anteriores en la zona de altas temperaturas.

Todos los modelos citados hasta ahora son empíricos, ninguno de ellos basado en leyes biofísicas. En 1977, Sharpe & DeMichele formularon un modelo biofísico complejo que lleva su nombre y que es ampliamente aceptado y utilizado, dado que describe la relación tasa de desarrollo-temperatura correctamente en todo el rango de desarrollo de la especie de insecto y fase considerada. Este modelo, basado en cinética enzimática, contiene seis parámetros con interpretación bioquímica y termodinámica. Para subsanar algunos de los problemas que surgían al estimar los parámetros mencionados, Schoolfield *et al*. (1981) propusieron una simplificación del modelo.

Sin embargo, diferentes investigadores siguieron proponiendo modelos intentando, sobre todo, mejorar el cálculo del umbral mínimo de desarrollo. Así, en 1983, Hilbert & Logan describieron el modelo de Logan tipo III, cuya expresión matemática es la combinación de dos funciones. La primera para cubrir la parte ascendente de la tasa de desarrollo y la segunda para la región descendente de la misma. Con igual objetivo fue propuesto el modelo de Lactin *et al*. (1995), cuya mejora con respecto al anterior es su mayor rigurosidad respecto a lo descrito matemáticamente por debajo del umbral mínimo de desarrollo, ya que el modelo de Logan tipo III no es biológicamente correcto en este sentido, pues predice un aumento de la tasa de desarrollo a temperaturas inferiores a ese umbral.

En la actualidad se siguen estudiando modelos cuyo objetivo principal ha pasado a ser el de reducir el número de parámetros utilizados. Así, en 1999, Brière *et al*. propusieron un modelo con tan sólo 3 parámetros que consigue muy buenos ajustes y permite seguir obteniendo el umbral mínimo de desarrollo. De cualquier manera, aun se siguen estudiando los modelos disponibles en la bibliografía para evaluar cuáles de ellos obtienen los mejores ajustes (Angilletta *Jr.,* 2006; Shi & Ge, 2010; Sánchez-Ramos *et al*. 2015).

1.2. Método de grados día como instrumento de predicción

El método más extendido basado en la relación tasa de desarrollo-temperatura con fines predictivos, es el método de grados-día (DD). Los grados-día representan la acumulación de unidades de calor por encima de cierta temperatura, en un período de un día. En el caso de los insectos, esa cierta temperatura es el umbral mínimo de desarrollo. Diariamente, los DD se calculan, por tanto, como la diferencia entre la temperatura media diaria y el umbral mínimo de desarrollo.

Para poder predecir el estado de desarrollo a partir de los DD, es necesario haber establecido antes, además del umbral mínimo de desarrollo, la integral térmica, definida como el número de DD que han de ser acumulados para que ocurra un evento determinado (eclosión, mudas larvarias o ninfales, pupación y emergencia del adulto). De este modo, se puede estimar cuándo va a tener lugar un evento concreto, acumulando DD hasta alcanzar el valor de su integral térmica correspondiente.

El método de DD, en la actualidad, solo merece la pena aplicarlo con el modelo lineal, ya que con los modelos no lineales lo ideal es determinar los valores de temperatura, en intervalos de tiempo establecidos, y acumular las tasas de desarrollo correspondientes hasta que sumen 1, en cuyo caso el estado o estadio se habrá completado. Esto es posible debido a que actualmente se dispone de la tecnología adecuada, tanto en los sistemas de medición de temperatura como de las aplicaciones informáticas correspondientes (García Ruiz, 2011).

2. Materiales y métodos

2.1. Cría masiva de Orius laevigatus

Para el suministro continuo de los individuos necesarios para llevar a cabo los bioensayos, se estableció una población de *O. laevigatus* en laboratorio a partir de insectos comercializados (Orius-System®) por la empresa Biobest. Dicha población se inició con unos 1.000 individuos (adultos y ninfas N5).Para poner a punto el método de cría, inicialmente se siguió la metodología propuesta por Schmidt *et al.* (1995) para *O. insidiosus* y que Shakya *et al*. (2009) utilizaron para criar *O. laevigatus*. Posteriormente, y como resultado de la experiencia, se introdujeron algunas modificaciones para minimizar los inconvenientes que iban surgiendo y así adaptar la metodología a las necesidades del estudio. Los recipientes para la cría (Figura 15.a) consistieron en cajas de plástico transparente, de 23,5 x 22,0 x 5,5 cm (largo x ancho x alto), con 4 orificios de ventilación, de 2,2 cm de diámetro, situados en la tapa y cubiertos con papel de filtro de 60 g/m^2 de densidad. En el interior de la caja se colocó un pliego de papel de filtro, doblado en zig-zag, para ofrecer refugio y minimizar el canibalismo, además de absorber un posible exceso de humedad.

a

b

Figura 15. a. Recipientes de cría de *O. laevigatus*; b. Vainas de alubia (*Phaseolus vulgaris*)

Como sustrato de oviposición se utilizaron vainas frescas de alubia, *Phaseolus vulgaris* (judía verde o judía) (Figura 15.b). Tras la introducción de los adultos en las cajas de cría, se colocaban dos vainas de judía para obtener una cohorte de huevos y, tras un periodo de 24 horas, se aislaban en una nueva caja para que los huevos eclosionaran y las ninfas se desarrollasen hasta su estado adulto. Una vez eclosionados los huevos,

estas vainas se sustituían por otras frescas, que eran a su vez sustituidas a medida que se iban deteriorando, para proporcionar una fuente de humedad para los insectos y un nuevo sustrato de oviposición.

Como fuente de alimentación se utilizó el preparado comercial Nutrimac®, de la empresa Biobest, consistente en huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) esterilizados. Este alimento se suministraba cada dos días en cantidades que variaban en función del desarrollo en que se encontraba la población. La población se mantuvo en una cámara climática (Sanyo MLR-350H®, Sanyo, Japón) con condiciones controladas de temperatura (24±1 ºC), humedad relativa (60±10 %) y fotoperiodo (16:8 L:O).

2.2. Ensayos de laboratorio

2.2.1. Temperaturas constantes

En general, para la realización de cada uno de los bioensayos se utilizaron unos 120 huevos de menos de 24 horas y 60 ninfas de primer estadio recién emergidas, sometidos a las siguientes temperaturas constantes: 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 35, 36 y 37 ºC. En el ensayo a 15 ºC, tan sólo se dispuso de 80 huevos, ya que la actividad de oviposición del insecto a esta temperatura es muy baja. En el caso del bioensayo a 12 ºC, se repitió este proceso durante dos días para conseguir suficientes huevos. Los adultos utilizados para obtener los huevos empleados en cada bioensayo fueron aclimatados previamente a la temperatura correspondiente desde el estadio N1. En los ensayos de 15, 18, 21, 24 y 27 ºC, se permitió que las hembras adultas ovipositaran durante 24 horas. Por su parte, en los ensayos de 30, 33, 35, 36 y 37 ºC, este tiempo fue de 12 horas, ya que las posteriores observaciones hubo que realizarlas cada 12 horas debido al rápido desarrollo del insecto a estas temperaturas.

Debido a que *O. laevigatus* introduce los huevos en el tejido vegetal, es muy complicado hacer el seguimiento de la evolución de los mismos de forma individualizada. Para evitar este inconveniente, se seleccionaron 120

huevos al azar, marcando con rotulador pequeños grupos. Diariamente se contabilizaban los huevos que habían eclosionado de entre los 120 elegidos (observando la apertura del opérculo).

Una vez que comenzaba la eclosión de los huevos, se seleccionaron al azar 60 ninfas de menos de 24 horas de edad (12 horas en los bioensayos a 30, 33 y 35 ºC) de entre todas las presentes en la caja y se colocaron de forma individualizada en recintos para hacer un seguimiento del desarrollo. En el bioensayo a 36 ºC no se llegaron a individualizar las ninfas N1, ya que la totalidad de ellas había muerto en menos de 24 horas.

La individualización se hizo en cajas cilíndricas de plástico, de 3 cm de diámetro y 1,5 cm de altura, provistas de un orificio de ventilación en la tapa, de 8 mm de diámetro, cubierto por la parte interna con esparadrapo de tejido sin tejer Codix®. En estas cajas se introducía, a su vez, una pequeña porción de vaina de judía y huevos de *E. kuehniella* suministrados *ad libitum* (Figura 16).La vaina se cambiaba cuando comenzaba a secarse, ya que era la fuente de agua para el insecto.

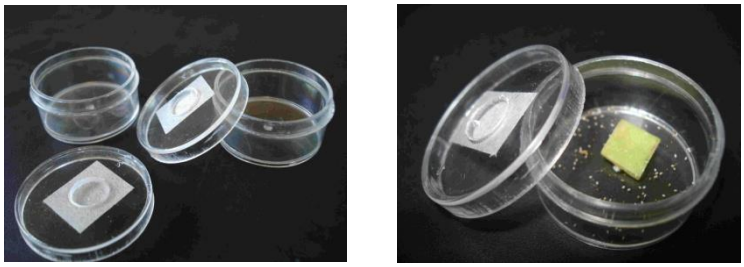


Figura 16. Cajas de plástico utilizadas para la individualización de individuos de *O. laevigatus*.

Estas ninfas se introducían en una cámara climática, a la temperatura correspondiente de cada bioensayo, y se hacía un seguimiento diario para determinar la mortalidad y el momento de la muda.

En el caso de los ensayos a 12, 15, 18, 21, 24 y 27 ºC, las observaciones se hacían cada 24 horas a partir del momento de la individualización, y para las temperaturas de 30, 33, 35, 36 y 37 ºC, cada 12

horas, ya que ensayos previos mostraron que en 24 horas podían darse tasas de desarrollo superiores a 1 en este rango de temperaturas, lo que significa que un individuo puede mudar dos veces en ese tiempo. El momento de la muda se determinó por la presencia de la exuvia, la cual se retiraba para evitar posibles confusiones en mudas sucesivas (Figura 17).

a

b

Figura 17. Exuvia de *O. laevigatus*. a: exuvia de ninfa N2 y huevo de *E. kuehniella.* b: exuvia de ninfa N5.

2.2.2. Temperaturas variables

La temperatura es un parámetro de naturaleza variable a lo largo del día, por lo que los insectos no están sometidos a temperaturas constantes en condiciones naturales. Por este motivo, se analizó la posible influencia de la variación diaria de la temperatura sobre el tiempo de desarrollo de *O. laevigatus*. Para ello, se programó una cámara climática para que la temperatura fuera variando en su valor a lo largo de 24 horas, de modo que su evolución se asemejara lo máximo posible a la que puede registrarse en un día de verano típico en un clima mediterráneo, siendo la temperatura media de 24 ºC. La temperatura variaba a intervalos horarios, desde un mínimo de 17 ºC a un máximo de 31 ºC (Figura 18).

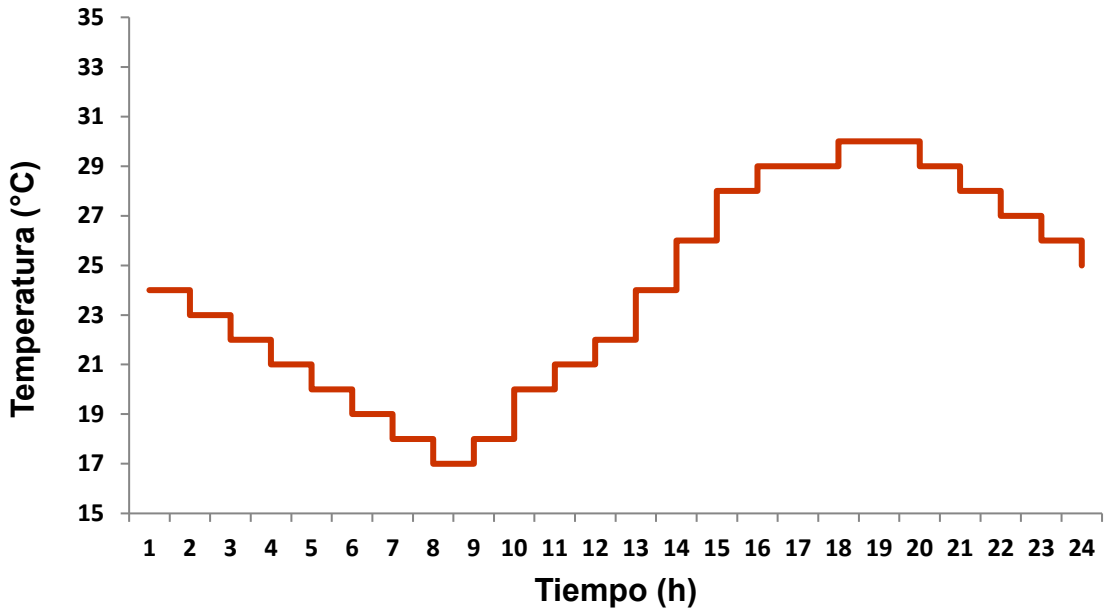


Figura 18. Evolución de la variación intradiaria de la temperatura, utilizada para la determinación de la influencia de dicha variación en la duración del desarrollo de *O. laevigatus*.

La metodología llevada a cabo para el seguimiento del desarrollo de *O. laevigatus* fue la misma que la descrita para los bioensayos a temperaturas constantes, realizando observaciones cada 24 horas.

2.2.3. Validación del modelo

Para validar los modelos ajustados a temperaturas constantes se diseñó un ensayo en condiciones reales al aire libre. El ensayo se llevó a cabo en una estructura cubierta para proteger a los insectos de la radiación solar directa y de las eventuales lluvias que pudieran producirse. La temperatura ambiente se midió a intervalos de 30 minutos, mediante un registrador de temperatura (Testostor 175 data-logger®) durante el desarrollo del bioensayo.

La oviposición de los adultos se llevó a cabo también al aire libre, utilizando adultos procedentes de la cría masiva, durante un periodo de 12 horas. Para el seguimiento de la evolución de los huevos hasta el estado

adulto, se utilizó la misma metodología que en los ensayos de laboratorio. Las observaciones se realizaron cada 12 horas.

Para poder comparar el tiempo de desarrollo observado con el predicho por los modelos, se determinó este último sumando las tasas de desarrollo calculadas por el modelo correspondiente (para cada día, sumando las obtenidas a intervalos de 30 minutos y dividiendo por 48, cifra que se corresponde con el número de intervalos de 30 minutos incluidos en 24 horas), hasta que se llega a la unidad, momento en el cual el evento ha finalizado.

El porcentaje de ajuste entre el valor predicho por cada modelo y el observado en condiciones reales de exterior, se calculó dividiendo el primero por el segundo y multiplicando por 100. De este modo, cuando el porcentaje de ajuste es inferior al 100%, el modelo predice un desarrollo más rápido de lo que ocurre en realidad, y cuando es superior al 100%, más lento.

2.3. Métodos estadísticos

2.3.1. Modelización y modelos de desarrollo

La relación entre la temperatura (T) y la tasa de desarrollo (r = 1/d, donde d es el tiempo de desarrollo medio en días) obtenidas a las temperaturas constantes y variables ensayadas, se ajustó al modelo lineal y a los modelos no lineales de Logan tipo III (Hilbert & Logan 1983), Lactin (Lactin *et al*. 1995) y Brière (Brière *et al*. 1999). Estos modelos no lineales permiten predecir los umbrales mínimo y máximo de desarrollo (UmD, UMD). El ajuste de los modelos lineal y no lineales y la estimación de los parámetros se realizaron mediante el programa Tablecurve 2D (Jandel Scientific, San Rafael, CA). La calidad del ajuste de los modelos lineal y no lineales se estableció a partir del coeficiente de determinación R_a^2, que permite la comparación de funciones con diferentes grados de libertad (Kvalseth, 1985).

2.3.1.1. Modelo lineal

En el modelo lineal, la relación entre temperatura (T) y tasa de desarrollo (r) es la indicada por la expresión matemática siguiente:

$$r(T) = a+bT.$$

El umbral mínimo de desarrollo (UmD) y los requerimientos de DD se obtuvieron así: UmD = -a/b y DD = 1/b, donde a y b se estimaron por el método de regresión de mínimos cuadrados.

2.3.1.2. Modelo Logan tipo III

La expresión matemática de este modelo es una combinación de dos funciones (Hilbert & Logan, 1983). La primera representa la zona de incremento de la tasa de desarrollo en relación al incremento de temperatura. Dicha función es de tipo sigmoidal. La segunda función, desarrollada por Logan *et al*. (1976), representa la porción descendente de la tasa de desarrollo en relación al incremento de temperatura. La expresión matemática general del modelo es:

$$r(T) = \psi\ (((T-T_b)^2 / ((T-T_b)^2 + D^2)) - e^{-((Tm - (T-Tb))/\Delta T))}$$

donde T es la temperatura, r(T) es la tasa de desarrollo a la temperatura T, T_b es la temperatura base (por debajo de la cual, la tasa de desarrollo es cero según el modelo), T_m es el umbral máximo de temperatura expresado en ºC por encima de la temperatura base, de forma que $T_b + T_m = T_{max}$, ΔT es la longitud del eje de abscisas entre la temperatura óptima y el umbral máximo y representa el rango de temperaturas en el que la crisis térmica tiene una influencia decisiva. ψ y D son dos constantes empíricas.

2.3.1.3. Modelo Lactin

Lactin *et al*. (1995) modificaron el modelo no lineal propuesto por Logan *et al*. (1976) para obtener otro que estimara el UmD. Para ello

eliminaron el parámetro ψ e introdujeron uno nuevo (λ) que permite dicha estimación. El modelo tiene la siguiente expresión matemática:

$$r(T) = e^{\rho T} - e^{(\rho Tmax - (Tmax - T)/\Delta)} + \lambda$$

donde T es la temperatura, r(T) es la tasa de desarrollo a la temperatura T, T_{max} es la temperatura supraóptima a la que r(T) = λ, Δ es la diferencia entre T_{max} y la temperatura a la que r(T) es máxima, ρ describe la aceleración de la función desde el umbral mínimo de temperatura hasta la temperatura óptima y λ permite a la curva cortar al eje de abscisas a temperaturas subóptimas, permitiendo con esto la estimación de un UmD. Este parámetro representa la asíntota a la que la función tiende a bajas temperaturas.

2.3.1.4. Modelo Brière

Con el fin de obtener un modelo simplificado de desarrollo, Brière *et al*. (1999) desarrollaron un modelo con sólo tres parámetros cuya expresión matemática es la siguiente:

$$r(T) = a\ T\ (T - T_0)\ (T_L - T)^{1/2} \text{ para } T_0 < T < T_L$$

donde T es la temperatura, r(T) es la tasa de desarrollo a la temperatura T y que vale 0 para valores de $T<T_0$ y de $T>T_L$, T_0 es el umbral mínimo de temperatura, T_L el umbral máximo de temperatura y *a* una constante empírica.

2.3.2. Análisis estadísticos

Para comparar la duración media del tiempo de desarrollo a temperatura constante de 24 ºC y a temperaturas variables intradiarias con una media de 24 ºC, se iba a utilizar el test paramétrico t-Student o Student-Fisher para muestras independientes. Pero, dado que en ningún caso se cumplieron a la vez las hipótesis de normalidad y homocedasticidad, se empleó el test no paramétrico U de Mann-Whitney para muestras independientes. Se fijó un nivel de significación del 5%.

Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI® (StatPoint Tecchnologies, Inc.).

3. Resultados

3.1. Efecto de la temperatura sobre la mortalidad

Para el estado de huevo, los porcentajes de mortalidad se situaron por debajo del 13% a las temperaturas constantes comprendidas entre 12 y 33 ºC. A temperaturas superiores se observó un fuerte incremento, siendo del 20,83% a 35 ºC, del 62,50% a 36 ºC y del 100% a 37 ºC (Figura 199).

En el caso de los estadios ninfales (N1-N5) los porcentajes de mortalidad observados fueron muy bajos en todos los casos, con valores inferiores al 5% y con una muy ligera tendencia ascendente, que no supera el 13%, en las temperaturas extremas para las ninfas de cuarto y quinto estadio. A la temperatura de 36 ºC se produjo un 100% de mortalidad de las ninfas N1 (Figura 19).

Al representar gráficamente estos resultados, se observa una curva característica en forma de “J” en el caso del estado de huevo y del estadio ninfal N1, mientras que para el resto de estadios ninfales son prácticamente planas (Figura 19).

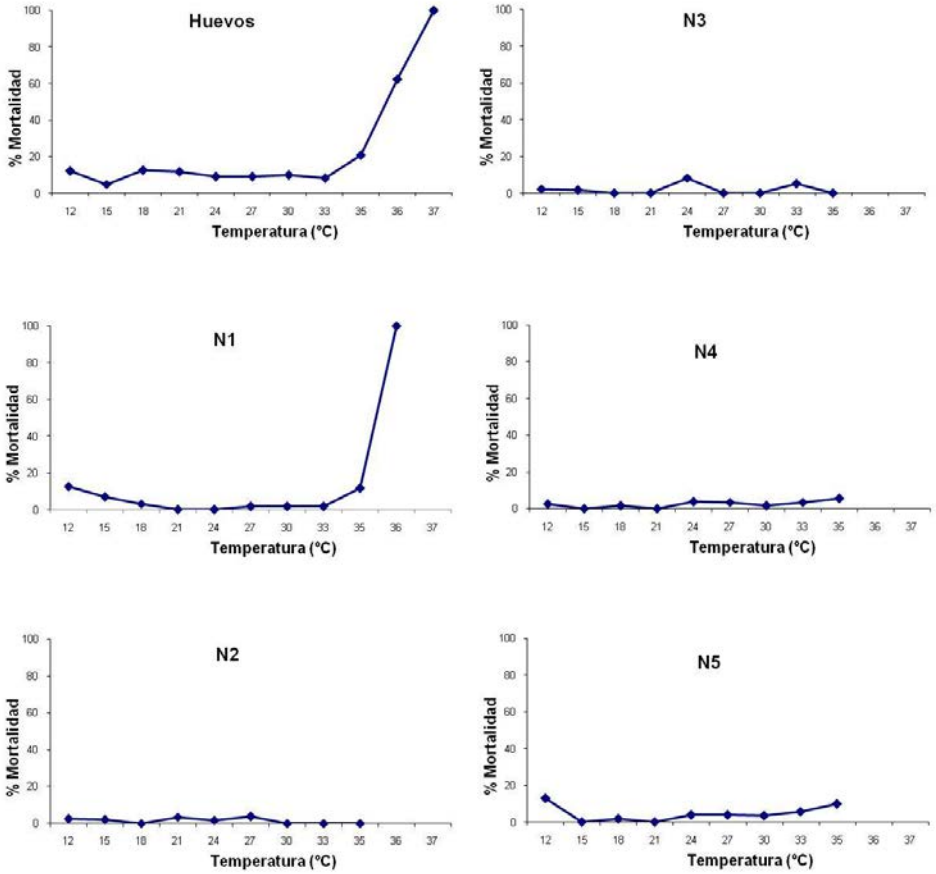


Figura 19. Porcentajes de mortalidad para huevos y ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus* a temperaturas constantes

3.2. Tiempo y tasa de desarrollo

En la Tabla 1 se muestra la duración media del tiempo de desarrollo, expresado en días, con su error estándar, para huevos y ninfas de *O. laevigatus* a las diferentes temperaturas ensayadas. Por su parte, la Tabla 2 muestra los valores correspondientes a las tasas de desarrollo medias.

Los huevos y ninfas de *O. laevigatus* fueron capaces de completar su desarrollo en el rango de temperaturas constantes comprendido entre 12 y 35 ºC. A la temperatura constante de 36 ºC también se completó el desarrollo para el estado de huevo, aunque no lo hizo a 37 ºC. A 36 ºC no se llegó a completar el desarrollo de las ninfas N1.

El tiempo de desarrollo a 12 ºC es elevado, tanto para el estado de huevo como para todos los estadios ninfales, lo que equivale a una tasa de desarrollo muy baja a dicha temperatura.

En el intervalo de 12 a 21 ºC, se produce una rápida disminución del tiempo de desarrollo. A temperaturas superiores a 24 ºC la duración del desarrollo para el estado de huevo es inferior a 3 días, e inferior a 2 días para los estadios ninfales N1, N2, N3 y N4. El estadio ninfal N5 es un poco más lento en su desarrollo y su duración es muy próxima a la del estado de huevo.

Es destacable la duración del desarrollo inferior a 1 día (equivalente a una tasa de desarrollo superior a la unidad) de las ninfas N2 a 30 y 33 ºC, así como la duración del desarrollo de poco más de 1 día que se observa para la mayoría de los estadios ninfales a altas temperaturas.

También se puede observar cómo la duración del desarrollo aumenta al incrementarse la temperatura de 33 a 35 ºC para huevo y ninfas, o lo que es lo mismo, la tasa de desarrollo disminuye.

Tabla 1. Duración del desarrollo en días (media± error estándar) del huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus* a temperaturas constantes y a temperatura variable (media de 24 ºC). Entre paréntesis se muestra el número de huevos tomados inicialmente y los que completaron el desarrollo y el número inicial de ninfas N1 y las que completaron el desarrollo. En el resto de estadios se muestra el número de ninfas que completaron el desarrollo. *El asterisco indica diferencias significativas entre las medias de las duraciones del desarrollo a temperatura constante de 24 º C y variable intradiaria con 24 º C de media (test no paramétrico U de Mann-Whitney para muestras independientes; N1: U=1462,5; P=0,00789 y N3: U=1519,0; P=0,02721**)**

T (ºC)	Huevo	N1	N2	N3	N4	N5	Total N1-N5
12	20,31 ± 0,05 (108 - 95)	11,33 ± 0,21 (48 - 42)	9,34 ± 0,21 41	9,95 ± 0,19 40	12,00 ± 0,22 39	20,79 ± 0,30 34	63,00 ± 0,90 34
15	10,88 ± 0,05 (80 - 76)	6,81 ± 0,16 (58 - 54)	4,57 ± 0,08 53	4,73 ± 0,07 52	5,67 ± 0,08 52	11,69 ± 0,08 52	33,46 ± 0,23 52
18	6,99 ± 0,03 (120 - 105)	3,98 ± 0,05 (60 - 58)	3,21 ± 0,05 58	3,31 ± 0,06 58	4,16 ± 0,06 57	7,79 ± 0,07 56	22,43 ± 0,13 56
21	4,79 ± 0,04 (120 - 106)	2,66 ± 0,06 (59 - 59)	2,09 ± 0,04 57	2,11 ± 0,04 57	2,56 ± 0,07 57	5,11 ± 0,05 57	14,51 ± 0,08 57
24	3,30 ± 0,04 (120 - 109)	2,08 ± 0,04 (60 - 60)	1,81 ± 0,05 59	1,41 ± 0,07 54	2,06 ± 0,06 52	3,90 ± 0,05 50	11,22 ± 0,09 50
27	2,90 ± 0,04 (120 - 109)	1,28 ± 0,06 (58 - 57)	1,42 ± 0,07 55	1,09 ± 0,04 55	1,55 ± 0,07 53	3,04 ± 0,04 51	8,31 ± 0,07 51
30	2,39 ± 0,02 (120 - 108)	1,03 ± 0,03 (59 - 58)	0,98 ± 0,02 58	1,16 ± 0,03 58	1,24 ± 0,04 57	2,52 ± 0,04 55	6,92 ± 0,06 55
33	2,31 ± 0,03 (120 - 110)	1,17 ± 0,03 (60 - 59)	0,92 ± 0,03 59	1,04 ± 0,02 56	1,28 ± 0,03 54	2,41 ± 0,03 51	6,83 ± 0,05 51
35	2,37 ± 0,03 (120 - 95)	1,53 ± 0,04 (60 - 53)	1,09 ± 0,03 53	1,16 ± 0,03 53	1,40 ± 0,04 50	2,64 ± 0,03 45	7,84 ± 0,08 45
36	2,79 ± 0,04 (120 - 45)	- (45 - 0)	- -	- -	- -	- -	- -
24 Variable	3,34 ± 0,03 (111 - 101)	1,91 ± 0,05* (60 - 58)	1,65 ± 0,07a 48	1,63 ± 0,07* 46	2,02 ± 0,04 46	3,82 ± 0,06 45	11,02 ± 0,08 45
Validación exterior	4,07 ± 0,03 (186 - 171)	1,47 ± 0,04 (60 - 52)	1,45 ± 0,03 46	1,84 ± 0,05 40	3,10 ± 0,05 38	4,51 ± 0,05 36	12,30 ± 0,10 36

Tabla 2. Valores de la tasa de desarrollo media (día^{-1}) del huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus* a temperaturas constantes.

T (ºC)	H	N1	N2	N3	N4	N5	Total N1-N5
12	0,0492	0,0882	0,107	0,1005	0,0833	0,0481	0,0159
15	0,0919	0,1467	0,219	0,2114	0,1763	0,0855	0,0299
18	0,143	0,2511	0,3118	0,3021	0,2405	0,1284	0,0446
21	0,2087	0,3766	0,479	0,475	0,3904	0,1959	0,0689
24	0,3026	0,48	0,5514	0,7105	0,486	0,2564	0,0891
27	0,3443	0,7808	0,7051	0,9167	0,6463	0,329	0,1203
30	0,4187	0,9667	1,0175	0,8657	0,8085	0,3971	0,1445
33	0,4324	0,8551	1,0826	0,9573	0,7826	0,4146	0,1463
35	0,4213	0,6543	0,9138	0,8618	0,7143	0,3782	0,1275
36	0,3581	-	-	-	-	-	-

3.3. Estimación y ajuste de los modelos a temperaturas constantes

Para la estimación y el ajuste de los modelos, únicamente se consideró el intervalo de temperaturas comprendido entre 12 y 35 ºC, al haber obtenido mortalidades del 100% a 37 ºC para el estado de huevo y a 36 ºC para N1.

Los parámetros estimados para los diferentes modelos considerados, así como los coeficientes de determinación ajustados se muestran en las Tablas 3, 4, 5 y 6. En estas tablas también se pueden observar los umbrales térmicos inferior y superior, que se determinaron gráficamente para los modelos de Logan tipo III y Lactin; en el modelo de Brière la determinación se hizo a partir de los propios parámetros de la ecuación del modelo. Dadas las características del modelo lineal, es posible la determinación del umbral mínimo de desarrollo y los requerimientos de grados-día de forma analítica, pero no es posible la determinación del umbral máximo de desarrollo (Tabla 3).

En las Figuras 20, 21, 22 y 23 se representan gráficamente las funciones ajustadas de los modelos considerados que relacionan la tasa de desarrollo con la temperatura para el huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus*, así como los valores medios observados de la tasa de desarrollo.

3.3.1. Modelo lineal

Tabla 3. Parámetros estimados del modelo lineal ajustado para la tasa de desarrollo (r) del huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus* en función de la temperatura (T). r(T) = a+bT. a: ordenada en el origen; b: pendiente; R_a^2: coeficiente de determinación ajustado; UmD: umbral mínimo de desarrollo (-a/b); DD: grados-día acumulados para el desarrollo (1/b).

Estado	a	b	R_a^2	DD (ºC·día)	UmD (ºC)
Huevo	-0,126	0,0161	0,8733	62,1	7,8
N1	-0,3454	0,0359	0,7504	27,9	9,6
N2	-0,4206	0,0427	0,9148	23,4	9,9
N3	-0,3378	0,0393	0,8682	25,5	8,6
N4	-0,3034	0,0328	0,911	30,5	9,2
N5	-0,1588	0,017	0,9407	58,8	9,3

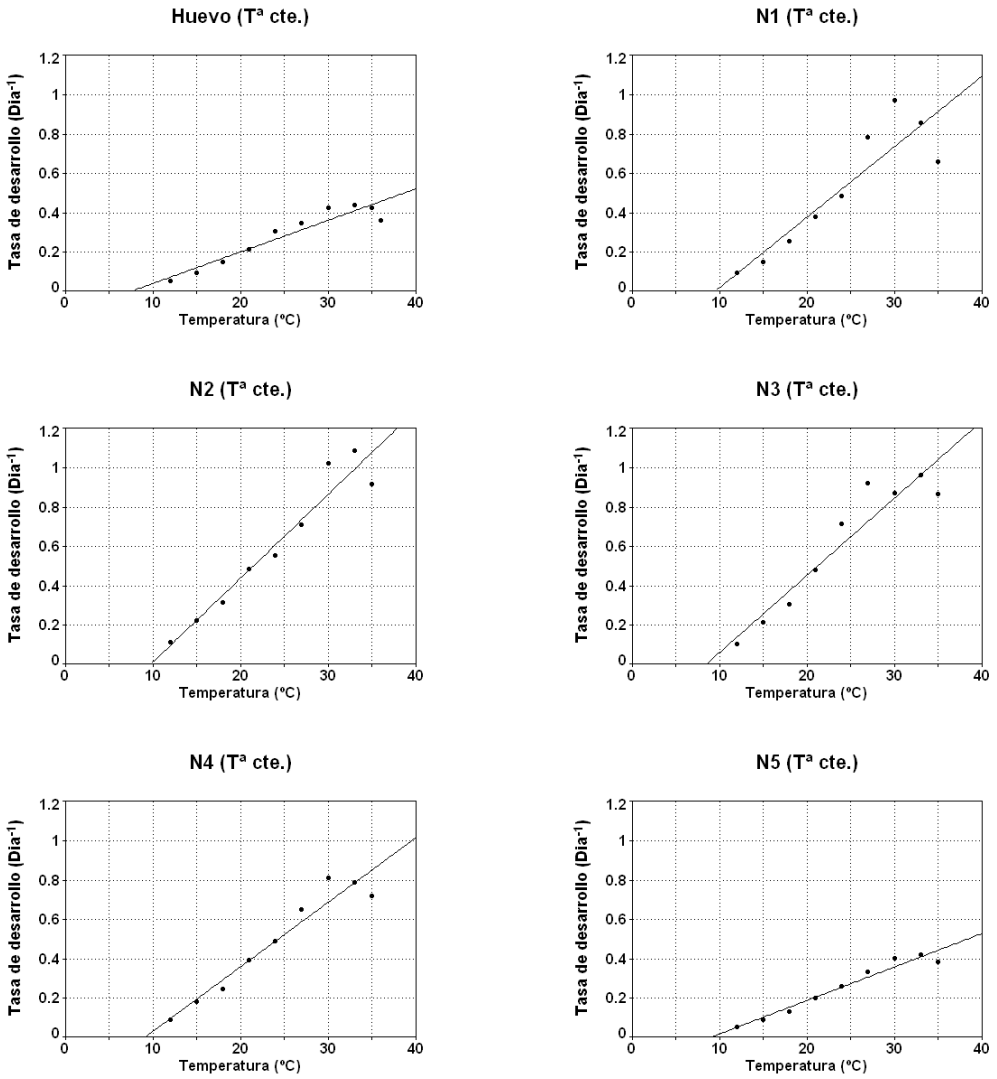


Figura 20. Modelo lineal para el huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus*. (•) tasa de desarrollo observada; (-) línea de mejor ajuste.

3.3.2. Modelo de Logan tipo III

Tabla 4. Parámetros estimados del modelo de Logan tipo III ajustado para la tasa de desarrollo (r) del huevo y las ninfas (N1-N5) *de O. laevigatus* en función de la temperatura (T). $r(T) = \psi\ (((T-T_b)^2\ /\ ((T-T_b)^2 + D^2)) - e^{-((Tm\ -\ (T-Tb))/\Delta T))}$. Ψ, D: constantes empíricas; T_b: temperatura base; T_m: umbral máximo de temperatura; ΔT: longitud del eje de abscisas entre la temperatura óptima y el umbral máximo; R_a^2: coeficiente de determinación ajustado; UmD: umbral mínimo de desarrollo; UMD: umbral máximo de desarrollo; TO: temperatura óptima de desarrollo.

Estado/ Estadio	ψ	D	T_b (ºC)	T_m (ºC)	ΔT (ºC)	R_a^2	UmD (ºC)	UMD (ºC)	TO (ºC)
Huevo	1,1563	32,1061	5,5992	34,2754	2,1142	0,9910	5,8	38,8	33,0
N1	247,1919	357,0769	6,7362	43,3631	2,6877	0,9489	6,7	36,8	31,7
N2	325,5777	508,0874	2,3371	40,9752	1,2528	0,9701	2,4	36,4	33,2
N3	51,4999	133,4088	4,6688	55,5718	7,3672	0,9504	8,7	40,4	31,8
N4	53,3711	199,2769	4,0691	45,6427	3,2134	0,9850	4,1	38,2	32,3
N5	9,415	119,9111	3,5908	42,5801	2,9994	0,9986	3,6	38,5	33,0

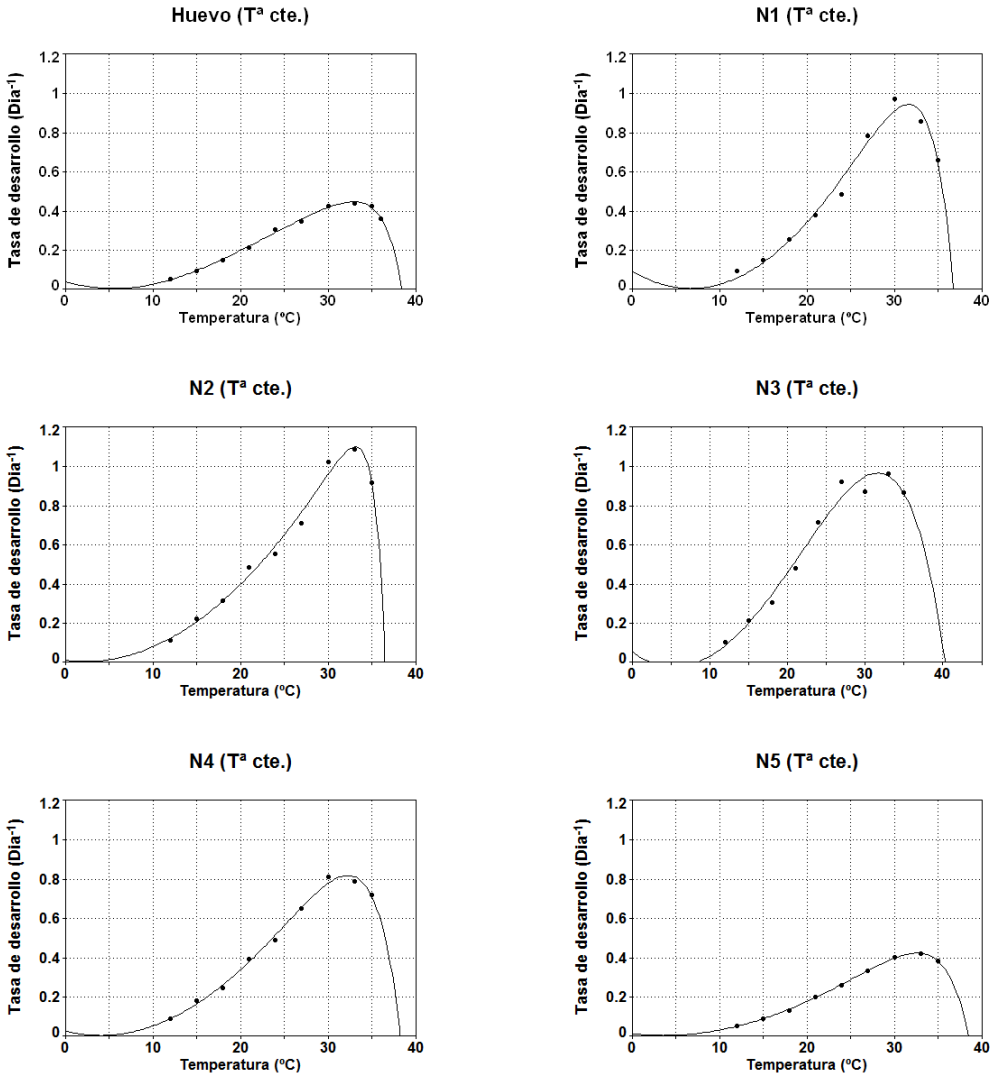


Figura 21. Modelo de Logan tipo III para el huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus*. (•) tasa de desarrollo observada; (-) línea de mejor ajuste.

3.3.3. Modelo de Lactin

Tabla 5. Parámetros estimados del modelo de Lactin ajustado para la tasa de desarrollo (r) del huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus* en función de la temperatura (T).
$r(T) = e^{\rho T} - e^{(\rho Tmax - (Tmax - T)/\Delta)} + \lambda$. ρ: aceleración de la función; λ: parámetro que permite a la curva cortar al eje de abcisas a temperaturas subóptimas; T_{max}: temperatura supraóptima a la que r(T) = λ; R_a^2: coeficiente de determinación ajustado; UmD: umbral mínimo de desarrollo; UMD: umbral máximo de desarrollo; TO: temperatura óptima de desarrollo.

Estado/ Estadio	ρ	λ	T_{max} (ºC)	Δ (ºC)	R_a^2	UmD (ºC)	UMD (ºC)	TO (ºC)
Huevo	0,0155	-1,1671	40,9166	2,2952	0,9899	10,0	38,5	33,0
N1	0,0277	-1,3712	37,9519	1,9401	0,9329	11,6	36,6	31,9
N2	0,0267	-1,2915	36,7945	0,8738	0,9708	9,8	36,2	33,2
N3	0,0318	-1,3937	42,2040	4,5663	0,9540	10,6	39,4	31,8
N4	0,0243	-1,2767	39,3837	2,2148	0,9816	10,1	37,7	32,4
N5	0,0146	-1,1588	39,5022	1,7365	0,9914	10,0	37,5	32,8

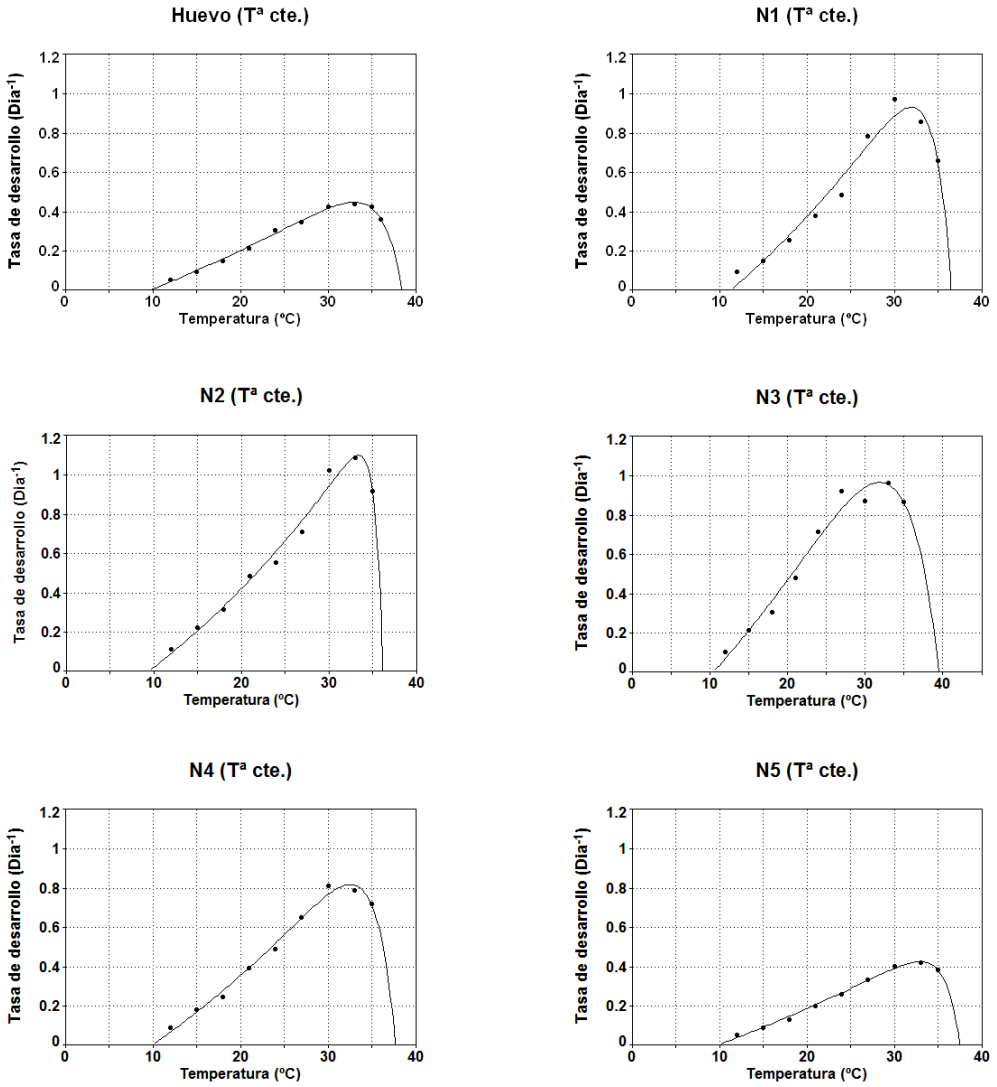


Figura 22. Modelo de Lactin para el huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus*.

(•) tasa de desarrollo observada; (-) línea de mejor ajuste.

3.3.4. Modelo de Brière

Tabla 6. Parámetros estimados del modelo de Brière ajustado para la tasa de desarrollo (r) del huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus* en función de la temperatura (T).
$r(T) = a\ T\ (T - T_0)\ (T_L - T)^{1/2}$ *para* $T_0 < T < T_L$.a:constante empírica; T_0: umbral mínimo de desarrollo (UmD) ; T_L: umbral máximo de desarrollo (UMD); R_a^2: coeficiente de determinación ajustado; TO: temperatura óptima de desarrollo.

Estado/ Estadio	a	T_0 (ºC)	T_L (ºC)	R_a^2	TO (ºC)
Huevo	$2199 \cdot 10^{-7}$	9,6448	39,2612	0,9854	32,4
N1	$5909 \cdot 10^{-7}$	12,1221	37,1534	0,9054	31,2
N2	$4350 \cdot 10^{-7}$	9,4627	41,5382	0,9315	34,2
N3	$5353 \cdot 10^{-7}$	9,9010	38,3621	0,9674	31,8
N4	$4070 \cdot 10^{-7}$	9,9849	39,2622	0,9734	32,8
N5	$1938 \cdot 10^{-7}$	9,5019	40,1191	0,9855	33,2

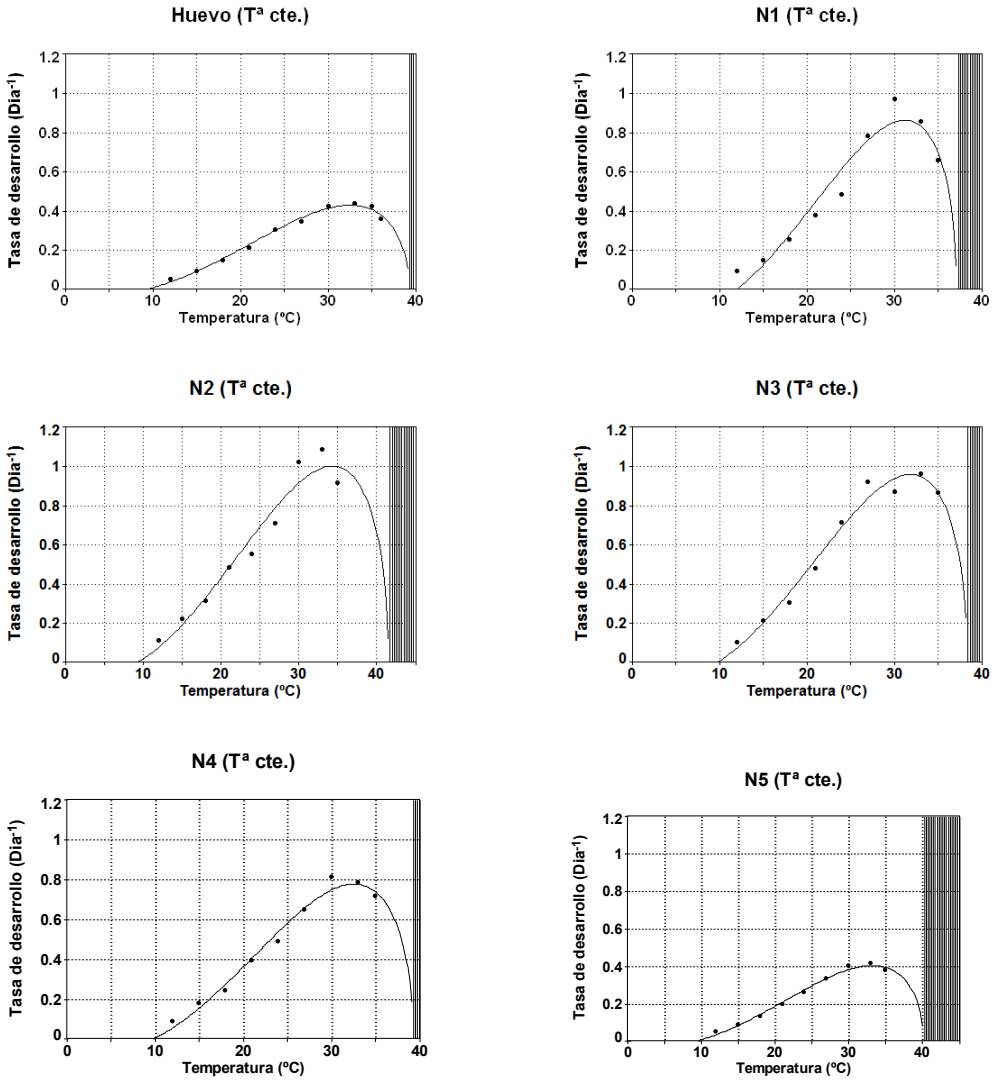


Figura 23. Modelo de Brière para el huevo y las ninfas (N1-N5) de *O. laevigatus*.
(•) tasa de desarrollo observada**; (-)** línea de mejor ajuste.

3.4. Temperaturas variables

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de desarrollo a una temperatura constante de 24º C y a temperaturas variables intradiarias (con una media de 24º C), ni para el estado de huevo (U=5488,0; P=0,970174) ni para el estado ninfal (U=966,0; P=0,140576). Solamente se encontraron diferencias significativas para los estadios ninfales N1 (U=1462,5; P=0,00788751) y N3 (U=1519,0; P=0,0272141). En estos casos las diferencias entre medias resultaron ser de, aproximadamente, 4 y 6 horas, respectivamente.

3.5. Validación del modelo

La Tabla 7 muestra las medias de la duración del desarrollo obtenidas en el ensayo de validación en condiciones reales de campo y los valores estimados por los diferentes modelos para el estado de huevo y los diferentes estadios ninfales, así como para la totalidad del estado ninfal. También se presenta el porcentaje de ajuste de cada modelo con respecto al valor obtenido en campo.

Tabla 7. Tiempo de desarrollo (días) en condiciones de exterior y tiempo de desarrollo predicho (días) para cada modelo con su porcentaje de ajuste.

	Exterior	Lineal		Logan III		Lactin		Brière	
Estado	Tiempo desarrollo	Tiempo desarrollo predicho	Ajuste (%)	Tiempo desarrollo predicho	Ajuste (%)	Tiempo desarrollo predicho	Ajuste (%)	Tiempo desarrollo predicho	Ajuste (%)
Huevo	4,07	3,98	97,74	3,85	94,66	3,83	94,15	3,83	94,15
N1	1,47	1,71	116,36	1,58	107,84	1,56	106,42	1,46	99,31
N2	1,45	1,90	130,81	1,69	116,44	1,71	117,88	1,19	81,84
N3	1,84	1,67	90,50	1,52	82,58	1,52	82,58	1,52	82,58
N4	3,11	2,52	81,18	2,71	87,22	2,63	84,53	2,73	87,89
N5	4,51	4,00	88,62	3,88	85,85	3,81	84,46	3,85	85,38
Total N	12,31	11,79	95,81	11,37	92,42	11,23	91,24	10,75	87,34

Todos los modelos predicen un desarrollo más rápido que el observado en campo, excepto en el caso del modelo lineal, Logan tipo III y Lactin para las ninfas N1 y N2, que predicen un desarrollo más lento.

El modelo lineal predice un desarrollo más rápido que el observado en condiciones reales, tanto para el estado de huevo como para el estado ninfal, e inferior al 5% en ambos casos. Los modelos no lineales predicen un desarrollo en torno a un 6% más rápido para el estado de huevo. En el caso

del estado ninfal, los modelos de Logan tipo III y Lactin predicen un desarrollo en torno a un 8% más rápido, y el modelo de Brière en torno a un 13% también más rápido.

4. Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que la supervivencia y el tiempo de desarrollo del huevo y de las ninfas de *O. laevigatus* están fuertemente afectados por la temperatura, tal y como ya habían demostrado otros autores (Alauzet *et al*., 1994; Tommasini & Benuzzi, 1996; Cocuzza *et al*., 1997; Sanchez & Lacasa, 2002).

La curva que relaciona la mortalidad con las temperaturas constantes tiene forma de U para las diferentes fases inmaduras de desarrollo de los insectos. La mortalidad suele ser muy baja y prácticamente similar dentro del rango de temperaturas favorables, y más allá de ciertas temperaturas constantes críticas se presentan elevados porcentajes de mortalidad (Wagner *et al.,* 1987; Fornasari, 1995, Lamana & Miller, 1995; Smith & Ward, 1995; Marco *et al*., 1997; Sánchez-Ramos *et al.* 2015). Por otra parte, el rango sobre el cual se da una baja mortalidad es variable y específico de cada especie (Li, 1995).

Tal y como se observa en los resultados del presente trabajo, en general, existe una baja mortalidad para el rango de temperaturas constantes que se ha estudiado. Para el estado de huevo se ha podido observar que la curva de mortalidad tiene forma de “J”, es decir, el porcentaje de mortalidad para las temperaturas más altas ensayadas es mayor que para el resto. Esto indica que el estado de huevo presenta una buena adaptación a bajas temperaturas, aunque no por ello la adaptación a temperaturas altas es mala, ya que el porcentaje de mortalidad comienza a ser elevado solo a partir de valores tan elevadas como 35-36 ºC. Es preciso señalar que los ensayos se hacen con material vegetal perecedero, de modo que las altas temperaturas constantes aceleran el proceso de desecación, factor que puede influir en el desarrollo del huevo o los primeros estadios ninfales del depredador. Esta desecación no es tan acusada en plantas cultivadas a las temperaturas ensayadas, de modo que es posible que, mitigado este factor, sea posible el desarrollo del insecto a temperaturas más altas que las ensayadas.

Todos los estadios ninfales presentan unos porcentajes de mortalidad muy bajos dentro de las temperaturas evaluadas, sin poder apreciar de forma clara un aumento de la mortalidad en el caso de las más extremas. En el caso de los estadios N1 y N5 se puede apreciar un ligero aumento de la mortalidad para esas temperaturas, aunque sin llegar a tener una curva de mortalidad con forma de "U". Este hecho se podría relacionar con una mayor fragilidad en el caso de las ninfas neonatas, y con una mayor sensibilidad ante el cambio de estado por parte de las ninfas de mayor edad (de N5 a adulto).

Los resultados obtenidos en cuanto a la mortalidad son similares a los aportados por otros autores. Así, Sánchez & Lacasa (2002) obtuvieron valores inferiores al 15% en todas las temperaturas de ensayo (20, 25, 30 y 35ºC) y Cocuzza *et al*. (1997) aportaron datos similares a las temperaturas de 15, 25 y 35 ºC.

La duración del desarrollo para el estado de huevo osciló entre 20,31 días, a 12 ºC, y 2,31 días, a 33 ºC. Cocuzza *et al*. (1997) obtuvieron valores de 11,4; 4,0 y 3,1días a 15, 25 y 35 ºC, respectivamente, mientras que Sánchez & Lacasa (2002) reportaron duraciones de 7,4; 4,3; 3,0 y 2,4 días, a 20, 25, 30 y 35 ºC, respectivamente. En ambos casos, la duración del desarrollo fue mayor que en este estudio.

El quinto estadio ninfal (N5) presentó un mayor tiempo de desarrollo que los cuatro primeros (N1 a N4), con valores similares a los del estado de huevo, y que osciló entre 20,79 días, a 12 ºC, y 2,41 días, a 33 ºC. El tiempo de desarrollo en el caso de las ninfas de segundo estadio (N2) fue menor de 1 día a las temperaturas de 30 y 33 ºC (0,98 y 0,92 días, respectivamente) lo que implica una tasa de desarrollo superior a la unidad.

El tiempo total de desarrollo para los cinco estadios ninfales (N1 a N5) osciló entre los 63,0 días, a 12 ºC, y 6,8 días, a 33 ºC, valores menores en todos los casos que los aportados por Cocuzza *et al*. (1997) (48,2; 14,1 y

10,1 días, a 15, 25 y 35 ºC, respectivamente) y Sánchez & Lacasa (2002) (27,1; 16,1; 12,2 y 9,9 días, a 20, 25, 30 y 35 ºC, respectivamente).

Las diferencias obtenidas en los tiempos de desarrollo por los autores anteriores pueden ser una consecuencia del uso de poblaciones con diferentes orígenes y, por tanto, adaptadas a condiciones climáticas distintas. Este tipo de respuesta fue señalada por Campbell *et al.* (1974) para *Acyrthosiphon pisum* (Harris 1776), *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus 1758) (Hemiptera: Aphididae) y *Diaeretiella rapae* (M'Intosh 1885) (Hymenoptera: Braconidae). Poblaciones procedentes de regiones cálidas (Berkeley, California) presentaban un tiempo y unos umbrales de desarrollo mayores que otras poblaciones procedentes de regiones frías (Vancouver, British Columbia).

Los modelos lineales de desarrollo se han utilizado durante muchos años y se siguen empleando en la actualidad, dado que los parámetros que definen el modelo se estiman con mucha facilidad y rapidez, presentando en muchas ocasiones un nivel de precisión bastante aceptable (Fan *et al*., 1992). Aplicando la regresión lineal, el umbral mínimo de desarrollo (UmD) estimado para *O. laevigatus* fue de 7,8 ºC para el estado de huevo y de valores comprendidos entre 8,6 y 9,9 ºC para los estadios ninfales. La integral térmica obtenida sumando los DD correspondientes al estado de huevo y los cinco estadios ninfales para el desarrollo de huevo a adulto se estimó en 228,3 DD. Debido a la existencia de UmD diferentes para cada forma inmadura, es necesario cuantificar las tasas de desarrollo para cada una de ellas por separado. Esta necesidad será mayor cuanto mayor sea la diferencia entre esos UmD. Así, Marco *et al*. (1997) obtuvieron un incremento del 68% en los DD necesarios para completar el desarrollo de *Aubeonymus mariaefranciscae* (Roudier 1981) (Coleoptera: Curculionidae), cuando se estimaban sumando integrales térmicas de cada estado y estadio respecto a cuando se hacía de modo global. Esta gran diferencia fue debida a que el cuarto estadio larvario y el estado de pupa presentaban unos UmD significativamente superiores a los del resto de estadios larvarios y al del estado de huevo, debido al ciclo estacional del curculiónido, según el cual

las larvas jóvenes viven en épocas más frescas del año, mientras que las de último estadio y las pupas se enfrentan ya a temperaturas más elevadas.

Sánchez & Lacasa (2002) obtuvieron un UmD para el estado de huevo de 12,8 ºC y unos valores comprendidos entre 10,5 y 11,5 ºC para el caso de los estadios ninfales. Asimismo, obtuvieron un valor de la integral térmica para el desarrollo de huevo a adulto de 285,7 DD, con un UmD de 11,3 ºC. Estos valores son superiores a los obtenidos en nuestro caso. Este hecho puede ser debido a que la temperatura más baja de su estudio fue de 20 ºC y la pendiente de la recta resultante fue mayor al no tener datos a temperaturas menores. También puede ser debido a que la metodología de ensayo fue diferente, y a que utilizaron como sustrato de oviposición hojas de geranio (*Pelargonium peltatum*), y hojas de pimiento como sustrato y fuente de humedad para las ninfas.

Fan *et al*. (1992) señalaron que la acumulación de DD para una especie determinada se ve influenciada por factores fisiológicos (tales como el sustrato o la disponibilidad de enzimas) y metodológicos (como por ejemplo la aproximación en el cálculo de los umbrales de desarrollo). A pesar de todo, la aproximación es suficientemente precisa debido a que la temperatura es, con mucha diferencia, el principal factor determinante de la tasa de desarrollo (Higley *et al.,* 1986).

Cuando se aplicaron los modelos no lineales Logan tipo III, Lactin y Brière, las temperaturas óptimas de desarrollo estimadas fueron próximas entre sí y los valores oscilaron entre 31,2 y 33,2 ºC. Igualmente, son muy similares entre sí las curvas ajustadas de estos modelos, produciéndose un brusco descenso de la tasa de desarrollo desde la temperatura óptima predicha hasta el umbral máximo de desarrollo.

Los UmD obtenidos a partir de los modelos oscilaron entre 2,4 y 12,1 ºC, en función del modelo y la fase de desarrollo. Los UmD predichos por el modelo de Logan tipo III fueron más bajos que los obtenidos a través de los modelos lineal, Lactin y Brière. Esto es debido a que las curvas del modelo

de Logan tipo III presentan una pendiente muy suave para bajas temperaturas (con cierta tendencia asintótica). Además, hay que señalar que el cambio de tendencia ascendente de la curva que se observa a temperaturas inferiores al UmD es una característica matemática de este modelo que no tiene significado biológico. Por su parte, los umbrales máximos de desarrollo predichos por los modelos no lineales para el huevo y las ninfas de *O. laevigatus* oscilaron entre 36,2 ºC y 41,5 ºC.

Los tres modelos no lineales ofrecieron un mejor ajuste que el modelo lineal ($0,75 < R_a^2 < 0,94$) para todas las formas inmaduras de *O. laevigatus*, con unos coeficientes de determinación ajustados (R_a^2) en torno a 0,99 para el estado de huevo y superiores a 0,90 para los estadios ninfales.

Según Campbell *et al*. (1974), la tasa de desarrollo a temperaturas variables no debería presentar diferencias significativas con la obtenida a temperaturas constantes. No obstante, diversos autores han demostrado que la variación de la temperatura a lo largo de un ciclo diario puede jugar un importante papel en el desarrollo de algunas especies de insectos (Roltsch *et al*., 1990; Hagstrum & Milliken, 1991; Fornasari, 1995; García-Ruiz *et al*., 2011). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la duración media del desarrollo del huevo y del estado ninfal entre una temperatura de 24 ºC constante y una temperatura media de 24 ºC, pero variable dentro del día, sí se encontraron diferencias significativas en el caso de las ninfas N1 y N3. A pesar de ello, los tiempos medios de desarrollo solamente difieren en 0,1695 y 0,223 días (es decir, 4 y 5,5 horas), respectivamente, tiempo mucho menor que el establecido entre dos observaciones sucesivas, que en estos ensayos se fijó en 24 horas. Si se calcula (mediante la suma de las medias) el tiempo de desarrollo necesario para completar el estadio N3, se obtienen 5,3 y 5,2 días a temperatura constante y variable, respectivamente, lo que sugiere que, de algún modo, hay una compensación de las diferencias observadas en estos estadios.

Parece importante señalar que los valores obtenidos del error estándar son particularmente bajos en todos los casos, fundamentalmente debido a la baja variabilidad intrínseca del parámetro estudiado. Esta baja variabilidad dentro de cada tratamiento, hace que los resultados medios obtenidos aparezcan diferentes bajo las condiciones del análisis estadístico, tal y como se observa en el caso de los míridos depredadores *Nesidiocoris tenuis* y *Macrolophus pygmaeus* (Martínez *et al*., 2016; Martínez *et al*., 2017).

Todos los modelos presentaron un buen porcentaje de ajuste en la predicción del tiempo de desarrollo con respecto al observado al aire libre. Aunque el modelo lineal es el que presenta el porcentaje de ajuste más elevado con respecto a una situación de temperatura exterior, no se recomienda la utilización de este modelo debido a que a temperaturas altas extremas se obtendrían predicciones de menor calidad, al no considerar este modelo el umbral máximo de desarrollo en su configuración matemática y sí un aumento indefinido de la tasa de desarrollo con la temperatura. Para suplir este inconveniente, podría fijarse un umbral máximo dentro del intervalo de temperaturas con relación lineal, tal y como sugieren algunos autores (Martínez *et al*., 2017; Sánchez-Ramos *et al*. 2015; De Clercq & Degheele, 1992). No obstante, dado que hoy en día se dispone de suficientes herramientas matemáticas e informáticas para la construcción y uso de los modelos no lineales, la simplicidad del modelo lineal no le confiere a penas ventajas, como hace algunos años.

El porcentaje de ajuste con respecto a una situación de temperatura exterior de los modelos no lineales fue superior al 80% en todos los casos. Considerando que esta variación es de menos de 5 horas de diferencia en las predicciones de los modelos, se puede concluir que los modelos no lineales predicen bien el tiempo de desarrollo de *O. laevigatus*.

Capítulo II

CAPÍTULO II. Efectos secundarios de productos fitosanitarios sobre *Anthocoris nemoralis*

1. Introducción

La compatibilización del empleo de productos fitosanitarios con los enemigos naturales es, en las circunstancias actuales, uno de los aspectos clave a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo con éxito un programa de CBP. Efectivamente, la utilización de productos fitosanitarios es una práctica que sigue siendo imprescindible en los agroecosistemas comerciales. A ello hay que añadir el hecho de que, en muchas ocasiones, los enemigos naturales se ven más afectados por estos compuestos que las propias plagas (entre otros motivos, por su reducido tamaño y su consiguiente mayor relación superficie/volumen, por su elevada movilidad y por el efecto de la reducción de su alimento que se produce cuando bajan las poblaciones de la plaga, sobre todo, cuando el enemigo natural es monófago u oligófago). Por todo ello, se hace esencial la compatibilización de ambos métodos, y para conseguirla resulta imprescindible conocer los efectos secundarios de los productos fitosanitarios sobre los enemigos naturales.

1.1. Contaminación de los enemigos naturales por los productos fitosanitarios

Las principales vías por las cuales los enemigos naturales se exponen a los productos fitosanitarios son el contacto directo, el contacto residual y la ingestión (Croft, 1990). Al aplicar el producto en el cultivo, el organismo de control biológico puede entrar directamente en contacto con él en el momento de realizar la aplicación o inhalar los vapores que se producen (contacto directo). Posteriormente, se puede producir una contaminación por el contacto sobre el residuo seco del producto que queda en el cultivo (contacto residual) o por el consumo de presas contaminadas con él o de la propia planta huésped (ingestión).

Según Croft (1990) el modo más habitual por el cual los enemigos naturales se exponen a los productos fitosanitarios es por la vía del contacto

residual, aunque para tener un conocimiento más completo del efecto que puede producir un producto sobre los enemigos naturales, es necesario tener en cuenta todas las formas posibles de exposición, como la aplicación tópica, la ingestión o la contaminación de la cadena trófica (Candolfi *et al*., 2000; Medina *et al*., 2008).

1.2. Metodologías de evaluación de los efectos secundarios

Uno de los principales objetivos de la Organización Internacional para la Lucha Biológica e Integrada (OILB), a través de su grupo de trabajo denominado Plaguicidas y Organismos Beneficiosos, es la caracterización de los productos fitosanitarios en relación a la compatibilidad de uso con los enemigos naturales, en programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP).

Para ello, la OILB ha propuesto un esquema secuencial que permite evaluar los efectos secundarios de los productos fitosanitarios, de modo que cuando uno de ellos es inocuo en la fase de estudio en laboratorio, se asume que el producto es seguro para su utilización en campo. Si en la fase de laboratorio resulta que no es seguro, se debe seguir estudiando en ensayos posteriores, tales como laboratorio extendido, semicampo y campo (Hassan 1985; Van de Veire *et al*., 2002)

Así, en una primera fase, se realizan ensayos de laboratorio en condiciones controladas con el objetivo de evaluar la toxicidad del residuo fresco del producto, generalmente depositado sobre placas de vidrio, tanto en los estados de desarrollo más susceptibles como en los menos susceptibles. En el caso de depredadores con metamorfosis heterometábola, se considera que los estadios ninfales son los más susceptibles, mientras que los adultos y huevos lo son menos (Hassan, 1994; Sterk *et al*., 1999; Van de Veire *et al*., 2002; Medina *et al*., 2003). En esta primera fase, se pueden incluir ensayos de laboratorio extendido, que tienen la peculiaridad de evaluar la toxicidad del residuo fresco del producto depositado sobre material vegetal.

Con los resultados de estos ensayos se determina la necesidad de seguir realizando otros posteriores siguiendo el esquema secuencial propuesto por la OILB. Así, si el producto resulta tóxico para el enemigo natural, se pasa a una segunda fase de estudio en semicampo. En ella, se realizan ensayos sobre planta, bien en un invernadero o al aire libre a pequeña escala y en condiciones controladas o semicontroladas.

En el caso de que el producto siga siendo tóxico en condiciones de semicampo, se pasa a una tercera fase en la que se realizan ensayos en condiciones reales de cultivo.

En las diferentes fases se evalúan los efectos a corto plazo o directos, siendo la mortalidad el parámetro más importante, y los efectos a largo plazo o subletales, siendo los parámetros biológicos de los adultos los que tienen mayor importancia en este caso (longevidad, fecundidad, fertilidad y mortalidad y tiempo de desarrollo de la descendencia) (Medina *et al*., 2008). En este sentido, la tasa intrínseca de crecimiento de la población (r_m) constituye el parámetro más importante para caracterizar los efectos subletales. También se pueden estudiar otros efectos subletales que afectan al comportamiento, tales como la movilidad, orientación, la conducta alimenticia y de oviposición (Desneux *et al*., 2007).

En función del efecto que los productos evaluados tengan sobre los enemigos naturales, la OILB propone cuatro categorías para su clasificación: 1 inocuo, 2 ligeramente tóxico, 3 moderadamente tóxico, y 4 tóxico (Hassan, 1994).

2. Materiales y métodos

2.1. Productos ensayados

Actualmente, *A. nemoralis* es un depredador que se utiliza como organismo de control biológico en plantaciones comerciales de peral, por lo que la elección de las materias activas a evaluar se hizo en base a los productos fitosanitarios que generalmente se utilizan en este cultivo.

Para el ensayo con insecticidas se tomó el clorpirifos como control positivo debido a que es un producto de categoría 4, según la clasificación OILB cuando se aplica sobre adultos de *Anthocoris* (Boller *et al.*, 1988). Los productos se eligieron de diferentes familias químicas y con distintos modos de acción: dos sustancias de origen natural, azadiractina y spinetoram (spinosin semisintético); un derivado del ácido tetrónico, spirotetramat; y dos reguladores del crecimiento, metoxifenocida y diflubenzurón.

Se decidió realizar un ensayo con fungicidas dado que estos compuestos se emplean de forma habitual en plantaciones comerciales de peral en las que se utiliza *A. nemoralis*. Se hipotetizó con la idea de que los fungicidas podrían tener algún tipo de efecto sobre el depredador tal y como está documentado en la bibliografía sobre otros grupos de artrópodos. Los fungicidas elegidos fueron de distintas familias químicas y modos de acción, siendo mancozeb, captan, tebuconazol y trifloxistrobín las materias activas evaluadas. Para el ensayo con fungicidas se eligió el imidacloprid como control positivo para determinar el efecto de otro insecticida diferente al clorpirifos, al que *a priori* se le podría atribuir una alta toxicidad sobre *A. nemoralis* en las condiciones de ensayo.

Los productos evaluados se muestran en la Tabla 8

Tabla 8. Productos evaluados en fase de laboratorio por contacto residual sobre placa de vidrio en *Anthocoris nemoralis*.

Producto comercial	Número de registro	Titular	Materia activa y formulación	Modo de Acción IRAC / FRAC	Máxima dosis recomendada por el titular
INSECTICIDAS					
Align®	23.291	Sipcam Inagra. S.A.	Azadiractina 3,2% (EC) p/v	Modo de acción desconocido o incierto	0,150%
Clorifos® 48 EC	21.484	Probelte. S.A.	Clorpirifos 48% (EC) p/v	Inhibidor de la acetilcolinesterasa	0,200%
Dimilin® 25	14.252	Arysta Lifescience Registrations Great Britain LTD.	Diflubenzurón 25% (WG) p/p	Inhibidor de la biosíntesis de quitina, tipo 0	0,060%
Kopy®	23.889	Sapec Agro S.A.U.	Imidacloprid 20% (SL) p/v	Agonista del receptor nicotínico de la acetilcolina	0,075%
Runner®	23.746	Dow Agrosciences Iberica. S.A.	Metoxifenocida 24% (SC) p/v	Agonista del receptor de ecdisona	0,040%
Delegate® 250 WG	Pendiente Autorización Excepcional	Dow Agrosciences Ibérica S.A.	Spinetoram 25% (WG) p/p	Activador del receptor alostérico nicotínico de la acetilcolina	400 g/ha
Movento® Gold	ES-00024	Bayer Cropscience. S.L.	Spirotetramat 10% (SC) p/v	Inhibidor de la acetil CoA carboxilasa	0,150%
FUNGICIDAS					
Merpan® 47,5 SC	23.943	Adama Agriculture España S. A.	Captan 47,5 % (SC) p/v	Actividad de contacto multisitio	0,400%
Macuprax®	16.931	Comercial Química Massó, S. A.	Mancozeb 80% (WP) p/p	Actividad de contacto multisitio	0,300%
Folicur® 25 WG	21.450	Bayer Cropscience. S. L.	Tebuconazol 25% (WG) p/p	Inhibidor de la esterol-14-demetilasa en la biosíntesis de esteroles	0,075%
Flint®	22.338	Bayer Cropscience. S. L.	Trifloxistrobin 50% (WG) p/p	Inhibe la respiración en el complejo III: citocromo bc1 en el sitio Qo	0,015%

2.2. Individuos de *A. nemoralis* empleados en los bioensayos

Los individuos de *A. nemoralis* utilizados en los bioensayos procedían de una cría masiva establecida en el año 2012, a partir de adultos comercializados (AnthoPAK®) por la empresa Bioplanet. El método de cría empleado fue idéntico al descrito para *O. laevigatus* en el apartado 2.1 del Capítulo I.

Se utilizaron adultos de una edad máxima de 48 horas para asegurar que, en el momento del tratamiento, las hembras se encontraban aún en el periodo de preoviposición, que por término medio es de 5,5 días cuando se alimentan de huevos de *E. kuehniella* (Aragón-Sánchez *et al*., 2016).

2.3. Aplicación de los productos

La aplicación de los productos sobre sustrato de vidrio se realizó mediante una Torre de Potter® (Burkard Manufacturing Co. Ltd., Rickmansworth, Hertfordshire, UK), para pulverizaciones de precisión en condiciones de laboratorio (Potter, 1952). Este equipo pulveriza gotas de pequeño tamaño, muy uniformes y con una distribución homogénea sobre la superficie a tratar. Una vez que se evapora el agua utilizada como excipiente, el residuo fresco del producto queda fijado a la superficie de vidrio (Figura 24).

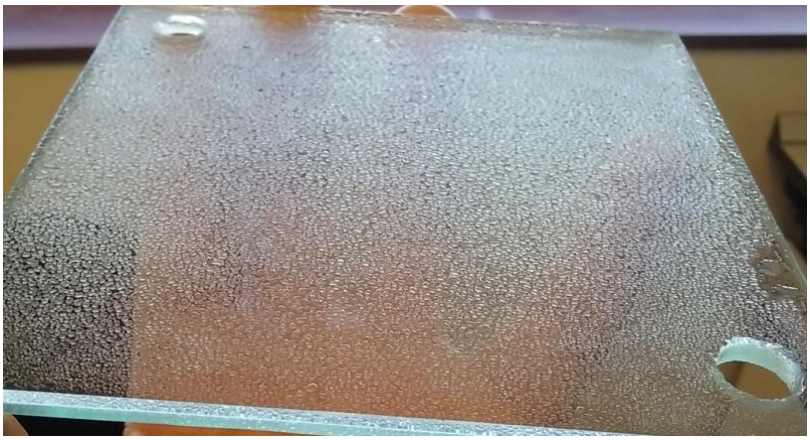


Figura 24. Estado final de la deposición de producto sobre placa de vidrio mediante pulverización con Torre de Potter®

Para evitar la presencia de posibles restos de residuos en la Torre de Potter se procedió a limpiarla con agua al inicio y al final de cada tratamiento, realizando un triple enjuague y secado con papel.

Byers *et al*. (1971) establecieron el parámetro TRV (de sus siglas en inglés Tree Row Volume), definido como el volumen de vegetación de un cultivo por unidad de área cultivada. Su consideración permite ajustar el volumen de caldo a aplicar en función del volumen foliar del cultivo en el momento del tratamiento para obtener una buena eficacia de aplicación, un óptimo recubrimiento y el menor impacto ambiental posible. El TRV se expresa en litros de caldo (preparado a la dosis recomendada por el titular del producto) por m^3 de volumen vegetativo.

Teniendo en cuenta esta consideración, se determinó que un volumen de caldo en condiciones de campo de 650 l/ha, es suficiente para conseguir un buen recubrimiento de la superficie foliar en plena vegetación, para una plantación de peral de tipología media.

Antes de realizar las aplicaciones se procedió al calibrado del equipo para ajustar el volumen de aplicación a su equivalente en condiciones de campo, de modo que se aplicaron 3,5 ml de caldo a una presión de 0,2 bar.

2.4. Descripción de los recintos de tratamiento

Cada recinto de tratamiento consistió en una adaptación de las cajas desmontables descritas por Jacas & Viñuela (1994). Estos recintos se componen de un aro de metacrilato de 10 cm de diámetro exterior y 3 cm de altura, situado entre dos placas de vidrio de 12x12 cm y 4 mm de grosor. Estas tres piezas se unieron mediante tiras elásticas de goma. El aro presenta 4 orificios de 4 mm de diámetro, de los cuales, tres están tapados con cinta adhesiva transpirable para garantizar una buena ventilación del recinto y evitar la fuga de los insectos. El cuarto orificio sirve para suministrar aire húmedo al recinto mediante una aguja hipodérmica conectada a una pequeña tubería de silicona que forma parte de un circuito de ventilación forzada. Este circuito está formado por un compresor de aire de acuario conectado a un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, con agua en su interior, que distribuye el aire húmedo de forma continua a los recintos de tratamiento a través de la tubería a la que se conectan las agujas hipodérmicas, según se muestra en la (Figura 25).

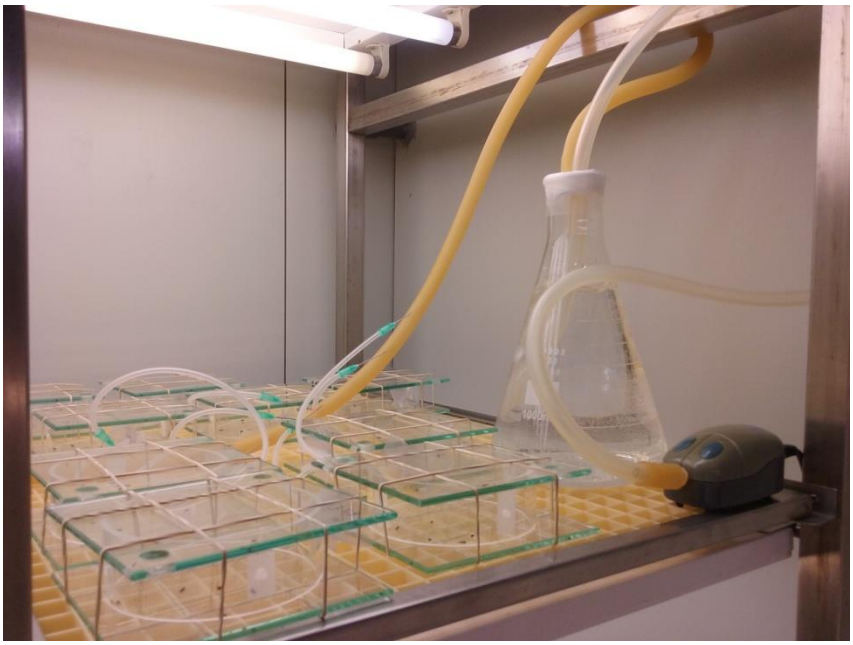


Figura 25. Recintos de ensayo conectados al circuito de ventilación forzada con aire húmedo en cámara de condiciones controladas.

Los productos se aplicaron sobre las dos caras internas de las placas de vidrio que forman cada recinto. Tras la aplicación, las placas se dejaron

secar en el laboratorio a temperatura ambiente. Una vez secas, se montaban los recintos de tratamiento añadiendo en el interior de cada uno de ellos 15 individuos adultos de *A. nemoralis* y huevos de *E. kuehniella* para su alimentación *ad libitum*. Posteriormente, se conectaban al circuito de ventilación forzada y todo el conjunto permanecía en el interior de una cámara de crecimiento con condiciones controladas de temperatura y humedad (24 ± 1 ºC; 60 ± 10 %) y con un fotoperiodo de 16:8 (L:O).

Los bioensayos se llevaron a cabo en dos sesiones, una con los productos insecticidas y otra con los fungicidas, y en cada sesión se utilizaron los correspondientes controles positivo y negativo. El control negativo utilizado en ambos casos fue agua y los positivos fueron, clorpirifos en el ensayo con insecticidas e imidacloprid en el ensayo con fungicidas, tal como se ha descrito.

En este tipo de recintos, cabe la posibilidad de introducir un trozo de vaina de judía verde para ofrecer a los insectos una fuente de agua. En este caso, no se utilizó ningún tipo de material vegetal, ya que si se trata, existe el riesgo de interferencia del efecto del producto por ingestión cuando los insectos clavan su aparato bucal en la vaina de judía. Por otro lado, conviene mencionar que si se introduce material vegetal sin tratar, puede disminuir el contacto con el residuo del producto respecto a una situación en la que dicho material fuese tratado o no estuviera presente.

Se hicieron cinco repeticiones por cada producto ensayado, consistiendo cada repetición en un recinto de tratamiento.

2.5. Determinación del efecto sobre la mortalidad

Para evaluar la mortalidad de *A. nemoralis* por contacto sobre residuo fresco se anotó la mortalidad tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Los individuos que no reaccionaban después de ser tocados varias veces con un pincel fino se consideraban muertos.

El efecto letal se calculó a partir de la mortalidad obtenida tras 72 h de exposición. Los valores de mortalidad obtenidos en los tratamientos se corrigieron respecto al control utilizando la fórmula de Schneider-Orelli (Püntener, 1981), que es una ligera transformación de la fórmula original de Abbott (1952):

$$M(\%) = \frac{Mt - Mc}{100 - Mc} \times 100$$

Dónde:

- M(%) es la mortalidad corregida en tanto por ciento.
- Mt es el porcentaje de mortalidad en el tratamiento.
- Mc es el porcentaje de mortalidad en el control.

Una vez obtenidos los valores de las mortalidades corregidas, se utilizaron los valores de la Tabla 9 para clasificar los productos según las categorías propuestas por la OILB (Hassan, 1985; Hassan, 1994):

Tabla 9. Clasificación toxicológica propuesta por la OILB para ensayos de laboratorio

	Categorías OILB	Mortalidad corregida
1	Inocuo	<30%
2	Ligeramente tóxico	30-79%
3	Moderadamente tóxico	80-99%
4	Tóxico	>99%

2.6. Determinación de los efectos subletales

Una vez transcurridas 72 h de exposición al residuo fresco de los productos, los individuos supervivientes se transfirieron a una caja de plástico libre de residuo y se sexaron, separando machos y hembras.

Para evaluar los efectos subletales tras esas 72 h de exposición, se formaron tantas parejas de adultos como fue posible (15 parejas en todos los casos, excepto con azadiractina y spirotetramat, que se tomaron 11 y 13, respectivamente) con individuos supervivientes de cada tratamiento elegidos al azar. Las parejas se individualizaron en cajas prismáticas de plástico, de 6,5 x 4,5 x 2,5 cm (Figura 26). Estas cajas presentaban en la tapa un orificio de ventilación circular, de 2 cm de diámetro, cubierto con papel de filtro para permitir la renovación del aire y evitar el escape de los insectos.

En estas cajas se añadieron huevos de *E. kuehniella* para la alimentación de los adultos *ad libitum*, así como una sección de vaina de judía como sustrato de puesta y fuente de agua para el insecto. La sección de vaina fue parafinada por ambos extremos (Figura 26) para evitar su desecación rápida, impedir que los adultos se introdujeran en su interior y murieran accidentalmente durante la manipulación, y evitar que las hembras pusieran huevos dentro de la misma.

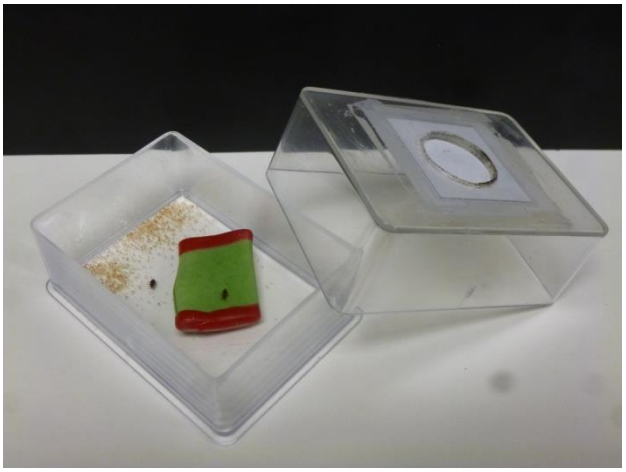


Figura 26. Recinto para la individualización de las parejas de *A. nemoralis* supervivientes al tratamiento con la porción de judía parafinada y el alimento.

La sección de vaina era retirada y sustituida por otra nueva cada dos días. Dos veces por semana se añadían huevos de *E. kuehniella* y una vez por semana se limpiaba la caja y, antes de añadir huevos frescos, se retiraban los huevos del pirálido que no habían sido consumidos.

Para determinar el efecto de cada producto sobre la longevidad y la fecundidad de los adulos, cada 24 horas se contaba el número de huevos puestos por cada hembra hasta su muerte, anotando también la fecha en la que sucedía ésta (se consideraba muerto aquél individuo que no reaccionaba después de ser tocado varias veces con un pincel fino).

A los 8 días de formar las parejas de adultos supervivientes, se tomaron, para cada tratamiento, entre 50 y 60 huevos de menos de 24 h de edad con el fin de evaluar el efecto de cada producto sobre la descendencia. Diariamente, las ninfas que emergían de estos huevos se fueron individualizando en cajas iguales a las descritas en el apartado 2.2.1 para *O. laevigatus*. En ellas se añadían, cada dos días, huevos de *E. kuehniella* para la alimentación de las ninfas *ad libitum*. Como fuente de agua se introdujo una pequeña porción de vaina de judía que era sustituida diariamente.

La supervivencia de la descendencia se calculó como el porcentaje de individuos que llegaron a alcanzar el estado adulto respecto a los huevos tomados inicialmente. Para la evaluación del tiempo de desarrollo no se consideraron las diferentes formas inmaduras por separado, sino que se tomó el dato del tiempo de desarrollo total, desde el aislamiento del huevo hasta el momento en el que la ninfa alcanzó el estado adulto.

Con las matrices de nacimientos (elaboradas a partir de los datos de puesta diaria de cada hembra), el periodo de preoviposición de las hembras adultas, y la supervivencia pre-reproductiva, se calcularon los parámetros de la tabla de vida para cada tratamiento por medio del programa r_m 2.0 (Taberner *et al.*, 1998). Además, se obtuvo el intervalo de confianza de la tasa intrínseca de crecimiento (r_m), a través de la aplicación de técnicas de

Bootstrap, empleando 500 réplicas, tal y como recomiendan Meyer *et al*. (1998).

Los parámetros de la tabla de vida calculados fueron los siguientes (Sánchez Ramos, 2000):

Tasa intrínseca de crecimiento (r_m), que representa la tasa de incremento por individuo bajo condiciones físicas específicas, en un ambiente ilimitado donde los efectos del incremento de la densidad no son considerados (Birch, 1948). La r_m es la constante en la ecuación diferencial para el incremento de una población en un ambiente ilimitado:

$$dN/dt = r_m\ t$$

La forma integrada de esta ecuación es:

$$N_t = N_o e^{r_m t}$$

Siendo:

- N_o = número de individuos a tiempo igual a 0
- N_t= número de individuos a tiempo igual a t
- r_m = tasa intrínseca de incremento
- t = tiempo

La r_m se interpreta como la diferencia entre la tasa de natalidad (n) y la de mortalidad (m): $r_m = n - m$, de modo que si $r_m > 0$ la población tiende a aumentar y si $r_m < 0$ la población disminuye y tiende a desaparecer.

Tasa finita de incremento (λ), que se define como el número de veces que una población con una distribución de edades estable se multiplica en la unidad de tiempo (Birch, 1948). Se calcula como:

$$\lambda = e^{r_m}$$

Tasa de reproducción neta (R_0), que se define como el número de hembras producidas por una hembra durante su vida (Hone, 1992). También suele definirse como el número de veces que una población se multiplica por generación (Laughlin, 1965) o, según la definición original de Lotka (1945), como la tasa de multiplicación en una generación. Se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$R_0 = \sum_{0}^{\infty} l_x m_x$$

Siendo:

- l_x = proporción de individuos supervivientes a la edad x (días)
- m_x = número medio de hembras producidas en la unidad de tiempo (días) por una hembra de la edad x (días).

Duración media de una generación (T), que según Laughlin (1965), se define como la edad media en el momento de la reproducción en una población con una distribución de edades estable. De forma más sencilla se definiría como el tiempo que transcurre desde que una generación nace hasta el momento medio de nacimiento de toda su progenie. T se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$T = \ln R_o / r_m$$

Tiempo de duplicación de la población (TDP), que es el tiempo necesario para que una población duplique su número de individuos. Se obtiene como:

$$TDP = \ln 2 / r_m$$

2.7. Análisis estadísticos

Cuando fue necesario llevar acabo comparaciones de medias se empleó el test paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA) con $\alpha = 0,05$. Son diversos los autores que indican la robustez de este test frente a violaciones de las hipótesis de normalidad y homocedasticidad, siempre que la premisa de independencia de datos se cumpla (Zar, 1984; Milliken & Johnson, 1984). Estos autores recomiendan el empleo de test no paramétricos solamente si se producen fuertes desviaciones de la homogeneidad de varianzas.

Cuando el test ANOVA arrojó diferencias estadísticamente significativas entre medias, se utilizó el test de comparaciones múltiples de las mínimas diferencias significativas (LSD) para agrupar dichas medias en grupos de igualdad.

La comparación entre las r_m se realizó siguiendo el criterio de solapamiento de los intervalos de confianza (al 95%). Así, si dichos intervalos se solapan se considera que no existen diferencias estadísticamente significativas, y viceversa.

3. Resultados

3.1. Efecto sobre la mortalidad

Tras 24 h de exposición, la azadiractina, el spinetoram y el clorpirifos fueron los únicos insecticidas que causaron una mortalidad de los adultos de *A. nemoralis* significativamente mayor que la ocurrida en el control negativo (F = 66,6; df = 6, 34; P < 0,0001) (Tabla 10 y Figura 27).

Tabla 10. Mortalidad media (±es) producida por los productos ensayados sobre *Anthocoris nemoralis* tras 24, 48 y 72 horas de exposición sobre residuo fresco en placa de vidrio, mortalidad corregid y categoría según la clasificación OILB. significativas (α=0,05) (ANOVA y LSD). (Insecticidas: 24 horas: F = 66,6; df = 6, 34; P < 0,0001; 72 horas: F = 16,14; df = 6, 34; P < 0,0001) (Fungicidas: 24 horas: F = 156,32; df = 5, 29; P < 0,0001; 72 horas: F = 42,40; df = 5, 29; P < 0,0001).

	Mortalidad media (± es)	Mortalidad media (± es)	Mortalidad media (± es)	Mortalidad corregida (± es)	Categoría OILB
	24 horas	48 horas	72 horas		
Insecticidas					
Control insecticidas	9,33 ± 4,52a	26,67 ± 5,96	38,67 ± 6,80a	-	-
Metoxifenocida	21,33 ± 4,42ab	38,67 ± 6,80	53,33 ± 8,43ab	23,91 ± 13,75	1
Azadiractina	22,67 ± 4,52b	64,00 ± 3,40	78,67 ± 5,33c	65,22 ± 8,70	2
Diflubenzuron	13,33 ± 2,11ab	34,67 ± 9,98	61,33 ± 8,27b	36,96 ± 13,49	2
Spirotetramat	10,67 ± 4,52ab	44,00 ± 3,40	66,67 ± 4,22bc	45,65 ± 6,87	2
Spinetoram	60,00 ± 5,96c	100,00	100d	100,00	4
Clorpirifos	100d	100,00	100d	100,00	4
Fungicidas					
Control fungicidas	4,00 ± 1,63a	8,00 ± 3,27	13,33 ± 3,65a	-	-
Trifloxistrobin	25,33 ± 6,46b	30,67 ± 6,53	30,67 ± 6,53b	20,00 ± 7,54	1
Tebuconazol	8,00 ± 1,33a	12,00 ± 2,49	21,33 ± 5,73ab	9,23 ± 6,62	1
Captan	4,00 ± 1,63a	10,67 ± 4,00	22,67 ± 6,18ab	10,77 ± 7,13	1
Mancozeb	5,33 ± 2,49a	17,33 ± 3,40	20,00 ± 4,71ab	7,69 ± 5,44	1
Imidacloprid	100c	100,00	100c	100,00	4

La mortalidad acumulada tras 72 horas de exposición se incrementó considerablemente en todos los casos respecto a la recogida a las 24 h (Tabla 10 y Figura 27), llegando a alcanzar el 38,7% en el control negativo. Para todos los insecticidas, excepto el metoxifenocida (que produjo una mortalidad del 53,3%), se encontraron mortalidades medias significativamente mayores que en el control negativo (F = 16,14; df = 6, 34; P < 0,0001). El spinetoram, a las 48 horas, llegó a causar una mortalidad del 100%.

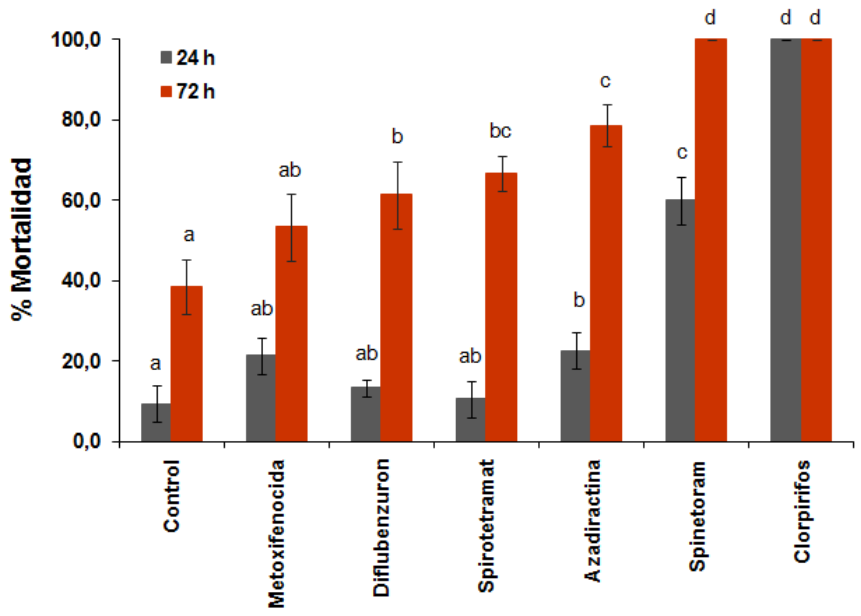


Figura 27. Mortalidad media (± error estándar) producida por los insecticidas ensayados, a las 24 y 72 horas de exposición de los adultos de *Anthocoris nemoralis*. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (α=0,05) (ANOVA y LSD). (24 horas: F = 66,6; df = 6, 34; P < 0,0001; 72 horas: F = 16,14; df = 6, 34; P < 0,0001)

Tras 24 h de exposición, el trifloxistrobin fue el único fungicida que causó una mortalidad media significativamente mayor que la obtenida en el control negativo sobre los adultos de *A. nemoralis* (F = 156,32; df = 5, 29; P < 0,0001) (Tabla 10 y Figura 28). Para este periodo, la mortalidad del control negativo fue del 4,0%, frente al 25,3% del trifloxistrobín. El insecticida imidacloprid, utilizado como control positivo, presentó un 100% de mortalidad a las 24 h de exposición.

La mortalidad acumulada tras 72 horas de exposición se incrementó ligeramente en todos los casos, llegando a alcanzar el 13,3% en el control negativo. El único fungicida que presentó una mortalidad media significativamente mayor que el control negativo, tras 72 h de exposición, continuó siendo el trifloxistrobin, con un 30,7% (F = 42,40; df = 5, 29; P < 0,0001). El resto de fungicidas presentaron una mortalidad media bastante baja y significativamente igual a la observada en el control negativo (Tabla 10 y Figura 28).

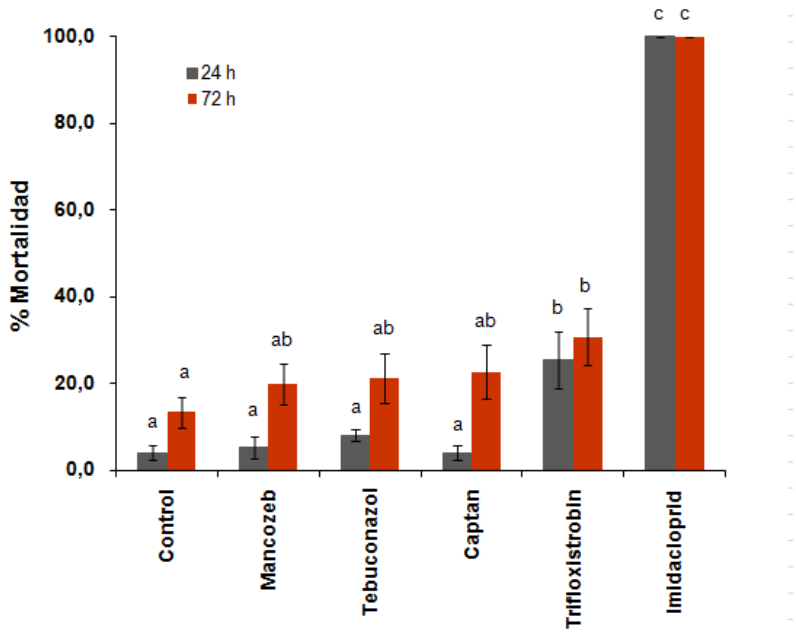


Figura 28. Mortalidad media (± error estándar) producida por los fungicidas ensayados, a las 24 y 72 horas de exposición de los adultos de *Anthocoris nemoralis*. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (α=0,05) (ANOVA y LSD). (24 horas: F = 156,32; df = 5, 29; P < 0,0001; 72 horas: F = 42,40; df = 5, 29; P < 0,0001)

La mortalidad corregida según la fórmula de Schneider-Orelli a las 72 h de exposición y la clasificación toxicológica de cada producto según la OILB, se muestran en la Tabla 10 y Figura 29. En el caso de los insecticidas clorpirifos, imidacloprid (ambos controles positivos) y spinetoram, la mortalidad corregida fue del 100%, siendo así catalogados como tóxicos (categoría 4). Los insecticidas diflubenzurón, spirotetramat y azadiractina, resultaron ligeramente tóxicos (categoría 2). El resto de compuestos evaluados se catalogaron como inocuos (categoría 1), con unos valores de la mortalidad corregida inferiores al 30%.

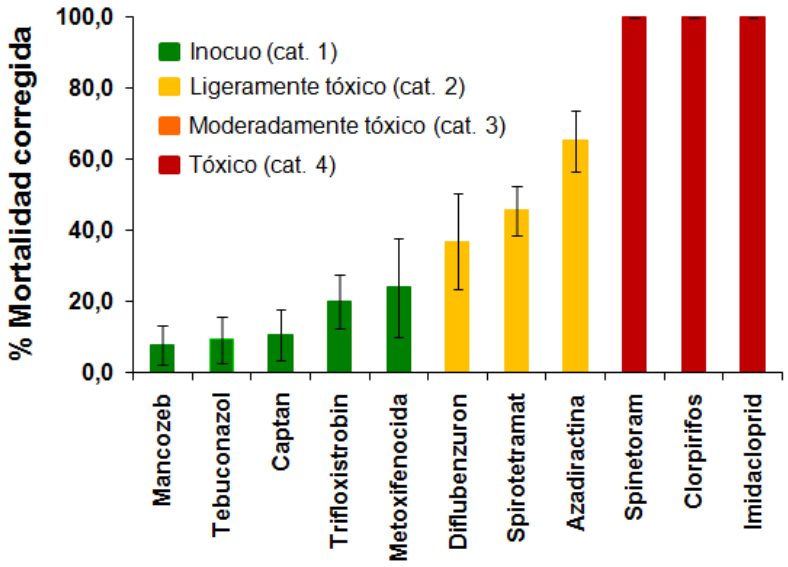


Figura 29. Mortalidad corregida (media ± error estándar) producida por los insecticidas y fungicidas ensayados, a las 72 horas de exposición de los adultos de *Anthocoris nemoralis*.

3.2. Efectos subletales

La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos para los parámetros biológicos de los adultos supervivientes en cada tratamiento, así como la supervivencia y la duración del desarrollo de su progenie. Entre los insecticidas, solo el spirotetramat provocó una reducción estadísticamente significativa de la fecundidad con respecto al control (30,8 y 97,7 huevos/hembra, respectivamente) (F = 2,61; df = 4, 68; P = 0,0437).

La longevidad media de las hembras varió entre 21,6 y 14,0 días, para el control y el spirotetramat, respectivamente. Aunque el test ANOVA no arrojó diferencias estadísticamente significativas en relación con este parámetro (F = 1,15; df = 4, 68; P = 0,3400), sí lo hizo el test LSD para el caso del spirotetramat con respecto al control.

La duración del desarrollo de la descendencia osciló entre los 14,2 días, en el caso del control, y los 14,8 días, en el de la azadiractina. A pesar de tratarse de una variación pequeña (de 0,6 días, es decir, unas 14,5 horas) existieron diferencias significativas entre las duraciones medias en

los tratamientos y el control, excepto en el caso del metoxifenocida, para el que el tiempo medio de desarrollo de la descendencia fue significativamente igual al del control (F = 4,90; df = 4, 227; P = 0,0008).

En cuanto a los resultados obtenidos para el caso de los fungicidas (Tabla 12), puede observarse cómo solo el mancozeb, el captan y el trifloxistrobín provocaron una reducción significativa de la fecundidad media de las hembras con respecto al control (F = 9,34; df = 4, 74; P < 0,0001). Especialmente reducida fue la fecundidad de las hembras tratadas con trifloxistrobin, cuya media fue significativamente menor a las obtenidas en el caso del control y el del resto de fungicidas evaluados.

La longevidad media de las hembras expuestas a fungicidas osciló entre 12,7 días en, el caso del trifloxistrobin, y 27,9 días, en el del control. Este compuesto presentó diferencias estadísticamente significativas con el resto de fungicidas evaluados, así como con el control (F = 4,60; df = 4, 74; P = 0,0024).

El tiempo de desarrollo de la descendencia varió entre 14,8 y 15,6 días. Esta variación es de 0,8 días, menor que el tiempo transcurrido entre dos observaciones consecutivas. Los fungicidas que presentaron diferencias significativas para este parámetro con respecto al control fueron el tebuconazol y el captan (F = 6,13; df = 4, 227; P = 0,0001).

En la Tabla 13 se muestran los valores calculados para los parámetros poblacionales obtenidos a partir de los adultos de *A. nemoralis* supervivientes tras 72 horas de exposición al residuo fresco del control negativo de los insecticidas ensayados. Los valores de la r_m oscilaron entre 0,1439, en el caso del control, y 0,1017, en el caso del spirotetramat. Los únicos compuestos que provocaron una reducción significativa de este parámetro, con respecto al control negativo, fueron la azadiractina y el spirotetramat.

La duración media de una generación (T) osciló entre unos 25 y 28 días, y el tiempo de duplicación de la población (TDP), entre 5 y 7 días, aproximadamente.

En la Tabla 13 se muestran datos equivalentes a los anteriores, pero para el caso de los tratamientos con fungicidas. En este caso, los valores de la r_m oscilaron entre 0,1453 y 0,0663, para el control negativo y trifloxistrobin, respectivamente. Se obtuvieron reducciones significativas de este parámetro con respecto al control en el caso del tratamiento de los adultos con mancozeb, captan y trifloxistrobin.

El valor de T osciló entre 25 y 28 días, aproximadamente. En cuanto al TDP, resultó ser de más de 10 días para el caso del trifloxistrobín, mientras que para el control negativo y el resto de fungicidas osciló entre 5 y 6 días.

En la Figura 30 se muestran representados gráficamente los valores medios de la r_m y sus intervalos de confianza obtenidos para los adultos de *A. nemoralis* supervivientes a los tratamientos.

Tabla 11. Parámetros biológicos de las hembras adultas supervivientes de *Anthocoris nemoralis* y mortalidad y tiempo de desarrollo de su descendencia, tras un periodo de exposición de 72 horas por contacto residual a insecticidas sobre sustrato inerte.

PRODUCTOS	PARENTALES			DESCENDENCIA	
	Fecundidad media	Fertilidad (%)	Longevidad hembras	Mortalidad total (%)	Tiempo de desarrollo total
Control Insecticidas	97,67 ± 14,60 a	93,33	21,60 ± 1,65 a	15,25	14,24 ± 0,11 a
Metoxifenocida	83,27 ± 19,23 a	80,00	18,40 ± 2,61 a	35,71	14,33 ± 0,08 ab
Spirotetramat	30,85 ± 12,12 b	53,85	14,00 ± 2,88 b	14,00	14,67 ± 0,10 bc
Azadiractina	56,00 ± 18,89 ab	81,82	18,27 ± 3,23 a	23,81	14,77 ± 0,13 c
Diflubenzurón	58,93 ± 14,57 ab	80,00	18,40 ± 2,35 a	15,00	14,76 ± 0,13 c
Spinetoram	-	-	-	-	-
Clorpirifos	-	-	-	-	-

Dentro de la misma columna, medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (P=0,05; ANOVA y LSD). (Fecundidad: F = 2,61; df = 4, 68; P = 0,0437), (Longevidad: F = 1,15; df = 4, 68; P = 0,3400), (Tiempo de desarrollo: F = 4,90; df = 4, 227; P = 0,0008).

Tabla 12. Parámetros biológicos de las hembras adultas supervivientes de *Anthocoris nemoralis* y mortalidad y tiempo de desarrollo de su descendencia, tras un periodo de exposición de 72 horas por contacto residual a fungicidas sobre sustrato inerte.

PRODUCTOS	PARENTALES			DESCENDENCIA	
	Fecundidad media	Fertilidad (%)	Longevidad hembras	Mortalidad total (%)	Tiempo de desarrollo total
Control Fungicidas	112,33 ± 13,77 a	100,00	27,93 ± 2,74 a	20,00	14,83 ± 0,12 a
Trifloxistrobin	13,47 ± 7,82 c	40,00	12,73 ± 2,43 b	21,43	14,77 ± 0,14 a
Tebuconazol	80,60 ± 12,06 ab	100,00	23,87 ± 2,77 a	30,00	15,24 ± 0,16 bc
Mancozeb	75,67 ± 12,09 b	100,00	23,13 ± 2,80 a	27,12	15,02 ± 0,15 ab
Captan	65,00 ± 12,15 b	86,67	21,40 ± 2,32 a	12,96	15,57 ± 0,10 c
Imidacloprid	-	-	-	-	-

Dentro de la misma columna, medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (P=0,05; ANOVA y LSD). (Fecundidad: $F = 9,34$; $df = 4, 74$; $P < 0,0001$), (Longevidad: $F = 4,60$; $df = 4, 74$; $P = 0,0024$), (Tiempo de desarrollo: $F = 6,13$; $df = 4, 227$; $P = 0,0001$).

Tabla 13. Parámetros poblacionales de *A. nemoralis* obtenidos a partir de adultos expuestos durante 72 h a diferentes productos insecticidas y fungicidas. Letras iguales en la misma fila no son significativamente diferentes (IC 95%)

PARÁMETROS	PRODUCTOS						
	Control	Metoxifenocida	Azadiractina	Diflubenzuron	Spirotetramat	Spinetoram	Clorpirifos
Supervivencia Pre-reproductora	0,8475	0,6428	0,7619	0,8500	0,8600	-	-
r_m ± ES	0,1439 ± 0,0060 a	0,1229 ± 0,0096 ab	0,1096 ± 0,0091 b	0,1219 ± 0,0050 ab	0,1017 ± 0,0135 b	-	-
(IC 95%)	0,1311 - 0,1568	0,1022 - 0,1436	0,0894 - 0,1298	0,1111 - 0,1327	0,0722 - 0,1311	-	-
λ	1,1548	1,1308	1,1158	1,1297	1,1070	-	-
R_0	41,3863	26,7619	21,3332	25,0467	13,2639	-	-
T	25,8646	26,7408	27,9247	26,4190	25,4283	-	-
TDP	4,8155	5,6390	6,3249	5,6857	6,8183	-	-

PARÁMETROS	PRODUCTOS					
	Control	Mancozeb	Tebuconazol	Captan	Trifloxistrobin	Imidacloprid
Supervivencia Pre-reproductora	0,8000	0,7288	0,7000	0,8703	0,7857	-
r_m ± ES	0,1453 ± 0,0025 a	0,1189 ± 0,0044 bc	0,1352 ± 0,0031 ac	0,1260 ± 0,0034 c	0,0663 ± 0,0052 d	-
(IC 95%)	0,1399 - 0,1507	0,1095 - 0,1283	0,1286 - 0,1419	0,1188 - 0,1332	0,0551 - 0,0775	-
λ	1,1564	1,1262	1,1448	1,1343	1,0685	-
R_0	44,9333	27,5729	28,2100	28,2848	5,2904	-
T	26,1830	27,9007	24,6926	26,5201	25,1379	-
TDP	4,7695	5,8306	5,1249	5,4999	10,4594	-

Dentro de la misma fila, medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (criterio del solapamiento de los límites fiduciales de los intervalos de confianza de las r_m).* IC: Intervalo de confianza para la r_m al 95%

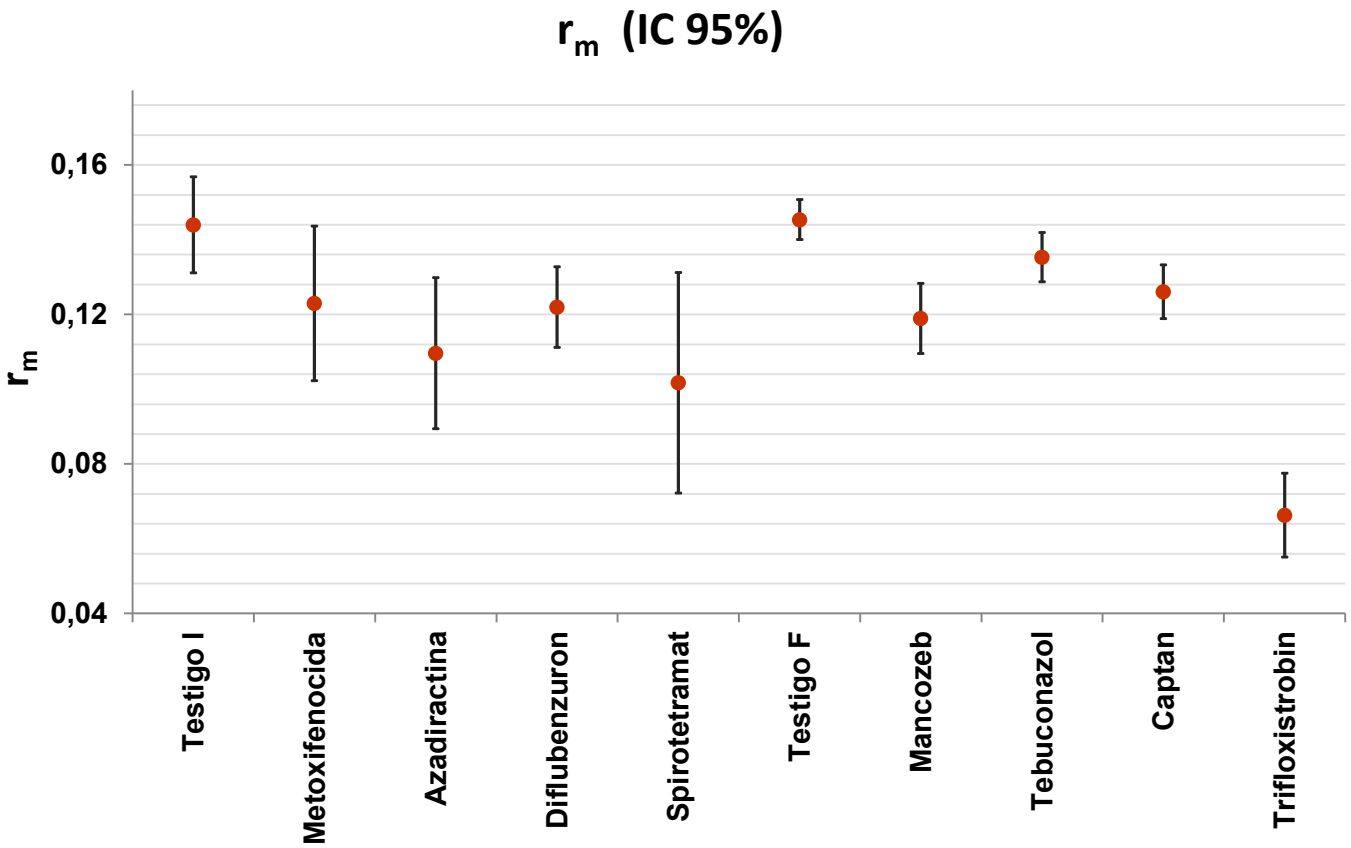


Figura 30. Representación gráfica de los valores obtenidos de la r_m y sus intervalos de confianza.

4. Discusión

Los insecticidas clorpirifos e imidacloprid, utilizados como controles positivos, provocaron una mortalidad en los adultos de *A. nemoralis* del 100% a las 24 horas de exposición, resultando ser de categoría 4, según la clasificación de la OILB. Este resultado manifiesta un gran efecto de choque de estos productos sobre el depredador en las condiciones del ensayo, lo que está en concordancia con la toxicidad que tienen estos productos sobre varios grupos de insectos, entre ellos, diversos enemigos naturales (Goulson 2013; Blacquière et al. 2012; Vogt & Brown 2006; Boller *et al.* 1988)

Diferentes autores han evaluado los efectos del spinetoram sobre depredadores taxonómicamente próximos a *A. nemoralis*, observando que provoca niveles más o menos elevados de mortalidad, aunque no llega a ser tan tóxico como lo observado en el presente trabajo (categoría 4). Así, Amarasekare & Shearer (2013) evaluaron la toxicidad del compuesto sobre adultos del mírido *Daraeocoris brevis* (Hemiptera: Miridae), obteniendo una mortalidad del 3,3 % tras 24 horas de exposición, y del 46,7% tras 10 días de exposición, tanto a una concentración de 13,1 mg/l como de 131,1 mg/l de ingrediente activo. Por su parte, Broughton *et al.* (2014), encontraron que el spinetoram resultaba ser ligeramente tóxico (categoría 2) sobre *Orius armatus* (Gross) (Heteroptera: Anthocoridae), y que provoca una reducción significativa en el potencial reproductivo de las hembras tratadas. Srivastava *et al*. (2008) realizaron ensayos de campo para evaluar los efectos del spinetoram sobre *Orius insidiosus* en cultivo de pimiento aplicando 61 g/ha de ingrediente activo; en estas condiciones, determinaron que, a pesar de todo, la población del depredador fue suficiente para evitar el aumento de las poblaciones de trips.

Civolani *et al*.(2007) llevaron a cabo ensayos de campo en plantaciones de peral y manzano con presencia de ninfas y adultos *A. nemoralis* aplicando 144 mg/l de spinosad sin que observaran efecto agudo significativo a las 48 horas del tratamiento. También Eelen *et al*. (2006) encontraron resultados similares con el spinosad en ensayos de campo, de

modo que lo clasificaron como categoría 1, sobre adultos, y categoría 2, sobre ninfas. Finalmente, Biondi *et al*. (2012), en una revisión sobre el efecto de los spinosines sobre la fauna auxiliar, señalaron que los efectos adversos del spinetoram aún no habían sido suficientemente investigados.

Los resultados obtenidos en relación con la mortalidad causada por la azadiractina en el presente trabajo no concuerdan con los obtenidos por Schaub *et al*. (2002), ya que estos autores obtuvieron una mortalidad del 100% en condiciones de laboratorio, aunque hay que señalar que el ensayo lo llevaron a cabo sobre ninfas de tercer estadio de *A. nemoralis* y a una concentración del 0,3%, el doble de la utilizada en este trabajo. Asimismo, cuando hicieron el ensayo en condiciones de laboratorio extendido, la mortalidad se redujo en un 50%. Por otro lado, la azadiractina provocó una reducción importante de la fecundidad de las hembras superviviente expuestas durante 72 h al compuesto, disminuyendo el número medio de huevos puestos por hembra en torno a un 60% respecto al control negativo, aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas; esto es debido, seguramente, a la elevada variabilidad intrínseca de este parámetro, que provoca una importante variabilidad dentro de cada tratamiento que, a su vez, oculta diferencias significativas entre ellos. Tampoco se observó una reducción significativa de la longevidad de las hembras. Sí que hubo diferencias significativas en el tiempo de desarrollo de la descendencia, aunque, tal y como se señala en el capítulo I, esta diferencia se puede despreciar debido a la muy baja variabilidad intrínseca de este parámetro. De hecho, en valor absoluto, la diferencia es mucho menor que el tiempo transcurrido entre dos observaciones consecutivas.

El parámetro que mejor caracteriza el efecto de un compuesto sobre la evolución de una población bajo unas determinadas condiciones, es la tasa intrínseca de crecimiento (r_m), ya que engloba todas las posibles acciones del mismo sobre los adultos tratados y sobre su descendencia hasta que alcanza de nuevo el estado adulto. En este sentido, se obtuvo un resultado para la r_m de la población superviviente al tratamiento con azadiractina significativamente menor que para el control negativo. De todos

modos, observando los parámetros poblacionales, es probable que la recuperación de la población sea buena tras un tratamiento con este producto en condiciones de campo, más aún considerando que los ensayos realizados en este trabajo fueron en fase de laboratorio, que es la situación más desfavorable de todas las que forman la metodología secuencial propuesta por la OILB.

La observación de los efectos negativos provocados por el spinetoram y la azadiractina sobre adultos de *A. nemoralis* indican, tal y como ya se ha observado en otras ocasiones, que el hecho de que un producto sea de origen natural no tiene por qué ser estrictamente selectivo, de modo que puede afectar, además de a la plaga objetivo, a otros organismos no diana, como los enemigos naturales (Biondi *et al*., 2012). La selectividad viene determinada por una multitud de factores, de modo que existe la necesidad de evaluar cada producto de forma individual para cada especie en particular. Por otro lado, es importante señalar también que, además de la evaluación de la mortalidad directa, es tan importante o más, si cabe, la evaluación de los efectos subletales para poder tener un conocimiento completo y preciso de los efectos secundarios de los productos fitosanitarios sobre los enemigos naturales (Hassan, 1985). Prueba de ello son los programas que se han desarrollado por el grupo de trabajo de la OILB "Pesticidas y Organismos Beneficiosos" con múltiples productos sobre una gran cantidad de especies de enemigos naturales, y que se pueden consultar en varias publicaciones de los Boletines de la OILB (Franz *et al*., 1980; Hassan *et al*., 1983; 1987; 1988; 1991; 1994 y Sterk *et al*., 1999; Vogt *et al*.)

El diflubenzurón, que resultó ser de categoría 2 en cuanto a su efecto sobre la mortalidad de los adultos tras 72 h de exposición, provocó una reducción de la fecundidad de las hembras, y de modo similar a lo comentado en el caso de la azadiractina, dichas diferencias quedaron ocultas en los test empleados para detectarlas, por la gran variabilidad intrínseca del parámetro. Sin embargo, la r_m no presentó diferencias significativas respecto al del control negativo. En conjunto, podría decirse

que se trata de un producto que podría ser compatible con *A. nemoralis* en condiciones de campo, tal y como algunos autores ya han señalado anteriormente (Souliotis & Moschos 2008; Solomon *et al*. 1989). Por su parte, Caroli & Pasqualini (2004) encontraron que el diflubenzurón no tenía efectos ni sobre la mortalidad directa ni sobre los parámetros reproductivos, cuando se aplicaba a ninfas neonatas de *A. nemoralis* en ensayos de laboratorio, resultando ser de categoría 1 según la clasificación de la OILB considerando ambos tipos de efectos. Por el contrario, al utilizar ninfas de tercer estadio resultó ser moderadamente tóxico (categoría 3), a causa de producir una severa reducción de la fecundidad de las hembras que llegaron a completar el desarrollo hasta el estado adulto tras la exposición al producto. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en este trabajo, ya que la aplicación del insecticida se realizó en el periodo de preoviposición, estado en el que el desarrollo embrionario puede verse afectado por el producto.

El metoxifenocida resultó ser un producto inocuo, tanto sobre la mortalidad directa como sobre los parámetros de las tablas de vida. Civolani *et al*. (2007) indicaron que este compuesto resultó también inocuo sobre *A. nemoralis* en ensayos de campo realizados en Emilia Romagna, utilizando la metodología propuesta por la OILB (Hassan, 1985). Los resultados que obtuvieron muestran una mortalidad corregida de los adultos del depredador inferior al 10%, lo que está en concordancia con los obtenidos en el presente trabajo. Asimismo, otros autores han reportado resultados similares sobre otros antocóridos, fundamentalmente del género *Orius*, tanto en ensayos de laboratorio como de campo, (Studebaker & Kring 2003; Angeli *et al*. 2005; Colomer *et al*. 2011; Amor *et al*. 2012).

El spirotetramat resultó ser ligeramente tóxico, categoría 2, según los resultados obtenidos en cuanto a la mortalidad de los adultos, pero provocó también una reducción importante de la fecundidad. A pesar de ello, como sucedió en el caso del diflubenzurón, no se observaron diferencias significativas en la r_m, respecto al control negativo. La reducción de la fecundidad puede estar relacionada con el modo de acción del producto

(inhibición de la síntesis de lípidos), a través del cual podría afectar al normal desarrollo de los oocitos. Algunos autores indican, de igual modo, una reducción en la fecundidad en otras especies de enemigos naturales, como *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) (Wanumen 2016) o *Neoseiulus fallacis* (Garman) (Acari: Phytoseiidae) (Lefebvre *et al*., 2012).

Los fungicidas mancozeb, tebuconazol y captan resultaron ser inocuos (categoría 1) según la clasificación OILB. Sin embargo, según los resultados publicados por el grupo de trabajo "Pesticidas y organismos beneficiosos" de esta Organización, el tebuconazol resulta ligeramente tóxico (categoría 2) sobre *A. nemoralis* en condiciones de laboratorio (Sterk *et al.* 1999). Los efectos observados en la bibliografía para la aplicación dcon respecto a captan y mancozeb son muy variables, dependiendo de la especie de la que se trate, resultando, por lo general, perjudiciales sobre varias especies de ácaros fitoseidos e himenópteros parasitoides, tal y como se puede comprobar en los resultados de los programas de la OILB mencionados previamente. Con respecto a los efectos subletales, ambos productos disminuyeron significativamente la fecundidad y la r_m cuando los adultos estuvieron expuestos durante 72 h. Respecto al tiempo de desarrollo de la descendencia, aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con tebuconazol y captan con respecto al control, estas se pueden considerar despreciables por los mismos motivos comentados con anterioridad para el caso de los insecticidas.

El único fungicida que presentó diferencias significativas en la mortalidad con respecto al control negativo fue el trifloxistrobin. En un estudio realizado en condiciones de laboratorio mediante aplicación tópica de este compuesto sobre larvas de segundo estadio y adultos del coccinélido micófago *Psyllobora vigintimaculata* (Say), Sutherland *et al*., (2010) también observaron que el producto provocó ciertos niveles de mortalidad tras 24 horas de exposición (un 50% aproximadamente, para el caso de los adultos, y en torno al 35%, para el de las larvas), no viéndose incrementados estos valores en gran medida tras 96 h. Además, en ensayos realizados en viñedo, la densidad poblacional de este insecto se redujo

después de las aplicaciones de los fungicidas del grupo de las estrobilurinas, azoxystrobin y trifloxistrobin, a pesar de la presencia de oídio en el cultivo, fuente de alimento de coccinélido. Del mismo modo, Pazini *et al*. (2016), señalaron que, en condiciones de laboratorio, según la metodología propuesta por la OILB, el trifloxistrobin fue catalogado como ligeramente tóxico (categoría 2) o moderadamente tóxico (categoría 3) sobre los himenópteros parasitoides *Telenomus podisi* Ashmead (Platygastridae) y *Trichogramma pretiosum* Riley (Trichogrammatidae), según diferentes condiciones de ensayo. De igual manera, señalaron la necesidad de seguir investigando con este tipo de compuestos para poder determinar los efectos secundarios reales que pueden llegar a tener en estos parasitoides, así como en otras especies de enemigos naturales.

Stavrinides & Mills (2009), realizando ensayos de semicampo para evaluar el efecto del trifloxistrobin sobre el ácaro fitoseido *Galendromus occidentalis* (Nesbitt), indicaron que este producto provocó cambios en la estructura de la población con respecto al control no tratado, reduciendo el porcentaje de inmaduros y adultos, y aumentando el porcentaje de huevos. Asimismo, señalaron que estas diferencias en la estructura de la población podrían deberse a efectos diferenciales en la mortalidad, en el tiempo de desarrollo y en la reproducción, en función de la edad a la que se sometían los individuos al compuesto. Estos mismos autores señalaron la importancia de realizar estudios sobre los efectos en los parámetros de las tablas de vida para obtener respuestas que definieran mejor estos cambios en la estructura de la población. En el presente trabajo, al analizar los resultados obtenidos sobre la fecundidad de las hembras supervivientes, se observa una drástica reducción en este parámetro por parte del trifloxistrobín. Asimismo, este compuesto fue el único fungicida que provocó una reducción significativa en la longevidad de las hembras supervivientes. Merece la pena señalar que en las revisiones diarias que se fueron realizando, se observaba que los individuos de *A. nemoralis* manifestaban espasmos musculares que les inducían a caminar desorientados. Además, la mayor parte de los individuos permanecían tumbados sobre su dorso varios días antes de morir y, al tocarlos con el pincel, reaccionaban con movimientos. Cuando se les

colocaba en su posición normal, caminaban durante un tiempo antes de volver a caer tumbados.

Un dato curioso, al observar los resultados, es que la longevidad media de las 15 hembras elegidas de entre las supervivientes al tratamiento con trifloxistrobin fue de 12,7 días, pero solamente tres de ellas tuvieron una longevidad superior a la media, y que fue de 28 días, en dos de ellas y de 35 días en la tercera.

Como puede observarse en la tabla 11, solamente un 40% de las hembras tratadas con trifloxistrobin pusieron huevos, siendo este valor incluso más bajo que para el caso del insecticida spirotetramat (54%). Otro dato destacable es que, de las dos hembras que vivieron 28 días, una fue estéril y la otra solamente puso 8 huevos. Curiosamente, la hembra que puso mayor cantidad de huevos (96) tuvo una longevidad de 11 días solamente, seguida de la hembra con mayor longevidad que puso 78 huevos. Como dato también muy importante, señalar que el trifloxistrobín provocó una importante reducción de la r_m respecto al control negativo. Esta reducción se debe, sobre todo, a la disminución de la fecundidad y de la longevidad de las hembras supervivientes.

También hay que señalar que para comprobar y contrastar los resultados que se obtuvieron con el trifloxistrobin, se llevaron a cabo una serie de ensayos posteriores con este mismo producto y con kresoxim-metil, otra estrobilurina con el mismo modo de acción. Los ensayos se realizaron sobre *A. nemoralis, Orius laevigatus, Nesidiocoris tenuis y Macrolophus calliginosus* obteniendo efectos y resultados similares a los presentados en este trabajo en las cuatro especies evaluadas (Aragón-Sánchez, comunicación personal).

En la figura 30 se representan gráficamente los valores obtenidos de la r_m, con sus intervalos de confianza, para todos los compuestos evaluados que dejaron supervivientes tras el tratamiento, así como las de los controles negativos. Dado que las r_m de los controles negativos en los ensayos con

insecticidas y con fungicidas no difirieron significativamente entre sí, se podrían establecer comparaciones entre todos los tratamientos. Así, podría decirse que el trifloxistrobin fue el compuesto más perjudicial de todos los evaluados sobre *A. nemoralis*, con efectos incluso más acusados que algunos insecticidas. No obstante, hay que recordar, una vez más, que las condiciones de ensayo en laboratorio son las más desfavorables del esquema secuencial propuesto por la OILB, de manera que al realizar ensayos de laboratorio extendido, semicampo o campo, estos efectos podrían verse mitigados en gran medida, como se comentó en el caso del spinetoram. En cualquier caso, resulta muy interesante comprobar cómo un producto fungicida puede llegar a tener importantes efectos secundarios negativos sobre enemigos naturales. Esto hace muy aconsejable la determinación de tales efectos secundarios para poder compatibilizar adecuadamente el CB, ya no solo con la lucha química a base de plaguicidas, sino también con la que incluye fungicidas e incluso otro tipo de compuestos. Solo un conocimiento completo en este sentido, permitirá una toma de decisiones adecuada en un contexto de MIP; y especialmente en cultivos con una especial problemática fitosanitaria en lo que a enfermedades fúngicas se refiere (caso del peral) para los que, en la mayoría de las ocasiones, el uso de fungicidas es muy elevado.

Capítulo III

CAPITULO III. Ensayo de Control Biológico de *Cacopsylla pyri* mediante *Anthocoris nemoralis* en condiciones de campo

1. Introducción

El peral (*Pyrus communis* L.) ocupa el segundo lugar en importancia entre los cultivos frutales de zonas templadas, después del manzano (*Malus domestica* L.) y por delante del melocotonero (*Prunus persica* L.) (Tabla 14).

Tabla 14. Superficie y producción mundial de manzano, peral, melocotón y nectarina (FAO,2014)

	Superficie (ha)	Producción (t)
Manzano	5.051.851	84.630.275
Peral	1.574.446	22.795.854
Melocotón y nectarina	1.494.837	25.798.644

Actualmente, la psila del peral puede considerarse como la plaga clave en este cultivo en todas las regiones productoras. Son varias las especies que se han citado en la bibliografía con el nombre vulgar de psila del peral, aunque la especie predominante en cultivos comerciales europeos es *Cacopsylla pyri* (Linnaeus, 1761) (Hemiptera: Psyllidae), junto con *C. pyricola* (Foerster, 1848) (Hemiptera: Psyllidae), en función de la región que se considere (Horton, 1999). En España, la especie principal asociada al cultivo es *C. pyri* (Artigues *et al*., 1996; Vilajeliu *et al.,* 1998; Sánchez *et al*., 2010).

1.1. Cacopsylla pyri (Linnaeus, 1761)

La descripción de *C. pyri*, así como los daños que produce, están ampliamente recogidos en la bibliografía. Según García de Otazo (1992), De Liñán (1998) y Sarasúa & Avilla (2008), los adultos de *C. pyri* tiene un tamaño aproximado de 3 mm de longitud y son de color pardo amarillento más o menos claro (Figura 31), siendo los adultos invernantes más oscuros. La cabeza es más ancha que larga, y presenta dos grandes ojos compuestos. Las antenas tienen los tres primeros artejos de color amarillo, los tres siguientes pardos en la extremidad y los cuatro restantes

completamente pardos. El pronoto es de color pardo oscuro con rayas amarillas. Las alas son membranosas y transparentes, con las nervaduras oscuras. La parte anterior de las patas es de color pardo y la posterior amarilla (las tibias y tarsos son amarillos, con las uñas negras). Las patas son fuertes y están adaptadas para el salto. El abdomen es negro, con los bordes posteriores de los segmentos rojos. Las piezas bucales están soldadas para formar un tubo picador succionador, recogido a nivel del tórax entre las patas del primer y segundo par en fase de reposo. Existe dimorfismo sexual, lo que permite diferenciar machos y hembras visualmente: los machos presentan en la parte final del abdomen un complejo génito-anal en forma de ganchos orientados hacia arriba, mientras que en las hembras el abdomen termina de una forma más o menos redondeada.

Figura 31. Adulto de *Cacopsylla pyri* (izquierda). Huevos próximos a la eclosión y ninfa emergiendo del huevo.

Los huevos son inicialmente blancos, pasando a una coloración amarilla y, finalmente, anaranjada, cuando van evolucionando. Cuando está próxima la eclosión se pueden apreciar dos puntos rojos que corresponden con los ojos compuestos de la futura ninfa (Figura 31). Se unen al sustrato vegetal mediante un pedicelo y miden unos 0,3 mm de largo x 0,15 mm de ancho. La puesta media por hembra varía en función de la generación. Las hembras invernantes tienen una fecundidad media de 200 huevos, mientras que en las hembras de verano es de 600 huevos.

C. pyri presenta 5 estadios ninfales. Las ninfas tienen un aspecto aplanado y un tamaño comprendido entre 0,45 mm, en su primer estadio, y 1,75 mm, en el último. Los tres primeros estadios ninfales son de color amarillo claro y las antenas constan de 3 artejos. El cuarto estadio presenta 5 artejos en las antenas, mientras que el quinto ya tiene 7. El cuarto estadio presenta una coloración más oscura y el quinto es de tonos pardos (Figura 32). A partir del tercer estadio se comienzan a percibir los esbozos alares, siendo muy claros en el último. Las ninfas son sensibles a temperaturas elevadas y baja humedad, sobre todo en los primeros estadios. La melaza que segregan al alimentarse les sirve para protegerse de estas condiciones desfavorables (Figura 32).

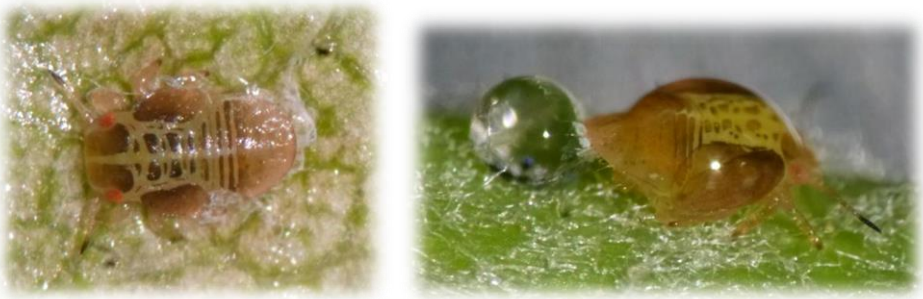


Figura 32. Ninfa de C. pyri de quinto estadio (izquierda). Ninfa segregando melaza (derecha)

El insecto pasa el invierno en estado adulto sobre la corteza de los árboles, así como en refugios naturales o vegetación de los alrededores. Puede llegar a resistir temperaturas de -15 ºC durante el invierno. En esta época su actividad es muy reducida, pero cuando las temperaturas alcanzan los 5 ºC son capaces de desplazarse para alimentarse hacia los primeros brotes del año, y cuando las temperaturas están comprendidas entre 7 y 10 ºC, las hembras ya pueden comenzar la puesta.

El desarrollo óptimo de *C. pyri* se produce a una temperatura próxima a 25 ºC y el número de generaciones anuales que experimenta se sitúa entre 4 y 7, dependiendo de las condiciones climáticas de cada región y de cada año.

Los daños que produce *C. pyri* pueden ser directos e indirectos. Los daños directos se ocasionan por las picaduras de los adultos y de las ninfas en hojas y brotes (Figura 33) para alimentarse del floema de la planta, produciendo un debilitamiento de la misma en caso de ataques fuertes. Los daños indirectos derivan de la melaza que excretan las ninfas. Esta melaza sirve de sustrato para el desarrollo de hongos saprófitos que provocan la aparición de la llamada negrilla o fumagina, que tiñe de negro las partes afectadas (Figura 33). En caso de ataques fuertes, se puede producir una merma de la capacidad fotosintética del árbol, descenso en la inducción floral e incluso el aborto de yemas en el año siguiente. Sin embargo, el daño más importante es la depreciación comercial del fruto cuando está afectado por la negrilla, sobre todo en variedades de piel lisa o que no presentan russeting. Es de señalar que esta depreciación es simplemente estética, sin afectar a la calidad organoléptica del fruto, sobre todo en variedades con russeting, ya que las partes afectadas pasan más desapercibidas.

Figura 33. Ninfas de estadios avanzados alimentándose en un brote de peral (izquierda). Brote de peral con presencia de negrilla o fumagina (derecha).

1.2. El problema de las resistencias y la disminución de la presencia de los enemigos naturales

C. pyri estuvo considerada en Europa como una plaga secundaria en el cultivo del peral hasta 1960, aproximadamente, pero en los años 70 comenzaron a presentarse graves dificultades para controlar la plaga en Italia, España y Francia por diversos motivos. Entre ellos, podría citarse el aumento de la superficie destinada al cultivo del peral con variedades vigorosas, así como el empleo de técnicas culturales que inducen un mayor vigor. Es preciso indicar que el exceso de vigor está directamente relacionado con un aumento de la densidad de fitófagos, en general, y de la psila del peral, en particular (Daugherty *et al*., 2007). Por ello, la elección de patrones menos vigorizantes y adecuados a las características del terreno y un correcto manejo de la fertilización nitrogenada son aspectos fundamentales para mantener el nivel de vegetación dentro de parámetros deseables y evitar los efectos negativos asociados a un exceso de vigor.

Sin embargo, son las consecuencias derivadas de un mal uso y abuso de insecticidas, muchas veces poco selectivos, los que han provocado que la psila se convierta en una plaga difícil de controlar (Sarasúa & Avilla, 2008). En torno a los años 50, tuvo lugar la introducción de los insecticidas organoclorados y organofosforados, que presentan un amplio espectro de acción, es decir, tienen efecto sobre muchos de los artrópodos presentes en el agroecosistema. En las décadas siguientes, el desarrollo de nuevas moléculas con actividad insecticida estuvo encaminado hacia la obtención de productos igualmente poco selectivos, como piretroides y carbamatos. El empleo de este tipo de compuestos provocó, con el paso de los años, una drástica disminución en la presencia de enemigos naturales de las plagas (depredadores y parasitoides) en los agroecosistemas, originando un gran desajuste en su equilibrio y un aumento de los problemas generados por efecto de las plagas. Ante esta situación, el agricultor suele aumentar el número de aplicaciones, lo que favorece, además, la aparición de resistencias en los organismos plaga, agravando más aún el problema.

Este es el caso de las psilas del peral, estando bien documentadas las resistencias que ha generado *C. pyri* frente a varios ingredientes activos con actividad insecticida, especialmente piretroides, organofosforados y algunos inhibidores de la síntesis de quitina, como el teflubenzurón. El ingrediente activo monocrofós representa el caso más conocido, ya que la selección inducida por este compuesto alrededor de finales de 1980 en algunas poblaciones de *C. pyri* cerca de Toulouse (Francia), generó una resistencia 140 veces mayor que en la población susceptible al cabo de 30 generaciones (Civolani, 2012).

Por estos motivos, en la actualidad, es habitual encontrar explotaciones que deben realizar un tratamiento insecticida cada 15 días, aproximadamente, sin que, a pesar de ello, la plaga se mantenga en bajos niveles poblacionales. Debido a los límites máximos de residuos que marca la legislación, así como a los plazos de seguridad asociados al uso de este tipo de productos, no se pueden realizar tratamientos insecticidas cercanos a la época de recolección. Por este motivo, es habitual encontrar los niveles poblacionales más altos al final del ciclo vegetativo, hacia finales de septiembre y noviembre, y más aún en condiciones climáticas cálidas, como las que se dan actualmente en esta época del año, de manera que el nivel de población para el ciclo siguiente suele ser más elevado.

1.3. Los enemigos naturales de la psila

El hecho de que la psila se considerase una plaga secundaria antes de la generalización del uso de insecticidas de síntesis, está directamente relacionado con el control que ejercían los enemigos naturales sobre sus poblaciones, de modo que, cuando estos se vieron afectados por el uso de estos productos, la psila se convirtió en el problema que representa en la actualidad (Solomon *et al.,* 2000). Así pues, la utilización de compuestos respetuosos con estos enemigos naturales, junto con otras técnicas que se pueden utilizar para aumentar sus poblaciones en el cultivo, podría constituir la clave para revertir esta situación hasta el punto inicial, donde la psila del peral no constituía un problema.

En general, la mayoría de autores señalan que *C. pyri* tiene una gran variedad de enemigos naturales, depredadores y parasitoides, de manera que cuando no se realizan tratamientos insecticidas, o éstos son respetuosos con los organismos no objetivo, se pueden llegar a mantener las poblaciones de psila en niveles bajos. Los depredadores citados de mayor importancia pertenecen al orden Hemiptera, fundamentalmente a las familias Anthocoridae y Miridae. Los míridos a los que se atribuye una mayor capacidad de control pertenecen al género *Pilophorus*, aunque también se citan otros géneros como *Campyloma*. Sin embargo, el depredador más importante de la psila del peral, en la mayoría de regiones, es el antocórido *A. nemoralis*. Así mismo, también se citan varias especies del género *Orius* como depredadores de psila (Madsen, 1964; Santas *et al*.,1987; Solomon *et al*. 1989; Artigues *et al*., 1996; Vilajeliu *et al*., 1998; Horton, 1999; Solomon *et al*., 2000; Civolani & Pasqualini, 2003; Erler, 2004; Shaltiel & Coll, 2004; Souliotis & Moschos, 2008; Sánchez *et al*., 2010; Civolani, 2012).

Un aspecto importante a tener en cuenta es la importancia de la colonización temprana del cultivo por parte de enemigos naturales de la psila, de modo que puedan mantener las poblaciones de esta plaga en niveles tolerables. Algunos estudios llevados a cabo en este sentido indican que el tipo de vegetación que rodea al cultivo puede influir en la colonización y también en el mantenimiento de enemigos naturales. Asimismo, indican que el establecimiento de cubiertas vegetales en el cultivo puede ser un elemento de atracción y mantenimiento de estos organismos antagonistas, sobre todo si la comunidad vegetal produce flores (Emami, 2017; Shaltiel & Coll, 2004). En este sentido, las estrategias de CB por conservación adquieren gran importancia para mantener un equilibrio en la comunidad de artrópodos del agroecosistema.

1.4. Estrategia de CB de tipo inundativo con *Anthocoris nemoralis*

Como ya se ha indicado, *A. nemoralis* está considerado como el depredador más importante de la psila del peral en la mayor parte de las regiones productoras. Este depredador se traslada al cultivo al inicio de la

primavera, desde sus refugios de invierno, estación que pasa en estado adulto, aunque una parte permanece en el propio cultivo. Además, muestra preferencia por desplazarse e instalarse en cultivos de peral frente a manzano (Sigsgaard, 2010). *A. nemoralis* presenta el comportamiento típico de un depredador de limpieza, capaz de responder a fuertes aumentos poblacionales de la plaga y reducir en poco tiempo sus poblaciones. Por otro lado, parte de la población abandona la plantación cuando la densidad de la presa es baja (Avilla *et al*., 2002).

En la mayoría de ocasiones, este control natural no es suficiente para mantener la población de psila bajo niveles tolerables, debido a la baja densidad de individuos que colonizan el cultivo o por hacerlo demasiado tarde *(Sigsgaard et al*., 2006). El conocimiento desarrollado para poder criar en laboratorio este enemigo natural, y el posterior desarrollo de la cría industrial en biofábricas, ha hecho posible que se pueda liberar en el cultivo en el momento y en la cantidad adecuados para lograr controlar las poblaciones plaga.

En la bibliografía existen diferentes estudios que evalúan la forma de llevar a cabo liberaciones de *A. nemoralis*, así como resultados obtenidos en distintos ensayos. En este sentido, liberaciones realizadas en Avignon (Francia) en estado de huevo, a una densidad de 100 a 200 huevos por árbol (sobre unos 200 árboles en 0,3 ha), obtuvieron buenos resultados de control, aunque presentó algunos inconvenientes de manejo. Entre ellos, los autores citan el almacenamiento y conservación de los huevos cuando la superficie a proteger es grande, así como la dificultad para su manipulación en el proceso de obtención y distribución en campo, ya que se necesita un sustrato vegetal como soporte para los huevos. Asimismo, indican una serie de ventajas, como puede ser la menor capacidad de dispersión inicial del depredador, que facilita la implantación a nivel de parcela, así como el menor coste en el sistema productivo del depredador (Fauvel *et al*., 1994; Rieux *et al*., 1994).

Unruh & Higbee (1994), llevaron a cabo liberaciones de ninfas de segundo o tercer estadio en el estado de Washington (Estados Unidos) que arrojaron resultados efectivos. La densidad de suelta fue de 300 ninfas por árbol (en 4 bloques de 9 árboles, con un marco de plantación de 5x5 m), liberadas en dos sueltas, de 200 y 100 ninfas por árbol, separadas 21 días. Bajo estas condiciones, la reducción en las ninfas de psila a los 10 días de las liberaciones fue del 50%, tras la primera, y del 85%, tras la segunda. De todos modos, se podría indicar que esta cantidad de depredador posiblemente resulte económicamente inviable en términos comerciales.

En Dinamarca, liberaciones de ninfas de segundo y cuarto estadio, a una densidad de 10 y de 30 ninfas por árbol (distribuidos en densidades de plantación comprendidas entre 1100 y 2300 árboles/ha, con una altura media entre 2,4 y 3,1 m por árbol), mostraron reducciones en el número de ninfas de psila comprendidas entre un 30 y un 50%. Hay que indicar que la capacidad depredadora de *A. nemoralis* podría haberse visto afectada debido a las condiciones de temperatura de esta zona (Sigsgaard *et al*., 2006).

En relación a liberaciones en estado adulto, los estudios preliminares realizados en Italia con densidades de 500 y 1000 adultos/ha no mostraron diferencias significativas con respecto al control (Beninato & la Morella, 2000). Sin embargo, en el Sur de Francia, densidades elevadas (17000-24000 adultos/ha) proporcionaron un buen control de la psila, independientemente del nivel de población inicial de plaga. Por otro lado, Faivre-D'Àrcier *et al*. (2001), basándose en resultados obtenidos con liberaciones hechas en primavera o inicios de verano, a densidades comprendidas entre 1300 y 9000 adultos/ha, consideraron que 5500 adultos/ha podría ser una cantidad efectiva si se daban las condiciones adecuadas, tanto de temperatura como de disponibilidad de presa, pero siempre que la población inicial de plaga no fuera demasiado elevada.

Generalmente, las empresas comercializadoras de *A. nemoralis* recomiendan hacer la liberación al inicio del ciclo de cultivo, con el fin de

asegurar un buen asentamiento el depredador en campo, fraccionada en dos o tres sueltas en semanas consecutivas, alcanzando un total de unos 1500 a 2000 individuos/ha, en función de las condiciones particulares de cada parcela. La liberación se lleva a cabo en unos pequeños recipientes de cartón, en los que se reparte el contenido del envase en el que se comercializa el depredador. Normalmente, se recomienda repartir 500 individuos entre 8 y 10 puntos distribuidos de forma homogénea por la parcela, pero no cerca de los bordes, para evitar la dispersión de *A. nemoralis* fuera de la misma.

1.5. Métodos de seguimiento de la psila del peral y *Anthocoris nemoralis*

En la bibliografía se citan varios métodos para el seguimiento de las poblaciones de insectos (Horton, 1999), siendo el golpeo de ramas o *frappage* un método habitualmente empleado. Este método consiste en golpear varias veces una rama de un árbol con una barra de unos 40-45 cm recubierta con algún material blando para evitar daños en las ramas y, de este modo, recoger los individuos en algún tipo de dispositivo que se coloca bajo la rama golpeada. El proceso se realiza en varios árboles de la zona a muestrear, elegidos en función del diseño experimental. Hay autores que golpean varias ramas en el mismo árbol, mientras que otros solamente golpean una rama por árbol, ya que consideran que las vibraciones producidas con el primer golpeo pueden interferir en la cantidad de insectos recogidos en la siguiente rama (Erler, 2004). Este método se utiliza generalmente para obtener datos de la cantidad de adultos de psila o adultos y ninfas de *A. nemorlalis*.

Otro método empleado habitualmente consiste en recoger muestras de corimbos, brotes u hojas, en función de la época de muestreo, para su posterior procesado en laboratorio bajo un microscopio estereoscópico. Este método está destinado, generalmente, a obtener datos de la cantidad de huevos y ninfas de la población de psila (Horton, 1999), así como de otros artrópodos de interés asociados al cultivo. El tamaño muestral es variable,

según la bibliografía, recomendando entre 10 y 50 o más unidades de muestreo, dependiendo del nivel de precisión que se quiera obtener. Por ejemplo, en la zona de Washington y Oregón, se recomienda tomar unos 25 brotes para una parcela comprendida entre 4 y 8 ha (Burts & Retan, 1973; Beers *et al*., 1993). Un mayor tamaño de la muestra proporciona un menor error en los resultados inferidos, aunque hay que tener en cuenta el tiempo de procesado en el laboratorio y el nivel de error que se puede asumir para conseguir un equilibrio entre estos dos factores. En este sentido, Vilajeliu *et al*. (2004) calcularon mediante la ecuación propuesta por Karandinos (1976), que el tamaño necesario de la muestra para un nivel de precisión "d" de 0,5 (error experimental ± 25%) debería ser de 90 brotes para niveles medios de 1 ninfa por brote, y 50 brotes para niveles medios de 3 ninfas por brote. Sin embargo, para niveles medios de 1 ninfa por brote, con un error experimental de ± 15%, es necesario tomar 300 brotes por muestra.

Para hacer el seguimiento de la psila del peral se eligió el método de recogida de corimbos y brotes. No se han encontrado citas en la bibliografía en las que el seguimiento de *A. nemoralis* se haga representando la dinámica poblacional a partir del número medio de huevos. Por ello, en este trabajo se planteó hacer el seguimiento de la población del depredador a partir de los huevos que se encontraban en las muestras vegetales recogidas en campo.

2. Materiales y métodos

El ensayo de campo se llevó a cabo durante el año 2015, en parcelas situadas en la localidad de Rincón de Soto (La Rioja), y pertenecientes a la Denominación de Origen Protegida (D.O.P.) Peras de Rincón de Soto. Para ello, se eligieron dos parcelas representativas del cultivo del peral de la zona. En una de ellas, utilizada como control, se hacía un manejo convencional (MC) para el control de psila, mediante la aplicación de insecticidas. En la otra, el control de psila se llevó a cabo mediante la liberación de *A. nemoralis* (MAn), siendo 2015 el tercer año consecutivo que aplicaba esta estrategia de control.

2.1. Descripción de las parcelas de ensayo

El sistema de formación es en vaso (Figura 34). La densidad de plantación es similar en ambos casos, con unos 1250 árboles por ha y un marco de plantación de 4 x 2 m. La superficie de las parcelas estaba en torno a 2500 m^2. Los árboles de la parcela MC estaban distribuidos en 5 filas de unos 115 m de longitud, mientras que los de la parcela MAn, en 6 filas de unos 85 m de longitud. Cada parcela se dividió en 4 unidades experimentales, con 40 árboles en cada una de ellas. Cada unidad experimental constituía una repetición.

Figura 34. Aspecto de una de las parcelas de ensayo en una fase temprana del ciclo vegetativo.

Dado que ambas parcelas pertenecían a la D.O.P. Peras de Rincón de Soto, las prácticas de fertilización fueron similares en ambas parcelas, así como el sistema de manejo del suelo, que fue mediante cubierta vegetal espontánea. El riego se hizo por inundación. Todas las decisiones sobre el manejo del cultivo, incluida la forma de llevar a cabo los tratamientos fitosanitarios (Tabla 15), fueron tomadas por los propietarios, según su criterio y/o las recomendaciones de sus asesores de modo que se cumplieran las especificaciones técnicas que indica el reglamento de dicha D.O.P. La liberación de *A. nemoralis* se hizo basándose en las indicaciones recomendadas por la empresa comercializadora que suministró el depredador (Bioplanet). Se liberaró un total de 2000 adultos/ha, repartidos en dos sueltas separadas 3 semanas. La primera suelta fue el 13 de abril, fecha del primer muestreo, a una densidad de 1500 adultos/ha, y la segunda el 4 de mayo, a una densidad de 500 adultos/ha. La recogida de muestras se inició justo antes de la primera liberación del depredador.

Tabla 15. Materias activas aplicadas en cada una de las parcelas, fechas en las que se llevaron a cabo y código numérico de cada tratamiento.

Manejo convencional (MC)			Manejo con *A. nemoralis* (MAn)		
Tratamientos					
Fecha	**Código**	**Materias activas**	**Fecha**	**Código**	**Materias activas**
14-mar	**1**	Cobre Aceite de parafina Imidacloprid	**12-mar y 13-mar**	**1**	Oxicloruro de cobre Paclobutrazol Glifosato
06-abr	**2**	Metiram	**16-abr**	**2**	Tebuconazol Matrinal
03-may	**3**	Aceite de parafina Abamectina	**07-may**	**3**	Diflubenzurón Difenoconazol Surfactante
20-may	**4**	TMTD Cipermetrín	**22-may**	**4**	Tebuconazol
12-jun	**5**	Captan Alfa-cipermetrín	**09-jun**	**5**	Diflubenzurón Kresoxim-metil Surfactante
25-jun	**6**	Difenoconazol Imidacloprid	**09-jul**	**6**	Tebuconazol Diflubenzurón
15-jul	**7**	TMTD Cipermetrín	**04-ago**	**7**	Metoxifenocida Matrinal
02-ago	**8**	Boscalida Piraclostrobín Abamectina	**15-ago**	**8**	Dispersante de melaza
08-ago	**9**	Dispersante de melaza			

2.2. Toma de muestras

Para hacer el seguimiento de las poblaciones de psila y de *A. nemoralis*, se hicieron visitas semanales a cada una de las parcelas con el fin de hacer una valoración visual del estado del cultivo y de las poblaciones mencionadas. Asimismo, se tomaron muestras de material vegetal del cultivo, corimbos o brotes de unos 20 cm (con 10 o 12 hojas), en función del momento del ciclo vegetativo en el que se encontraba el cultivo: en los primeros muestreos se tomaron corimbos y a partir del 4 de mayo se recogieron brotes.

Cada muestra estaba formada por 8 unidades muestrales (corimbos o brotes), cada una de las cuales procedía de un árbol distinto elegido al azar, es decir, se muestreó aproximadamente el 20% de los árboles de cada unidad experimental. Las muestras se tomaron de ambos lados de las filas del cultivo, tanto del interior como del exterior de la copa del árbol, a una altura comprendida entre 1,5 y 2 m. Se procuraba tomar brotes con el ápice en crecimiento activo, siempre que fue posible, ya que es en estos brotes donde suele haber mayor cantidad de ninfas de psila.

Cada muestra se introducía en una bolsa de plástico y se etiquetaba en función de la unidad experimental de procedencia. Las bolsas se transportaron al laboratorio en una nevera portátil refrigerada y, una vez allí, se mantuvieron en frigorífico hasta el momento de su procesado.

En cada unidad muestral se llevó a cabo el conteo del número de huevos y ninfas de *C. pyri* y de *A. nemoralis*, utilizando un microscopio estereoscópico (Olympus® SZ61). Además, se anotó el número de huevos y ninfas de *Orius* sp., de adultos y ninfas de trips (Thysanoptera), y de ninfas de *Campyloma* sp.

2.3. Análisis estadísticos

Las medias del número de huevos por brote o corimbo obtenidas en las parcela MC y MAn fueron comparadas para cada fecha de muestreo. Para ello se utilizó el test t-Student para muestras independientes cuando se cumplían las hipótesis *a priori*, tal y como se describe en el capítulo I. Cuando las hipótesis no se cumplían, se utilizó el test de Mann-Whitney. Para comparar las medias del número de ninfas de psila por brote o corimbo se utilizó el mismo criterio.

3. Resultados

3.1. Dinámica poblacional de *C. pyri* en las parcelas del ensayo

En la Figura 35 se muestra la dinámica poblacional de *C. pyri* representada mediante el número medio de huevos por brote o corimbo (en adelante solo brote para agilizar la lectura del texto) y el número medio de ninfas por brote, con su error estándar, obtenidos en los muestreos semanales realizados en la parcela de manejo convencional (MC). Además, se indican los tratamientos fitosanitarios aplicados en la parcela durante el periodo de muestreo, representados mediante su correspondiente código (Tabla 15). En la gráfica se observan tres picos poblacionales. El primero de ellos el 18 de mayo, con una densidad media de 61,4 ± 20,1 huevos/brote y 10,7 ± 3,9 ninfas/brote. El segundo, en el mes de julio, con una densidad media de 90,1 ± 22,5 huevos/brote y 28,2 ± 3,4 ninfas/brote. Y por último, el 28 de septiembre, obteniéndose en esta ocasión los valores más altos, con 97,5 ± 2,35 huevos/brote y 70,1 ± 5,8 ninfas/brote. En total se aplicaron 9 tratamientos fitosanitarios, de los cuales, 7 contenían insecticidas de alguna de las 5 materias activas utilizadas: aceite de parafina, imidacloprid, abamectina, cipermetrín y alfa-cipermetrín.

Esos mismos datos aparecen representados en la Figura 36 para parcela MAn. En este caso, la dinámica poblacional de los huevos de psila muestra tres picos: el 11 de mayo, el 8 de junio y el 28 de septiembre, con unos valores medios de 39,4 ± 6,7; 36,3 ± 8,4; y 33,9 ± 3,5 huevos/brote, respectivamente. Con respecto a las ninfas, la densidad media se mantuvo en niveles inferiores a 6,5 ± 2,0 ninfas/brote durante la mayor parte del ciclo de cultivo, y aumentó a partir del mes de agosto, para alcanzar su máxima densidad el 28 de septiembre, con 29,75 ± 5,6 ninfas/brote. En total se aplicaron 8 tratamientos, de los cuales, 4 contenían insecticidas de alguna de las 2 materias activas utilizadas en esta parcela: diflubenzurón y metoxifenocida.

En la Figura 37 se muestran, conjuntamente, las dinámicas poblacionales de los huevos de *C. pyri* de la parcela MC y de la parcela

MAn. Se indican las fechas de muestreo en las que se encontraron diferencias significativas entre las medias de la densidad de huevos por brote o corimbo de ambas parcelas. Concretamente, fueron las siguientes: 22 de junio, del 6 al 27 de julio, el 17 de agosto, y el 14 y 28 de septiembre (22/6: W=15,5; P=0,0420; 6/7: t=-3,7942; P=0,0090; 13/7: W=16,0; P=0,0303; 20/7: W 16,0; P=0,0303; 27/7: W=16,0; P=0,0303; 17/8: t=3,3617; P=0,0152; 14/9: t=-2,7702; P=0,0324; 28/9: t=-15,0906; P<0,0001).

En la Figura 38 se muestran las densidades poblacionales de las ninfas de *C. pyri* de las dos parcelas (MC y MAn), así como las fechas en las que aparecieron diferencias significativas entre las medias del número de ninfas encontradas por brote o corimbo en ambas parcelas y que fueron las siguientes fechas: 25 de mayo, del 6 al 27 de julio, del 17 al 31 de agosto y el 28 de septiembre (25/5: t=-8,7507; P=0,0001; 6/7: W=16,0; P=0,0303; 13/7: W=16,0; P=0,0303; 20/7: W=16,0; P=0,0303; 27/7: W=16,0; P=0,0303; 17/8: t=12,2478; P<0,0001; 24/8: t=4,8713; P=0,0028; 31/8: t=10,0044; P<0,0001; 28/9: W=16,0; P=0,0303).

3.2. Dinámica poblacional de enemigos naturales en la parcela de manejo con *A. nemoralis*

En la Figura 39 se muestran las dinámicas poblacionales de *C. pyri*, *A. nemoralis, Orius* sp. y *Campyloma* sp. en la parcela MAn, representadas mediante el número medio de huevos y ninfas por brote o corimbo de cada especie, excepto para *Campyloma* sp., en la que solamente se representa el número de ninfas debido a la gran dificultad que supone observar sus huevos bajo el microscopio estereoscópico.

En relación con la dinámica poblacional de los huevos de *A. nemoralis*, se observan dos picos: el primero el 22 de junio (2,9 ± 0,5 huevos/brote) y el segundo el 14 de septiembre (3,0 ± 0,6 huevos/brote). Por su parte, *Orius* sp. también presenta dos picos: el 22 de junio (1,5 ± 0,3 huevos/brote) y el 3 de agosto (1,6 ± 1,2 huevos/brote). El número medio de

ninfas por brote o corimbo de los tres depredadores fue muy bajo, siendo *Campyloma* sp. la especie más abundante, sobre todo en las primeras semanas de muestreo.

Las Figura 40Figura 41Figura 42 se representan las dinámicas poblacionales de los huevos y ninfas de cada uno de los depredadores, junto con la dinámica poblacional de *C. pyri*. Por último, en la Figura 43 se muestran las dinámicas poblacionales de los huevos y ninfas de *Orius* sp. y de los adultos y larvas de trips. En el caso de los trips, se puede observar que la densidad máxima de adultos se alcanza el 1 de junio (2,1 ± 0,4 adultos/brote), mientras que la densidad máxima de ninfas ocurre el 8 de junio (8,9 ± 1,4 ninfas/brote). A partir de esta fecha la densidad de ninfas y adultos de trips se mantiene en niveles iguales o inferiores a 1 individuo/brote o corimbo.

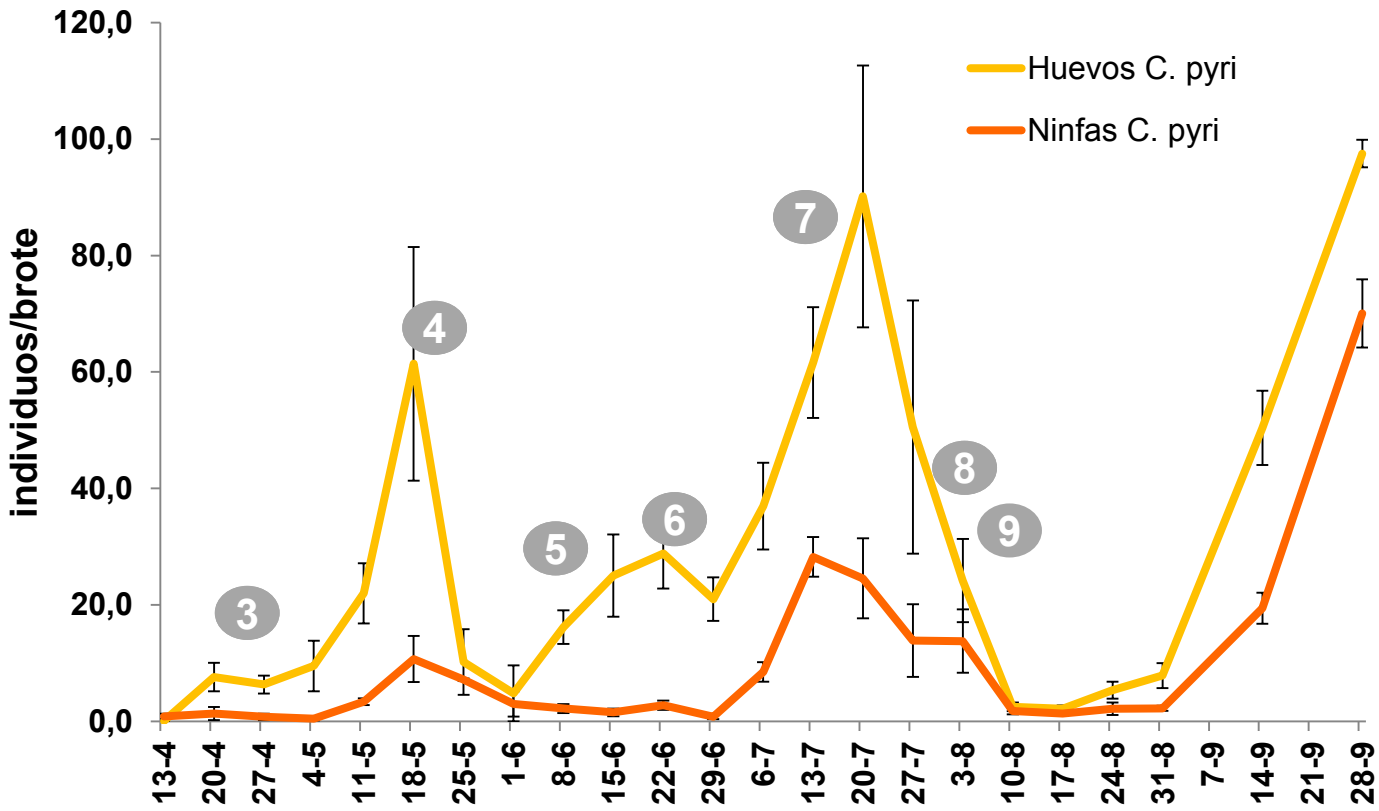


Figura 35. Dinámica poblacional de huevos y ninfas de *C. pyri* en la parcela de manejo convencional (MC). Los números indican los tratamientos fitosanitarios aplicados (ver Tabla 15).

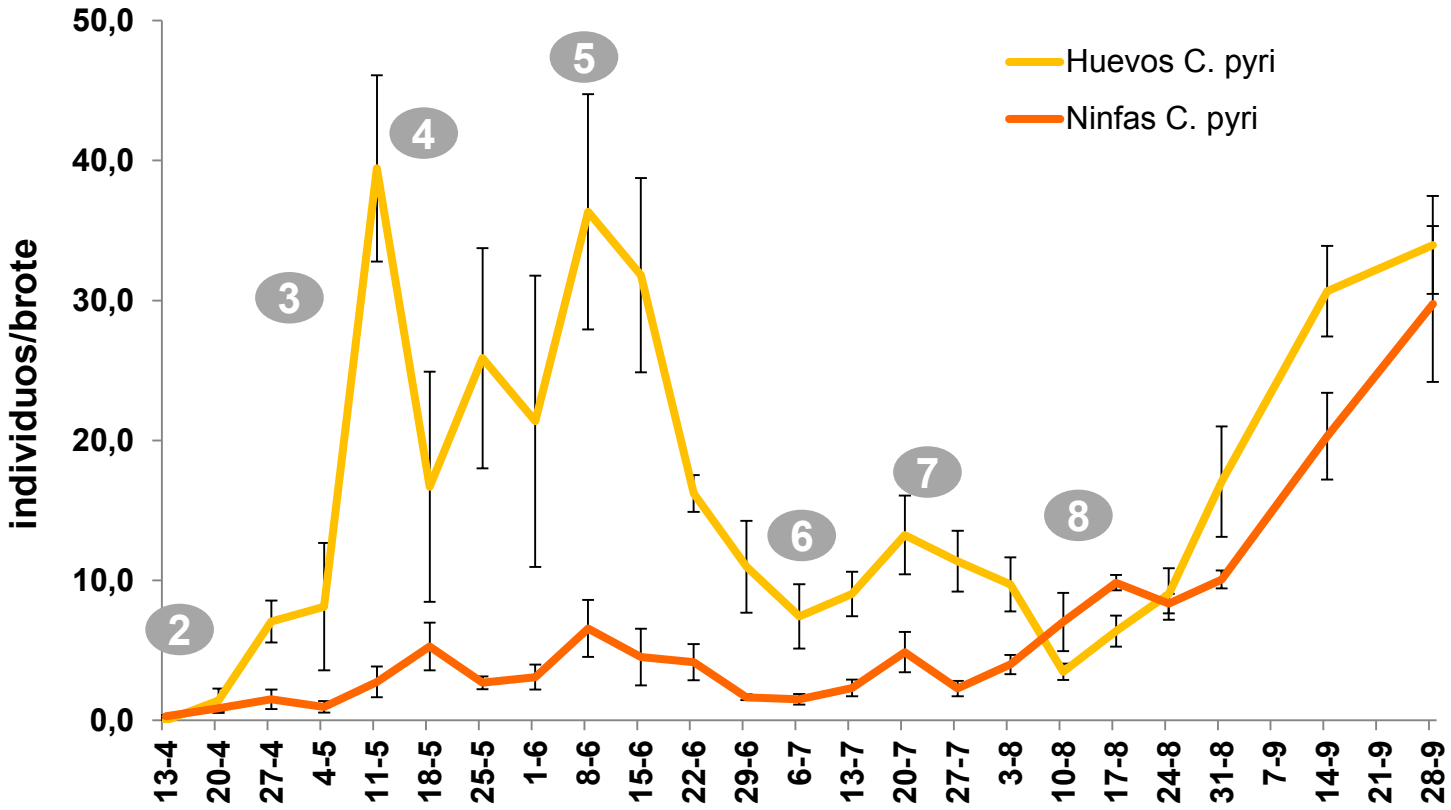


Figura 36. Dinámica poblacional de los huevos y ninfas de *C. pyri* en la parcela de manejo con *A. nemoralis* (MAn). Los números indican los tratamientos fitosanitarios aplicados (ver Tabla 15).

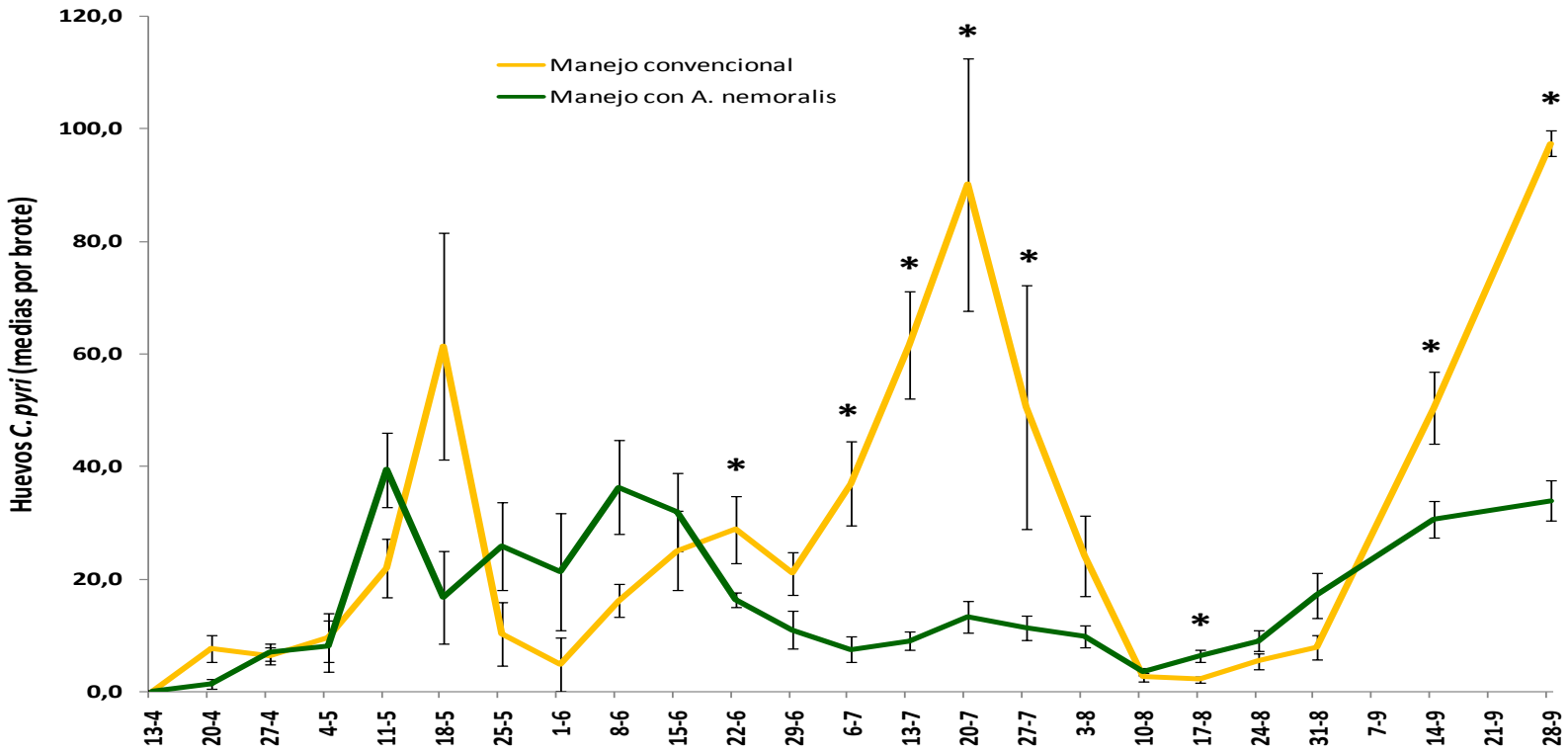


Figura 37. Dinámica poblacional de los huevos de *C. pyri* en la parcela de manejo convencional y en la parcela de manejo con *A. nemoralis*. Los asteriscos indican las fechas en las que existieron diferencias significativas entre las medias de las densidades de ambas parcelas (P=0,05; t-Student para muestras independientes o Mann-Whitney). (22/6: W=15,5; P=0,0420; 6/7: t=-3,7942; P=0,0090; 13/7: W=16,0; P=0,0303; 20/7: W 16,0; P=0,0303; 27/7: W=16,0; P=0,0303; 17/8: t=3,3617; P=0,0152; 14/9: t=-2,7702; P=0,0324; 28/9: t=-15,0906; P<0,0001).

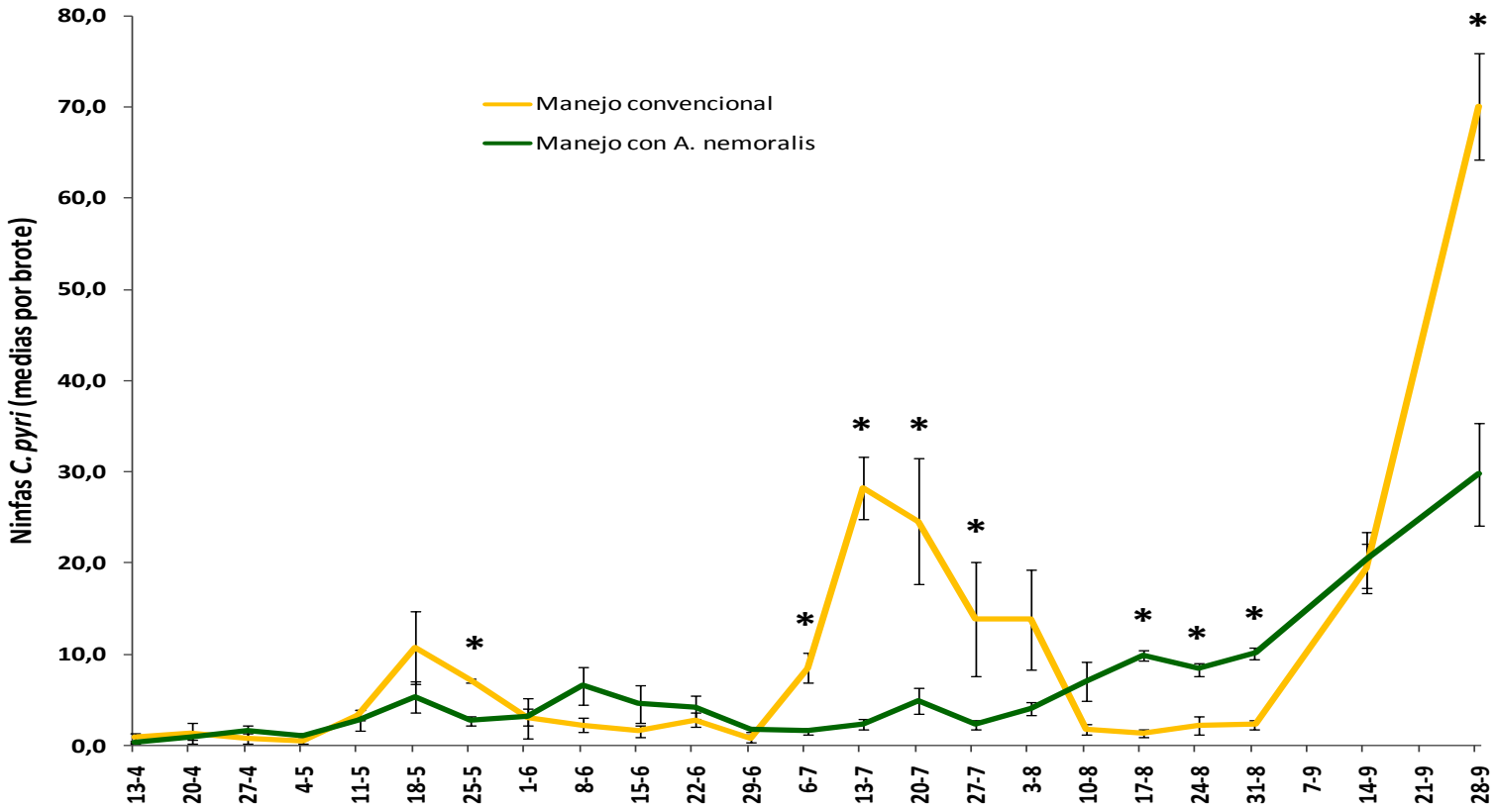


Figura 38. Dinámica poblacional de las ninfas de *C. pyri* en la parcela de manejo convencional y en la parcela de manejo con *A. nemoralis*. Los asteriscos indican las fechas en las que existen diferencias estadísticamente significativas entre las densidades medias de ambas parcelas. (P=0,05; t-Student para muestras independientes o Mann-Whitney) (25/5: t=-8,7507; P=0,0001; 6/7: W=16,0; P=0,0303; 13/7: W=16,0; P=0,0303; 20/7: W=16,0; P=0,0303; 27/7: W=16,0; P=0,0303; 17/8: t=12,2478; P<0,0001; 24/8: t=4,8713; P=0,0028; 31/8: t=10,0044; P<0,0001; 28/9: W=16,0; P=0,0303).

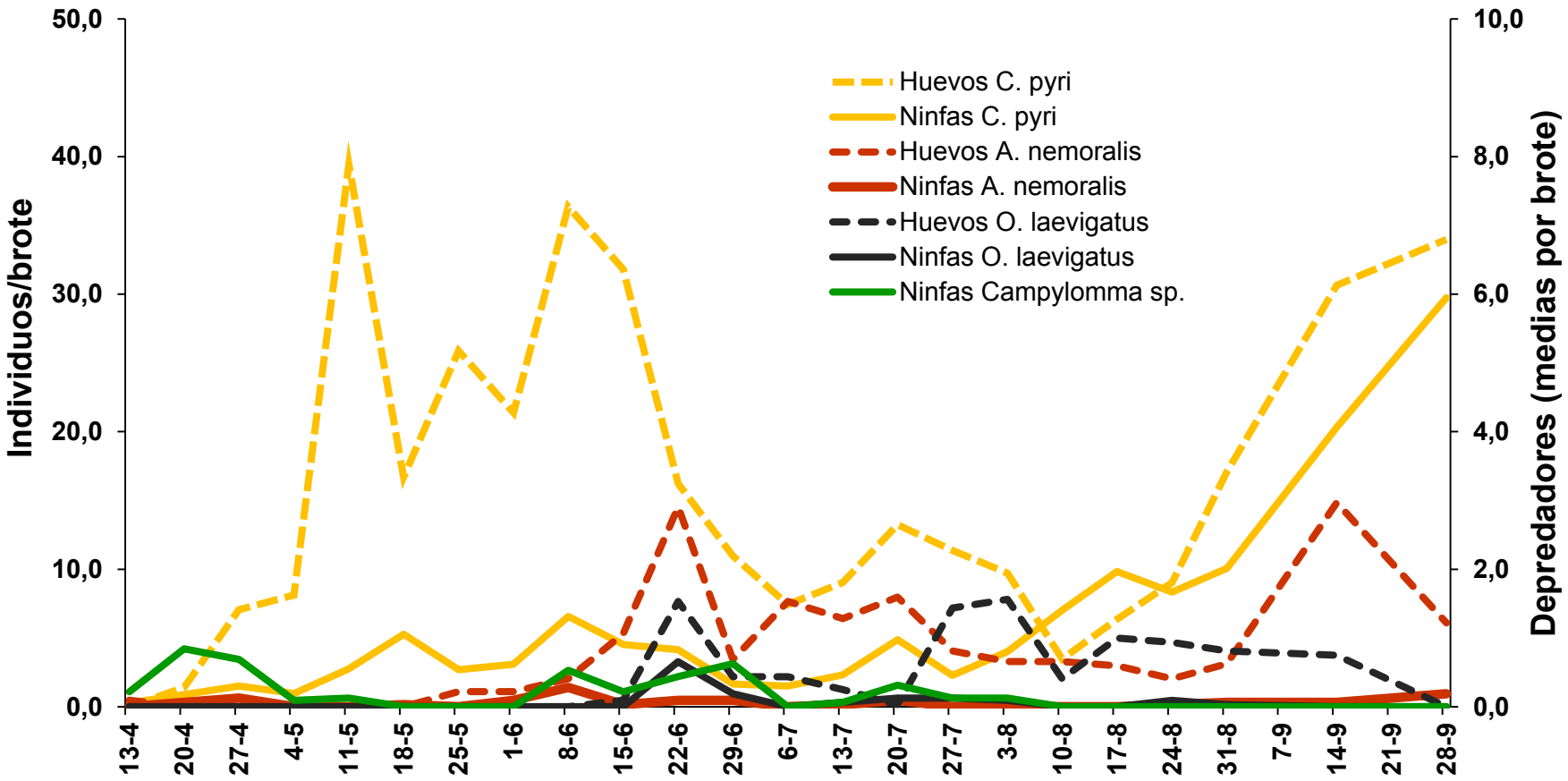


Figura 39. Dinámica poblacional de *C. pyri*, *A. nemoralis, Orius* sp. *y Campyloma* sp. en la parcela de manejo con *A. nemoralis*.

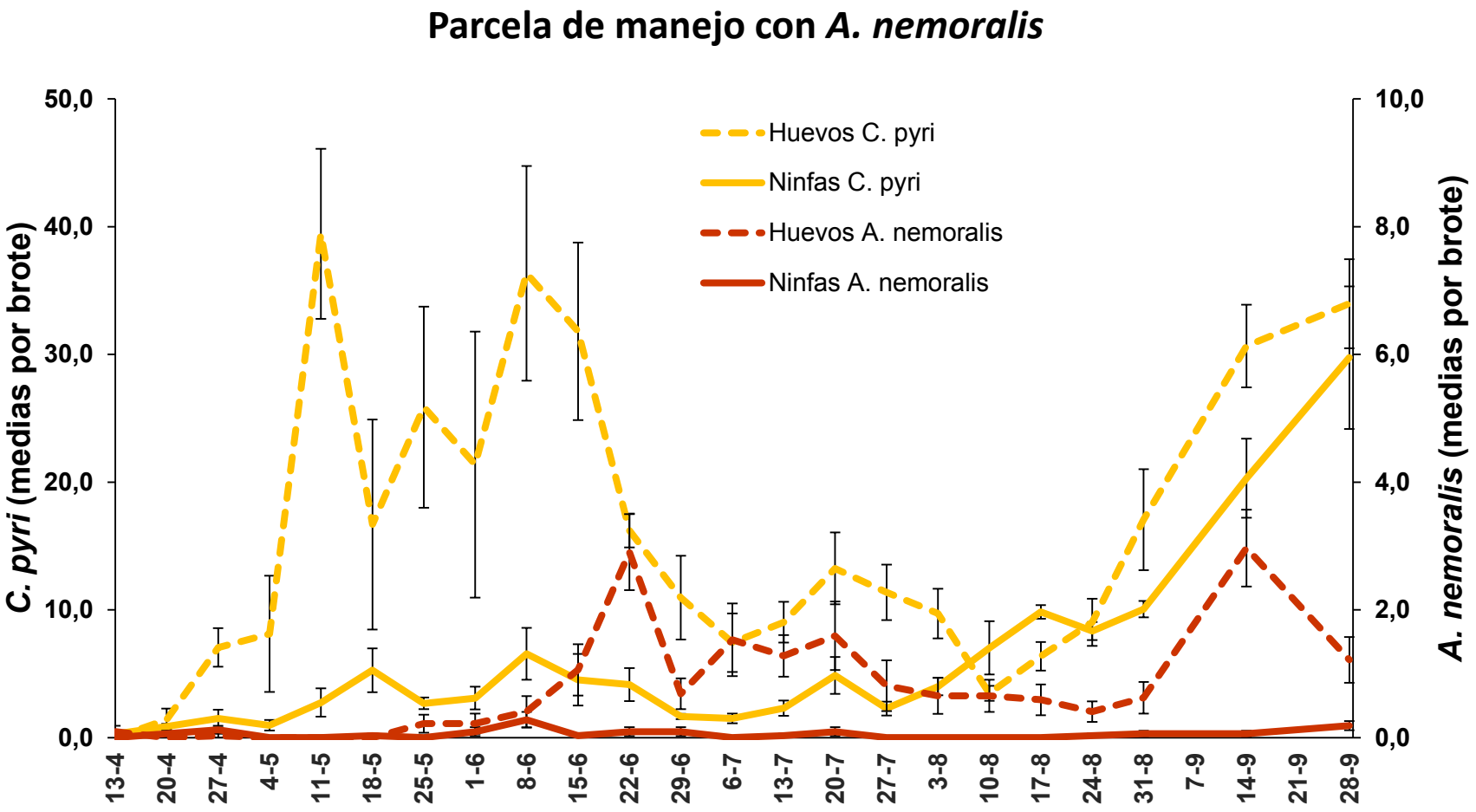


Figura 40. Dinámica poblacional los huevos y ninfas de *C. pyri* y *A. nemoralis* en la parcela de manejo con *A. nemoralis*.

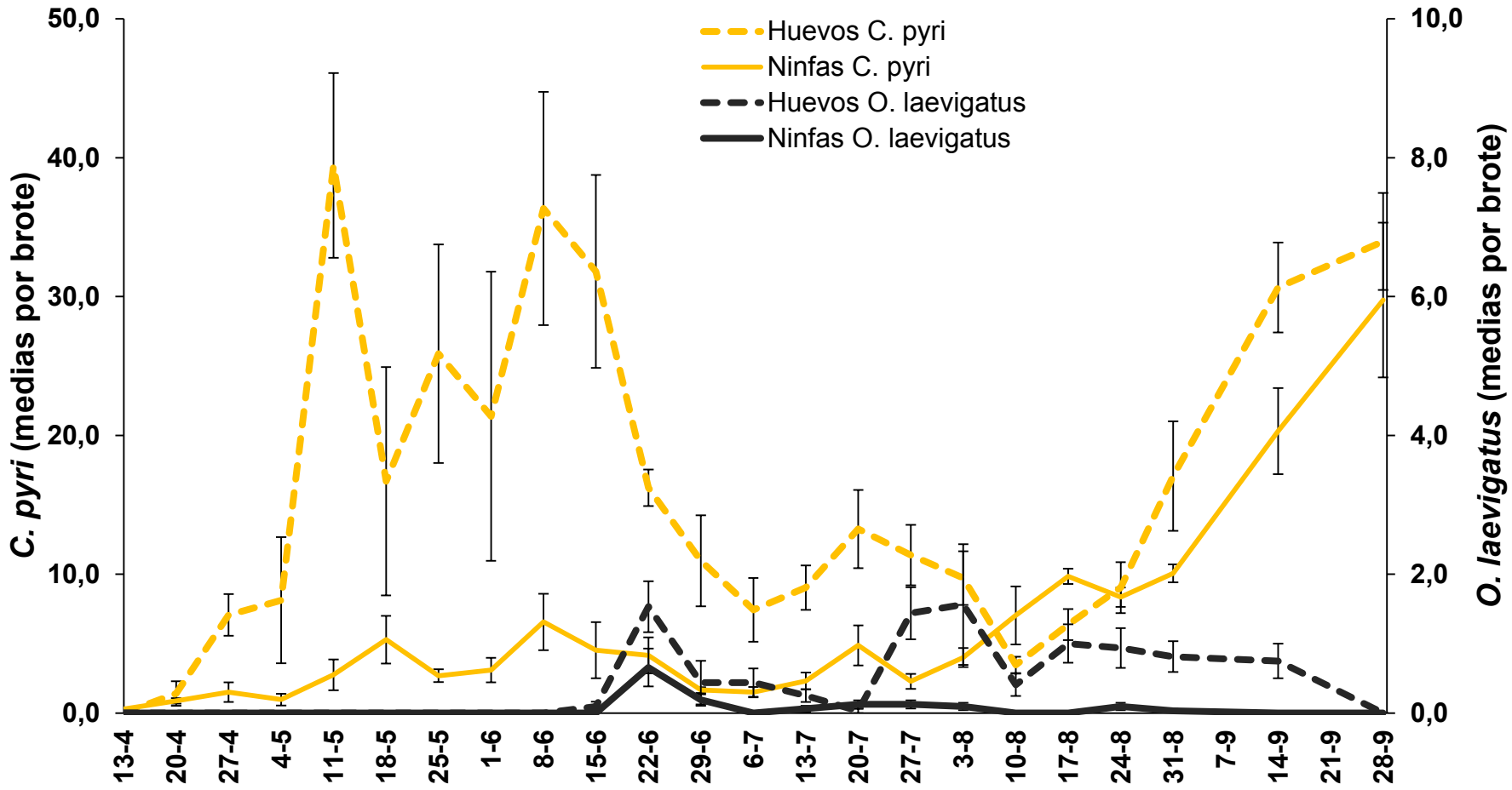


Figura 41. Dinámica poblacional de los huevos y ninfas de *C. pyri* y *Orius* sp.en la parcela de manejo con *A. nemoralis*.

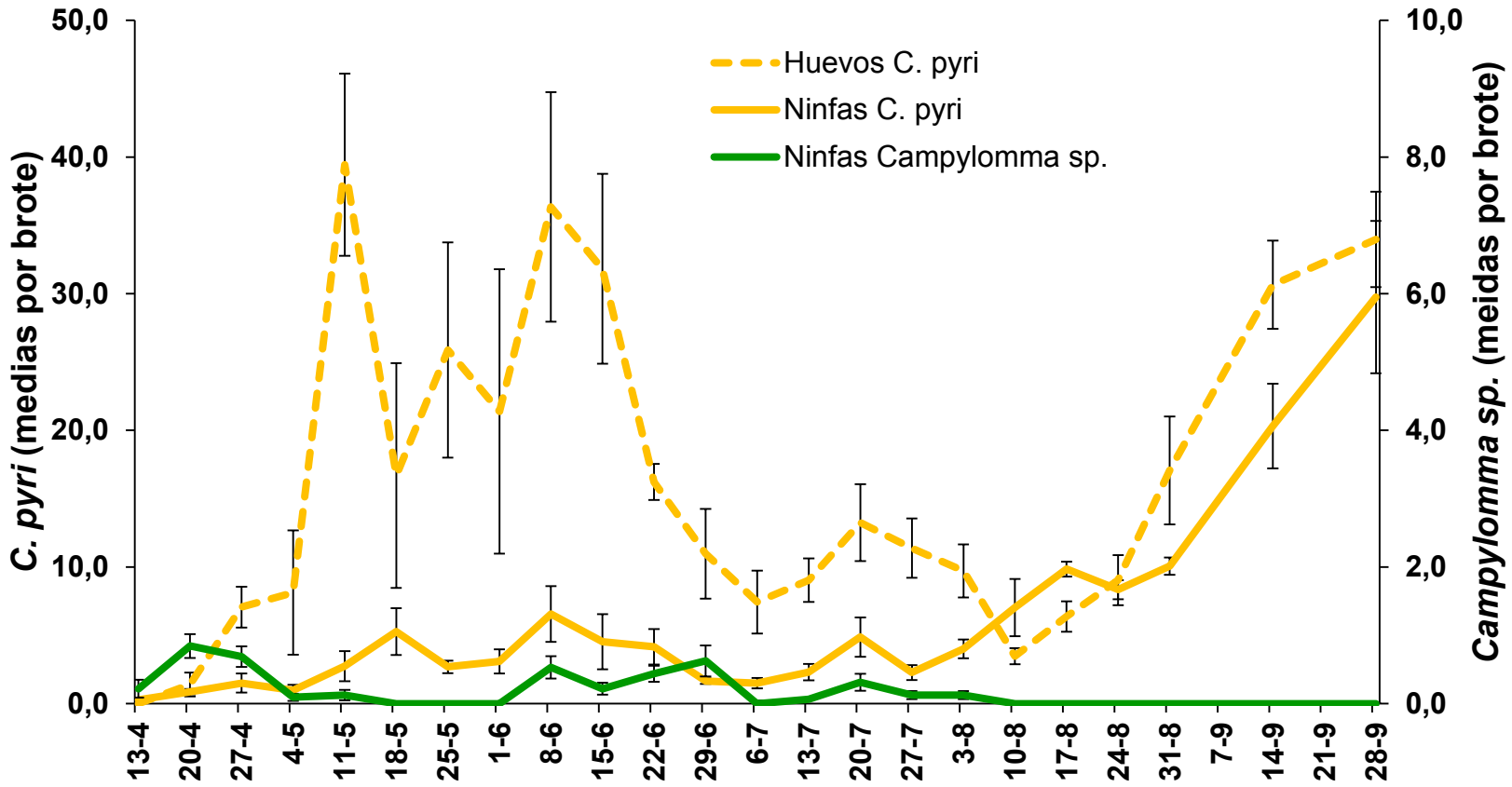


Figura 42. Dinámica poblacional de los huevos y ninfas de *C. pyri* y de las ninfas de *Campyloma* sp. en la parcela de manejo con *A. nemoralis*

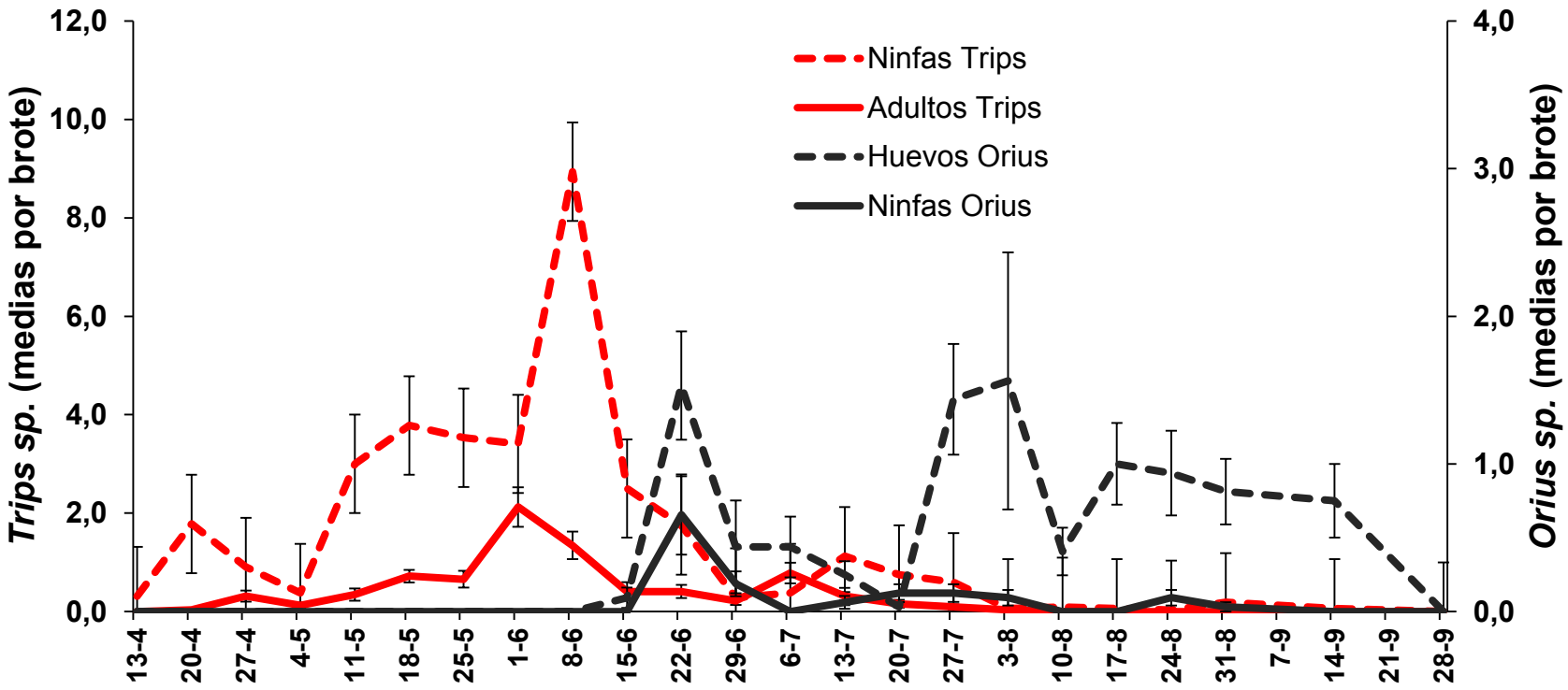


Figura 43. Dinámica poblacional de las ninfas y adultos de *trips* y de los huevos y ninfas *Orius* sp. en la parcela de manejo con *A. nemoralis*.

.

4. Discusión

Analizando la parcela de manejo convencional (MC), se observa que el primer tratamiento insecticida se realiza en marzo. Durante los meses de mayo y junio se aplicaron un total de 4 tratamientos insecticidas, utilizando abamectina, aceite de parafina, cipermetrín, alfa-cipermetrín e imidacloprid. Esto supone la aplicación de un tratamiento, entre los meses de mayo y junio, cada 15 días, aproximadamente. Sin embargo, la cantidad de huevos de *C. pyri* correspondiente a la parcela de MC alcanzó un primer pico el 18 de mayo. Este pico se corresponde con el momento de máxima puesta realizada por la primera generación de verano, procedente de los huevos puestos por las hembras invernantes. El segundo pico poblacional de huevos, alcanzado el 20 de julio, se corresponde con la puesta realizada por la segunda generación de adultos de verano. En el caso de las ninfas, tras el primer pico poblacional, correspondiente al muestreo del 18 de mayo, se observa una tendencia descendente de la densidad, que se recupera rápidamente hasta llegar a un segundo pico el 13 de julio y con valores muy superiores.

El hecho de que tras la realización de estos 5 tratamientos insecticidas se presenten unos picos poblacionales de huevos y ninfas de psila en el mes de julio, incluso mayores que los del mes de mayo, sugiere la baja efectividad de estos tratamientos e incluso la posibilidad de que la población haya generado algún tipo de resistencia frente a estos productos. No hay que olvidar que ya diversos autores han hecho referencia a las resistencias que ha generado *C. pyri* en los últimos años a compuestos como los piretroides en algunos países europeos (Civolani, 2012), o *C. pyricola* en Norteamérica (Pree et al. 1990), de modo que la efectividad de los tratamientos con estas materias activas se ve comprometida en algunas ocasiones. Además, *C. pyri* dispone de una gran capacidad de incremento poblacional para conseguir una rápida resurgencia tras el tratamiento. Resultados similares se pueden observar en las dinámicas poblacionales de las ninfas de *C. pyri* obtenidas por Souliotis & Moschos (2008) en ensayos realizados en plantaciones comerciales de peral de Grecia. Tras la aplicación de un tratamiento con deltametrina o amitraz, consiguieron disminuir inicialmente el nivel poblacional

de la psila, pero posteriormente se produjo una rápida recuperación de la población.

A pesar de todo ello, las observaciones realizadas en campo durante estos primeros meses mostraron que la melaza generada por el insecto no fue lo suficientemente importante como para provocar daños económicos, lo que sugiere que se puede soportar un cierto nivel de población de psila en las primeras fases del ciclo vegetativo del peral sin que ello suponga un daño potencial.

Los tratamientos insecticidas realizados en los dos meses siguientes consiguieron reducir la población de plaga a niveles bastante bajos, aunque se observó una rápida resurgencia en el mes de septiembre, llegando a alcanzar los niveles poblacionales más altos de todo el año. En esta elevada densidad poblacional al final del verano juega un papel importante el hecho de no haber aplicado ningún tratamiento insecticida en postcosecha. Merece la pena destacar también que no se encontraron antocóridos en ninguno de los muestreos realizados en la parcela de MC. Tampoco se encontraron míridos y, solo de forma ocasional, se vieron algunas mariquitas y crisopas en las observaciones visuales realizadas durante los muestreos. Es decir, la presencia de enemigos naturales en la parcela de MC fue insignificante.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, aunque similares, difieren un poco de los obtenidos por Vilajeliu *et al*. (1998) en un estudio realizado en 10 explotaciones comerciales de peral en Girona. Estos autores encontraron dos picos poblacionales en relación a los adultos capturados mediante la técnica de golpeo: el primero en junio y el segundo en octubre. Esta diferencia podría deberse al tipo de muestreo o a que los tratamientos dirigidos a controlar las poblaciones de invierno que se realizaron al principio del ciclo del cultivo, podrían haber mantenido las poblaciones de psila en niveles bajos en el mes de mayo, de modo que se retrasaría la aparición del primer pico de verano. De todos modos, la evolución de la psila hacia niveles poblacionales altos en los meses de verano y, fundamentalmente al final del ciclo, están en concordancia con los obtenidos en este trabajo y sugieren una

baja efectividad de los insecticidas frente a la plaga, así como una gran capacidad de recuperación poblacional.

Sánchez *et al*. (2010) presentaron resultados similares. En una parcela manejada de forma convencional, con una media de 7 tratamientos al año, estos autores encontraron que el nivel poblacional de psila se mantuvo relativamente bajo hasta finales de agosto, momento en el que se produjo una rápida recuperación de la plaga, alcanzándose valores muy elevados en octubre. Hay que señalar que la fecha del último tratamiento se realizó hacia mediados de julio, de manera que se volvió a manifestar, de nuevo, la gran capacidad de recuperación de la población una vez que se suprimen las medidas de control químico y en un entorno muy pobre en cuanto a presencia de sus enemigos naturales.

La dinámica poblacional de *C. pyri* en el caso de la parcela MAn presentó unas características diferentes a las de la parcela MC. En primer lugar, se observó que los picos poblacionales fueron menores, e inferiores a 40 huevos por brote en todas las semanas de muestreo. A partir del segundo pico poblacional de huevos, se observó una tendencia descendente más o menos continuada y que tuvo su mínimo en agosto, momento coincidente con el mínimo señalado para la parcela de MC y de valor similar (3,5 huevos/brote). Es destacable el hecho de que, cuando en la parcela MC se alcanza la máxima densidad de huevos (2ª generación de adultos), el 20 de julio, en la parcela MAn la densidad es 7 veces menor.

La dinámica poblacional del estado ninfal en la parcela de MAn se mantuvo más o menos estable durante toda la primavera y gran parte del verano, con densidades inferiores a 10 ninfas/brote o corimbo en todas las fechas de muestreo, y por debajo de 5 ninfas/brote en la mayoría de los muestreos. A partir de agosto se observó una tendencia ascendente, llegando a alcanzar su máximo al final de septiembre.

Analizando los tratamientos fitosanitarios realizados en esta parcela, se puede observar que las materias activas insecticidas utilizadas se limitan a

dos: diflubenzurón y metoxifenocida. Estas materias activas se aplican para el control de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae), insecto denominado comúnmente carpocapsa. También hay que indicar que el diflubenzurón presenta actividad sobre la psila del peral y que, como se ha indicado en el capítulo II, éstas materias activas podrían considerarse respetuosas con *A. nemoralis*. Otra estrategia diferente en relación a los productos fitosanitarios empleados en la parcela MAn consiste en la utilización de dispersantes de melaza para minimizar las consecuencias negativas asociadas a esta sustancia.

El día 9 de junio se hizo una aplicación de kresoxim-metil. Observándose la dinámica poblacional de *A. nemoralis,* presentada en las figuras 39 y 40, se aprecia que el primer máximo poblacional de *A. nemoralis* se produjo a los 15 días del tratamiento, lo que sugiere que los efectos en campo de las estrobilurinas no parecen ser tan drásticos como se observaron en los ensayos de laboratorio recogidos en el capítulo II de la presente tesis. Hay que señalar la conveniencia de seguir investigando con estos fungicidas para determinar con mayor seguridad el efecto que pueden llegar a producir sobre los enemigos naturales en general, y sobre *A. nemoralis* en particular, ya que su utilización es habitual en el cultivo del peral.

Hay que indicar que las observaciones visuales realizadas en la parcela MAn permitieron descubrir una diversa y abundante fauna auxiliar. Aunque no se llegaron a identificar hasta el nivel de especie, se encontraron enemigos naturales de los siguientes grupos: míridos, antocóridos, sírfidos, coccinélidos, crisópidos, dermápteros, himenópteros, fitoseidos, así como una buena cantidad de polinizadores y fitófagos no considerados plaga en el cultivo. (Souliotis & Moschos, 2008) indican que, siguiendo una estrategia de control de *C. pyri* que utilice insecticidas más selectivos y respetuosos con los enemigos naturales, en su caso diflubenzurón + fenoxicarb o diflubenzurón, se encuentra una cierta población natural de *A. nemoralis*, así como de otros depredadores durante todo el ciclo del cultivo. Sin embargo, estos niveles no son suficientes para mantener la población de psila bajo niveles tolerables, ya que en las parcelas que no se realizan tratamientos insecticidas de ningún

tipo, el nivel de psila es demasiado alto. Por otra parte, Sánchez *et al*. (2010) estudiaron una parcela en la que no se llevaron a cabo tratamientos químicos convencionales y el control de psila se hizo mediante los enemigos naturales que colonizan el cultivo de forma espontánea. Los depredadores más habituales que se encontraron fueron *A. nemoralis, Orius* sp. y *Pilophorus gallicus* (Hemiptera: Miridae), siendo este último el principal agente de control de psila en este caso, ya que la abundancia de *A. nemoralis* y *Orius* sp. fue baja y sus dinámicas poblacionales erráticas. Cuando se suprimieron todos los tratamientos insecticidas en años posteriores, observaron que los niveles poblacionales de la plaga eran muy bajos durante toda la campaña. En estos años, *A. nemoralis* y *Orius* sp fueron cada vez menos frecuentes apareciendo únicamente en los momentos en los que *P. gallicus* se encontraba ausente. Resultados parecidos se han encontrado con *Pilophorus perplexus* Douglas & Scott 1875, de manera que su presencia se considera negativa por interferir con la instalación de *A. nemoralis* (Staubli *et al*. 1992).

Las diferencias encontradas entre las dinámicas poblacionales de *C. pyri* de cada una de las parcelas (figuras 37 y 38) fueron estadísticamente significativas en las fechas de muestreo correspondientes a la segunda generación de adultos de psila, que tuvo lugar en el mes de julio, y que presentó valores bastante elevados en la parcela MC. Estas diferencias se produjeron, tanto entre las medias de las densidades de huevos, como entre las medias de las densidades de ninfas, siendo siempre muy inferiores en la parcela MAn. Analizando, de igual modo, la primera generación de adultos, se puede decir que, en general, no existieron diferencias significativas entre parcelas. También se encontraron diferencias significativas en el mes de agosto, sin embargo en este periodo la densidad de ninfas más elevada se encontró en la parcela MAn. A pesar de ello, el nivel de plaga no fue alto y el uso de dispersantes de melaza evitó la posible aparición de negrilla, minimizando el daño potencial. Es destacable la diferencia en el nivel de población de psila (tanto de huevos como de ninfas) entre ambas parcelas en la fecha del último muestreo. Las medias de las densidades de huevos y ninfas fueron significativamente diferentes entre las parcelas MC y MAn; en

concreto, fueron mucho mayores en el caso de MC que en el de MAn: 3 veces para huevos y 2 veces para ninfas.

Con respecto a los tres depredadores encontrados en la parcela MAn, durante la primavera, fue *Campyloma* sp. la especie que predominó. Fueron muy pocos los huevos y ninfas de *A. nemoralis* que se encontraron en las primeras 8 semanas de muestreo, pero a partir del mes de junio se observó una tendencia ascendente en la presencia de huevos, alcanzando un pico el 22 de junio y descendiendo poco a poco hasta finales de agosto, momento en el cual comenzó de nuevo a ascender para llegar a un segundo pico. Es interesante mencionar que, durante todo el muestro, el número de ninfas de *A. nemoralis* fue muy bajo (inferior a 1 ninfa/brote). En este sentido, algunos autores han obtenido resultados similares, incluso cuando utilizaron el sistema de golpeo de ramas, del que, *a priori*, podría esperarse un mayor número de capturas (Civolani & Pasqualini, 2003; Shaltiel & Coll, 2004). *Orius* sp. fue el depredador más tardío en aparecer, encontrando los primeros huevos a mediados de junio y habiendo alcanzado un pico a la semana siguiente. El segundo pico se alcanzó a finales de julio y desapareció a finales de septiembre. Comparando las dinámicas poblacionales de *Orius* sp. y de los trips (Figura 43), se observa que el depredador apareció en el cultivo cuando la población de tisanópteros fue alta. Algunos autores indican que varias especies de *Orius* presentan algún tipo de respuesta olfatoria frente a trips (Carvalho et al. 2011), por lo que se podría sugerir que la aparición del depredador pudo estar relacionada con la presencia de este grupo de insectos y no de psila, aunque una vez que ha colonizado el cultivo sea capaz de consumir también a esta plaga debido a su polifagia.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede suponer que el diflubenzurón es respetuoso con los depredadores citados, ya que las tres aplicaciones realizadas con esta materia activa, el 7 y 22 de mayo y el 6 de junio, no impidieron el crecimiento poblacional de los depredadores en una época posterior. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en los ensayos de laboratorio realizados con esta materia activa y que se han presentado en el capítulo II de la presente tesis.

Hay que señalar que, dada la baja densidad a la que se libera *A. nemoralis* (2000 adultos por ha), es difícil encontrar adultos, ninfas o huevos en campo hasta que no se produce un crecimiento considerable de la población a partir de los individuos liberados. Por otra parte, y dado el alto potencial de incremento poblacional que presenta este depredador, tal y como se deriva de los resultados obtenidos en el capítulo II para la tasa intrínseca de crecimiento (r_m) de los controles negativos, queda la duda de si *A. nemoralis* hubiera podido tener un crecimiento poblacional más rápido en el caso de no haber utilizado diflubenzurón. Por el mismo motivo, queda la duda de si *A. nemoralis*, junto con el resto de enemigos naturales que aparecieron en el cultivo de forma espontánea, podrían haber mantenido por sí mismos la población de psila en los niveles observados, ya que no es posible cuantificar, en las circunstancias del ensayo, el efecto del diflubenzurón sobre la población de psila.

Dado que los insecticidas utilizados en la parcela MAn estaban destinados fundamentalmente a controlar las poblaciones de *C. pomonella*, podría llevarse a cabo una estrategia de control de la psila del peral únicamente con *A. nemoralis* como principal agente de control y prescindir totalmente de los insecticidas destinados al manejo del tortrícido. Para ello, se podrían utilizar otro tipo de estrategias de control sobre *C. pomonella*, siendo la técnica de confusión sexual muy prometedora y adecuada en este contexto, si se dan las condiciones para poder emplearla.

Por otra parte, *C. pyri* presenta una serie de características que favorecen el éxito de los programas de CB y, por tanto, del MIP. Una de ellas es que los daños directos son de escasa importancia y que los daños indirectos no se producen generalmente en el fruto como resultado de la alimentación de las ninfas. Es la melaza que se genera en los brotes, cuando se produce en altas cantidades como consecuencia de la presencia de una elevada densidad de población, la que cae sobre los frutos y se convierte en responsable de la aparición de la negrilla que los deprecia. Ocasionalmente, también se puede observar melaza en los frutos que están en contacto, ya que en estas zonas es habitual encontrar ninfas en estadios avanzados de

desarrollo, aunque esto suele suceder cuando la densidad poblacional es alta. De este modo, se puede tolerar un cierto nivel de población de la plaga sin llegar a originarse pérdidas económicas, sobre todo al inicio de la temporada, cuando los frutos aún no han aparecido o son pequeños. Una vez que el ciclo del cultivo está más avanzado, es posible soportar un cierto nivel de población de psila ya que, como se ha comentado anteriormente, se puede recurrir a tratamientos con dispersantes de melaza para evitar la aparición de la negrilla en el fruto sin necesidad de recurrir a un tratamiento insecticida.

Asimismo, el seguimiento de las poblaciones de *C. pyri*, así como de sus enemigos naturales en el cultivo del peral mediante métodos de muestreo adecuados, es un factor clave para poder valorar la situación real en campo y poder llevar a cabo un correcto proceso en la toma de decisiones, tal y como se indica en los principios generales del MIP. El método de muestreo descrito y utilizado para hacer el seguimiento de las poblaciones de *A. nemoralis* a partir del conteo de huevos, podría constituir una herramienta muy útil para determinar el nivel poblacional del depredador y tomar decisiones relativas a su manejo en campo. Para ello, se precisa realizar más investigación relacionada con la metodología propuesta, determinar su idoneidad y encontrar las mejoras oportunas para disminuir el tiempo de procesado de las muestras en laboratorio.

La incorporación de organismos de control biológico en el cultivo del peral junto con un correcto manejo de los productos fitosanitarios y de la totalidad de técnicas de cultivo empleadas podrían ser las claves para mantener las poblaciones de *C. pyri* en niveles tolerables y de este modo conseguir la sostenibilidad en este cultivo.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. En las condiciones del ensayo, el estado de huevo es capaz de completar su desarrollo en un rango de temperaturas constantes comprendidas entre 12 y 36 ºC y los estadios ninfales pueden hacerlo entre 12 y 35 ºC.
2. Los porcentajes de mortalidad observados fueron inferiores al 13% a temperaturas comprendidas entre 12 y 33 ºC para el estado de huevo, e inferiores al 5% para los estadios ninfales en ese mismo rango de temperaturas constantes. A 37 ºC se obtuvo una mortalidad del 100% para el estado de huevo, porcentaje que se alcanzó a 36 ºC para el primer estadio ninfal.
3. La duración del desarrollo de *O. laevigatus* a las temperaturas constantes ensayadas varió entre 20,31 y 2,31 días para el estado de huevo y entre 63,00 y 6,83 días para el estado ninfal.
4. La tasa de desarrollo para el estadio ninfal N2 de *O. laevigatus* fue superior a la unidad a las temperaturas constantes de 30 y 33 ºC, es decir, el tiempo de desarrollo a estas temperaturas fue inferior a 1 día.
5. La variación intradiaria de la temperatura no afectó significativamente a la duración del desarrollo de los estados de huevo y ninfa de *O. laevigatus* respecto al tiempo de desarrollo a temperatura constante.
6. Los umbrales de desarrollo predichos por los modelos variaron entre 2,4 ºC, según el modelo de Logan tipo III, y 41,5 ºC, según el modelo de Brière, ambos para el estadio N2.

7. Los modelos no lineales predijeron adecuadamente el tiempo de desarrollo de *O. laevigatus*, siendo la variación respecto a la duración real observada en condiciones de exterior, inferior al 6% en el estado de huevo, según todos los modelos, e inferior al 9% para el estado ninfal, con los modelos de Logan tipo III y Lactin.
8. Los insecticidas clorpirifos, imidacloprid y spinetoram resultaron tóxicos (categoría 4) sobre adultos de *Anthocoris nemoralis* expuestos al residuo fresco sobre sustrato inerte, mientras que azadiractina, spirotetramat y diflubenzurón resultaron ligeramente tóxicos (categoría 2), y metoxifenocida inocuo (categoría 1).
9. Azadiractina y spirotetramat provocaron una reducción ligeramente significativa de la tasa intrínseca de crecimiento poblacional de *A. nemoralis* respecto al control.
10. Los fungicidas mancozeb, captan, tebuconazol y trifloxistrobin resultaron inocuos (categoría 1) sobre adultos de *A. nemoralis*.
11. Trifloxistrobin produjo una drástica reducción de la tasa intrínseca de crecimiento de *A. nemoralis*, presentando diferencias significativas respecto al resto de compuestos evaluados, incluidos los insecticidas, exceptuando spirotetramat.
12. La parcela comercial de peral manejada mediante la liberación del depredador *A. nemoralis* presentó, en general, una densidad poblacional de *Cacopsylla pyri* significativamente inferior a la encontrada en la parcela de manejo convencional, especialmente en la segunda y tercera generación de la plaga.

13. En la parcela de manejo con A. nemoralis se encontró una comunidad de enemigos naturales y polinizadores diversa y abundante, mientras que en la parcela de manejo convencional su presencia fue prácticamente nula.
14. La incorporación de organismos de control biológico en el cultivo del peral, junto con un correcto manejo de los productos fitosanitarios y de la totalidad de técnicas de cultivo empleadas, podrían ser las claves para mantener las poblaciones de *C. pyri* en niveles tolerables y de este modo conseguir la sostenibilidad en este cultivo.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

Abbott, W. S., 1952. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of economic entomology, 18: 265–267.

Abelson, P.H. 1995. Sustainable Agriculture and the 1995 Farm Bill. Science, 267 (5200): 943.

Abrami, G. 1972. Optimum mean temperature for plant growth calculated by a new method of summation. Ecology, 53: 893-900.

Alauzet, C.; Dargagnon, D.; Malausa, J.C. 1994. Bionomics of a polyphagous predator: *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). Entomophaga, 39: 33-40.

Allen, J.C. 1976. A modified sine wave method for calculating day degrees. Environ. Entomol., 5: 388-396.

Altieri, M.A. 1991. How best can we use biodiversity in agroecosystems? Outlook on Agriculture, 20: 15-23.

Amarasekare, K.G. & Shearer, P.W. 2013. Laboratory Bioassays to Estimate the Lethal and Sublethal Effects of Various Insecticides and Fungicides on *Deraeocoris brevis* (Hemiptera: Miridae). Journal of Economic Entomology, 106(2): 776–785.

Amor, F., Christiaens, O., Bengochea, P., Medina, P., Rougé, P., Viñuela, E., Smagghe G. 2012. Selectivity of diacylhydrazine insecticides to the predatory bug *Orius laevigatus*: In vivo and modelling/docking experiments. Pest Management Science, 68(12): 1586–1594.

Anderson, N.H. 1962a. Bionomics of six species of *Anthocoris* (Heteroptera:Anthocoridae) in England. Transactions of the Entomological Society of London, 114: 67–95.

Anderson, N.H. 1962b. Growth and fecundity of *Anthocoris* spp. reared on varius prey (Heteroptera: Anthocoridae). Entomologia Experimentalis et Applicata, 5(1): 40–52.

Angeli, G., Baldessari, M., Maines, R., Duso, C. 2005. Side-effects of pesticides on the predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae) in the laboratory. Biocontrol Science and Technology, 15(7): 745–754.

Angilletta Jr., M.J. 2006. Estimating and comparing termal performance curves. J. Therm. Biol., 31: 541-545.

Aragón-Sánchez, M., Román-Fernández, L.R., Martínez-García, H., Aragón-García, A., Marco-Mancebón, V.S., Pérez-Moreno, I. 2016. Parámetros de la tabla de vida del depredador Anthocoris nemoralis (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Anthocoridae) sobre huevos de Spodoptera exigua (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae). Entomología mexicana, 3: 221–226.

Argyro, P.K.; Dionyssios, P.L.; Dionyssiios, C.P., Venizelos, Z.A. 2007. Effect of Temperature on Development and Survival of the Parasitoid Pnigalio pectinicornis (Hymenoptera: Eulophidae) Reared on Phyllocnistis citrella (Lepidoptera: Gracillariidae). Environ. Entomol., 36(3): 497-505.

Armer, C.A.; Wiedenmann, R.N., Bush, D.R. 1998. Plant feeding site selection on soybean by the facultative phytophagous predator *Orius insidiosus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata,* 86: 109-118.

Arnold, C.Y. 1960. Maximum-minimum temperatures as a basic for computing heat units. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.,* 76: 682-692.

Artigues, M., Avilla, J, Jauset, A.M., Sarasúa, M.J. 1996. Predators of Cacopsylla pyri in NE Spain. Heteroptera: Anthocoridae and Miridae. *Acta Horticulturae*, 422: 231–235.

Avilla, J.; Bosch, D.; Sarasúa, M. J. 2002. Los depredadores y parasitoides como agentes de cotrol de plagas de cultivos frutícolas. *Phytoma España* 144: 143-145

Baskerville, G.L. & Emin, P. 1969. Rapid estimation of heat acumulation from maximum and minimum temperatures. *Ecology,* 50: 514-517.

Beers, E.H., Brunner, J.F., Willet, M.J., Warner, G.M. (1993) Orchard Pest Management: A Resource Book for the Pacific Northwest. Yakima, WA: Good Fruit Grower.

Belehradek, J. 1935. Temperature and living matter. Protoplasma Monogr. 8, Verlag Gebrüder Brontraeger. Berlín.

Beninato, S. & la Morella, S., 2000. Control of *Cacopsylla pyri* with massive releases of *Anthocoris nemoralis* in pear orchards. GF-2000. *Atti, Giornate Fitopatologiche,* Perugia, 16–20 Aprile, 2000, volume primo. 367–372.

Biondi, A., Mommaerts, V., Smagghe, G., VIñuela, E., Zappala, L., Desneux, N. 2012a. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Management Science*, 68(12): 1523–1536.

Biondi, A., Desneux, N., Siscaro, G., Zappala, L. 2012b. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological agents: Selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere*, 87: 803-812.

Birch, L. C. 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology*, 17: 15-26.

Blacquière, T., Smagge, G., van Gestel, C.A.M, Mommaerts, V. 2012. Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4): 973–992.

Boller, E., Hassan, S.A., Bigler, F., Bogenschutz, H., Brun, J., Chiverton, P., Edwards, P., Mansour, F., Naton, E., Oomen, P.A., Overmeer, W.P.J., Polgar, L., Rieckmann, W., Samspie-Petersen, L., Staubli, A., Sterk, G., Tavares, K., Tuset, J.J., Viggiani, G., Viva, A.G. 1988. The Fourth Joint Pesticide Testing Programme Carried. IOBC/WPRS Bulletin, 105: 321–329.

Boller, E.F. & Gendrier, J.P. 1993. Integrated Production. Principles and Technical Guidelines. Publication of the Commission: "IP-Guidelines and Endorsement". Edited by A. EL TITI, E.F. (ISBN 92-9067-048-0) [96 pp]

Boller, E. F., Avilla J., Gendrier, J. P., Jörg, E., Malavolta, C. 1998. Integrated plant protection in the context of a sustainable agriculture. Integrated production in Europe. IOBC/WPRS Bulletin 21: 1-41.

Broughton, S., Harrison, J., Rahman, T., 2014. Effect of new and old pesticides on *Orius armatus* (Gross)-an Australian predator of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Management Science*, 70(3): 389–397.

Burts, E.C. & Retan, A.H. (1973) Detection of Pear Psylla. Washington State University, Cooperative Extension Service Mimeo 3069,WA: Pullman, 2.

Byers, R.E., Hickey, K.D., Hill, C.H. 1971. Base gallonage per acre. *Virginia Fruit* 60: 19-23.

Brière, J.F., Pracros, P., Le Roux, A.Y., Pierre, J.S. 1999. A novel rate model of temperature-dependent development for arthropods. *Environ. Entomol.*, 28: 22-29.

Brunner, J.F. & Burts, E.C., 1975. Searching behavior and growth rates of *Anthocoris nemoralis* (Hemipetera: Anthocoridae), a predator of the pear psylla, *Psylla pyricola*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 68: 311–315.

Candolfi, M.P., Barret, K.L., Campbell, P.J., Forster, R., Grandy, N., Huet, M.C., Lewis, G., Oomen, P.A., Schmuck, R., Vogt, H., 2000. Guidance document on regulatory testing and risk assessment procedures for plant protection products with non-target arthropods. From the ESCORT 2 Workshop. A joint BART, EPPO/CoE, OECD and IOBC. SETAC, Pensacola, 158.

Candolle, A.P. 1885. Geographique botanique, raisonée. Paris.

Campbell, A.; Frazer, B.D.; Gilbert, N. Gutierrez, A.P., Mackauer, M. 1974. Temperature requirements of some aphids and their parasites. *Journal of Applied Ecology,* 11: 431-438.

Carvalho, L.M., Bueno, V.H.P., Castañé, C., 2011. Olfactory response towards its prey *Frankliniella occidentalis* of wild and laboratory-reared *Orius insidiosus* and *Orius laevigatus*. *Journal of Applied Entomology*, 135(3): 177–183.

Caroli, L, Pasqualini, E. 2004. Laboratory test of the impact of insect growth regulators on Anthocoris nemoralis F. IOBC/Wprs Bulletin, 27(6): 81-86.

CE, 2009. Directiva 2009/127/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009 , por la que se modifica la Directiva 2006/42/CE en lo que respecta a las máquinas para la aplicación de plaguicidas.

CE, 2009. Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas.

CE, 2009. Reglamento (CE) no 1107/2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios en la Unión Europea

Civolani, S. & Pasqualini, E. 2003. *Cacopsylla pyri* L. (Hom., Psyllidae) and its predators relationship in Italy's Emilia-Romagna region. *Journal of Applied Entomology,* 127(4): 214–220.

Civolani, S., Previati, E., Peretto, R., Pasqualini, E., Leis, M. 2007. Preliminary Investigation on the Toxicity of Different Formulations on Some Groups of Beneficial Arthropods in Emilia-Romagna Orchards. *Ital. J. Agron*., 2(2): 157–160.

Civolani, S., 2012. The past and present of pear protection against the pear psylla, *Cacopsylla pyri* L. Insecticides - *Pest Engineering*, 385–408.

Cocuzza, G.E., Clercq, P., Lizzio, S., Van der Veire, M., Tirry, L., Degheele, D., Vacante, V. 1997. Life tables and predation activity of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* a three constant temperatures. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 85: 189-198.

Coexphal. 2012. Asociación de Organizaciones de Productores de frutas y hortalizas de Almería. http://www.coexphal.es (Consulta: 3/8/2012).

Coll, M. 1996. Feeding and ovipositing on plants by an omnivorous insect predator. *Oecologia*, 105: 214-220.

Colomer, I., Aguado, P., Medina, P., Heredia, R.M., Fereres, A., Belda, J.E., Viñuela, E. 2011. Field trial measuring the compatibility of methoxyfenozide and flonicamid with *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) and *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) in a commercial pepper greenhouse. *Pest Management Science*, 67(10): 1237–1244.

Croft, B.A., 1990. Arthropod biological control agents and pesticides. Ed. John Wiley and Sons, New York, 703.

Cullen, E.M. & Zalom, F.G. 2000. Phenology-based field monitoring for consperse stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) in processing tomatoes. *Environ. Entomol.,* 29: 560–567.

Daugherty, M.P., Briggs, C.J., Welter, S.C. 2007. Bottom-up and top-down control of pear psylla (*Cacopsylla pyricola*): Fertilization, plant quality, and the efficacy of the predator *Anthocoris nemoralis*. *Biological Control*, 43(3): 257–264.

Davidson, J. 1944. On the relationship between temperature and rate of development of insect at constant temperatures. *J. Anim. Ecol.,* 64: 26-38.

De Clercq, P. & Degheele, D. (1992) Development and survival of *Podisus aculiventris* (Say) and *Podisus sagitta* (Fab.) (Heteroptera: Pentatomidae) at various constant temperatures. *Can Entomol* 124: 125–133

De Liñán, V. 1998. Entomología agroforestal: (insectos y ácaros que dañan montes, cultivos y jardines. Coordinador, Carlos De Liñán Vicente. Madrid: *Agrotécnica*.

Dempster, J.P. 1963. The natural prey of three species of Anthocoris (Heteroptera: Anthocoridae) living on Broom (Sarothamnus scoparius L.). Entomologia Experimentalis et Applicata, 6(2): 149–155.

Dent, D. 1993. Insect Pest Management. CAB International. UK. 604.

Desneux, N., Decourtye, A.H., Delpuech, J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 81-106.

Eelen, H., Gobin, B., Miles, M. 2006. Field studies to determine the effects of spinosad on the predatory bugs *Anthocoris nemoralis* and *A. nemorum*. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 71(2 Pt B): 429–32.

Emami, M.S. 2017. The effects of plant cover on population of pear psylla (*Cacopsylla pyricola*) and its predators. *Acta agriculturae Slovenica*, 109(1): 71–78.

Erler, F. 2004. Natural enemies of the pear psylla *Cacopsylla pyri* in treated vs untreated pear orchards in Antalya, Turkey. *Phytoparasitica*, 32(3): 295–304.

FAO. 2014. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. (Consulta: 14/7/2017)

Fauna Europaea. 2016. http://www.faunaeur.org (Consulta: 14/7/2017).

Fan, Y., Groden, E., Drummond, F.A. 1992. Temperature-dependent development of Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae) under constant and variable temperatures. *J. Econ. Entomol.,* 85: 1762-1770.

Faivre-D'Arcier, F., Millot, P., Belzunces, L.P. 2001. Lachers inoculatifs d' *Anthocoris nemoralis* F en verger de poiriers. *Phytoma* 544: 76–78.

Fauvel, G., Rieux, R., D'Arcier, F.F., Lyoussoufi, A. 1994. Essai de lutte biologique contre *Cacopsylla pyri* (L.) en verger de poirier par un apport experimental d'*Anthocoris nemoralis* F. au stade oeuf: 1. methodologie. IOBC/WPRS Bulletin 17(2): 81-85.

Ferragut, F. & González Zamora, J. E. 1994. Diagnóstico y distribución de las especies de *Orius* Wolff 1811, peninsulares (Heteroptera, Anthocoridae). *Bol. San. Veg. Plagas,* 20: 89-101.

Fornasari, L. 1995. Temperature effects on the embryonic development of *Aphthona abdominalis* (Coleoptera: Chrysomelidae), a natural enemy of *Euphorbia esula* (Euphorbiales: Euphorbiaceae). *Environ. Entomol.,* 24: 720-723.

France, A., Vogt, H., Vinuela, E. 2003. Working Group Pesticides and Beneficial Organisms. *Proceedings of the Evaluation*, 26(5): 9067–9067.

Franz, J.M., Bogenschütz, H., S. A. Hassan, S.A., Huang, P., Naton, E., Suter, H., Viggiani, G. 1980. Results of a joint pesticide test programme by the working group: pesticides and beneficial arthropods. *Entomophaga* 25 (3): 231-236

García de Otazo, J., Sió, J., Torá, R., Torá, M. 1992. Peral. Control integrado de plagas y enfermedades. Barcelona. Agro Latino, S.L.

García-Ruiz, E., Marco, V., Pérez-Moreno, I. 2011. Effects of Variable and Constant Temperatures on the Embryonic Development and Survival of a New Grape Pest, Xylotrechus arvicola (Coleoptera: Cerambycidae). Physiological Ecology. *Environ. Entomol.,* 40(4): 939-947.

Gómez-Menor, J.M. 1956. Las Tribus de Hemípteros de España. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Trabajos del Instituto Español de Entomología. 140.

Goulson, D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* 50(4): 977–987.

Hagstrum, D.W. & Milliken, G.A. 1991. Modeling Differences in Insect Developmental times between Constant and Fluctuating Temperatures. *Ann Entomol Soc Am* 84 (4): 369-379.

Hassan, S.A. 1985. Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 15(9): 214–255.

Hassan, S., Albert, R., Bigler, F., Blaisinger P., Bogenschütz, H., Boller, E., Brun, J., Chiverton, P., Edwards, P., Englert, W., Huang, P., Inglesfield, C., Naton, E., Oomen, P.A., Overmeer, W. P. J., Rieckmann, W., Samsøe-Petersen, L., Staubli, A., Tuset, J.J., Viggiani, G., Vanwetswinkel, G. 1987. Results of the third joint pesticide testing programme by the IOBC WPRS-Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms" OILB-WPRS Bulletin 17: 1-5.

Hassan, S.A., Bigler, F., Bogenschütz, H., Boller, E., Brun, J., Calis, J.N.M., Chiverton, P., Coremans-Pelseneer, J., Doso, C., Lewis, G.B., Mansour, F., Moreth, L., Oomen, P.A., Overmeer, W.P.J., Polgar, L., Rieckmann, W., Samsøe-Petersen, L., Stäubli, A., Sterk, G., Tavares, K., Tuset, J.J., Viggiani, G. 1991. Results of the fifth joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". *Entomophaga* 36(I): 55-67.

Hassan, S.A. 1994. Activities of the IOBC / WPRS Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms", IOBC /wprs Bull., 17 (10): 1-5.

Hassan, S.A., Bigler, F., Bogenschutz, H., Boller, E., Brun, J., Chiverton, P., Edwards, P., Mansour, F., Naton, E., Oomen, P.A., Overmeer, W.P.J., Polgar, L., Rieckmann, W., Samsøe-Petersen, L., Stäubli, A., Sterk, G., Tavares, K., Tuset, J.J., Viggiani, G., Vivas, A.G. 1998. Results of the fourth joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". *J. Appl. Ent.* 105: 321-329.

Herard, F., 1985. Analysis of parasite and predator populations observed in pear orchards infested by Psylla pyri (L.) (Hom.: Psyllidae) in France. Agronomie, EDP Sciences, 5(9): 773–778.

Herard, F., 1986. Annotated list of the entomophagous complex associated with pear psylla, Psylla pyri (L.) (Hom.: Psyllidae) in France. *Agronomie*, 6(1): 1–34.

Hilbert, D.W. & Logan, J.A. 1983. Empirical model of nymphal development for the migratory grasshopper, *Melanopus sanguinipes* (Orthoptera, Acrididae). *Environ. Entomol.,* 12: 1-5.

Higley, L.G.; Pedigo, L.P.; Ostlie, K.R. 1986. DEGDAY: A program for calculating degree days, and assumptions behind the degree-day approach. *Environ. Entomol.,* 15: 999-1016.

Hone, J. 1992. Rate of increase and fertility control. *Journal of Applied Ecology*, 29: 695-698.

Hooper, D.U., Chapin III, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P. Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, 75(1): 3-35.

Horton, D.R. 1999. Monitoring of pear psylla for pest management decisions and research. *Integrated Pest Management Reviews*, 4(1): 1–20.

Horton, D.R., Lewis, T.M., Broers, D.A. 2004. Ecological and Geographic Range Expansion of the introduced predator *Anthocoris nemoralis* (Heteroptera: Anthocoridae) in North America: potential for nontarget effects? *American Entomologist*, 50(1): 18–30.

Howe, R.W. 1967. Temperature effect on embryonic development in insects. *Ann. Rev. Entomol.,* 12: 15-41.

Jacas, J. & Viñuela, E. 1994. Analysis of a laboratory method to test the side effects of pesticides on adult females of *Opius concolor* (Hym., Braconidae), a parasitoid of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Dip., Tephritidae). *Biocontrol Sci. Technol.*, 4 (2): 147-154.

Jacas, J.; Urbaneja, A., García-Marí, F. 2008. Artrópodos depredadores, 39-56. En: Jacas, J. y Urbaneja, A. [editores]: Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma-España. Valencia.

Jandel Scientific. 1994.TableCurve user's manual. JandelScientific, San Rafael, CA. USA.

Janisch, E. 1925. Über die Temperaturabhängigkeit biologischer Vorgange und ihre Kurvenmassige Analyse. *Pfluger's Archiv. Ges. Physiol.,* 209: 414-436.

Jones, V.P., Doerr, M.D., Brunner, J.F., Baker, C.C., Wilburn, T.D., Wiman, N.G. 2005. A synthesis of the temperature dependent development rate for the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. *J. Insect Sci.,* 5: 24-32.

Jung, S., Yasunaga, T., Lee, S. 2011. Taxonomic review of the genus *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) in the Korean Peninsula. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(1): 64–74.

Karandinos, M.G. 1976. Optimum sample size and comment on some published formulae. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 22: 417–421.

Kvalseth, T.O. 1985. Cautionary note about R^2. *Am. Stat.,* 39: 279–285.

Kim, T., Ahn, J., Lee, J. 2009. Temperature-dependent developmental model of *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari, Phytoseiidae). *J. Appl. Entomol.,* 133(4): 284-291.

Kogan, M. 1998. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annu Rev Entomol. 43: 243-70.*

Lactin, D.J., Holliday, N.J., Johnson, D.L., Craigen, R. 1995. An improved rate model of temperature-dependent development by arthropods. *Environ. Entomol.,* 24: 68-75.

Lamana, M.L. & Miller, J.C. 1995. Temperature-dependent development in a polymorphic lady beetle, *Calvia quatuordecimguttata* (Coleoptera: Coccinellidae) at constant temperature. *Bull. Entomol. Res.,* 88: 785-790.

Lattin, J.D. 1999. Bionomics of the Anthocoridae. *Annual Review of Entomology*, 44: 207-231.

Laughlin, R. 1965. Capacity for increase: a useful population statistic. *Journal of Animal Ecology*, 34: 77-91.

Lefebvre, M. Bostanian, N. J., Mauffette, Y., Racette, G., Thistlewood, H. A., Hardman, J. M. 2012. Laboratory-Based Toxicological Assessments of New Insecticides on Mortality and Fecundity of Neoseiulus fallacis (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Economic Entomology*, 105(3): 866–871.

Letourneau, D.K., Jedlicka, J.A., Bothwell, S.G., Moreno, C.R. 2009. Effects of Natural Enemy Biodiversity on the Suppression of Arthropod Herbivores in Terrestrial Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1): 573–592.

Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal.

Li, D. 1995. Development and survival of *Eriginidium graminicolum* (Sundevall) (Aranea: Lyniphiidae: Erigoninae) at constant temperature. *Bull. Entom. Res.,* 85: 79-91.

Logan, J.A., Wollkind, D.J., Hoyt, S.C., Tanigoshi, L.K. 1976. An analytic model for description of temperature dependent rate phenomena in arthropods. *Environ. Entomol.,* 5: 1133-1140.

Logan, J.A. 1988. Toward an expert system for development of pest simulation models. *Environ. Entomol.,* 17: 359-376.

Lotka, A. J. 1945. Population analysis as a chapter in the mathematical theory of evolution, En: Essays on Growth and Form. Clark, W. E. L. y P. B. Medawar (eds.). Oxford. 355-385.

Lundgren, J.G., Fergen, J.K., Riedell, W.E. 2008. Influence of plant anatomy on oviposition and reproductive success of the omnivorous bug *Orius insidiosus*. *Animal Behaviour.,* 75: 1495-1502.

Madsen, H.F.. W.T.Y., 1964. On Control. California agriculture, 18(2), 2–4.

MAPAMA, 2016. Anuario de estadística agraria. Avance 2016. http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2016-avance/default.aspx (Consulta: 14-7-2017)

MAPAMA. 2017. <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro-determinados-medios-de-defensa-fitosanitaria/ > (Consulta: 10-7-2017).

Marco, V., Taberner, A., Castañera, P. 1997. Development and survival of immature *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Ann. Entomol. Soc. Am.,* 90: 169-176.

Marco, V. 2001. Modelización de la tasa de desarrollo de insectos en función de la temperatura. Aplicación al Manejo Integrado de Plagas mediante el método de grados-día. *Bol. S.E.A.,* 28: 147-150.

Martínez-García, H., Román-Fernández, L.R., Saenz-Romo, M.C., Pérez-Moreno, I., Marco-Mancebón, V.S. 2016. Optimizing *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) as a biological control agent: mathematical models for predicting its development as a function of temperature. *Bulletin of Entomological Research*, 106(2): 215–224.

Martínez-García, H., Saénz-Romo, M.C., Aragón-Sánchez, M., Román-Fernández, L.R., Saénz-de-Cabezón, E., Marco-Mancebón, V.S., Pérez-Moreno, I. 2017. Temperature-dependent development of Macrolophus pygmaeus and its applicability to biological control. *BioControl* 62(4): 1–13.

Medina, P., Budía, F., Del Estal, P., Adàn, A., Viñuela, E., 2003. Side effects of six insecticides on different developmental stages of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). IOBC/wprs Bull. 26(5): 33-40.

Medina, P., Adán, A., Del Estal, P., Budia, F., Viñuela, E. 2008. Integración del control biológico con otros métodos de control. En: Control biológico de plagas agrícolas. Editado por: Jacas, J.A. & Urbaneja, A. Phytoma-España, Valencia, 469-476.

Meyer, J. S., Ingersoll, C.G., McDonall, L.L., Boyce, M.S. 1986. Estimating uncertainty in population growth rates: Jacknife vs. Bootstrap techniques. *Ecology*, 67(5): 1156-1166.

Milliken, G. A. & Johnson, O.E. 1984. Analysis of messy date. Vol. I: designed experiments. Van Nostrand Reinhold, New York. 473.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). 2012. http://www.magrama.gob.es (Consulta: 3/5/2012).

Naciones Unidas, 1987. Report of the World Commission on Environment and Development. Our Common Future. http://www.un-documents.net/our-common-future.pdf.

Novak, H. & Achtziger, R. 1995. Influence of heteropteran predators (Het., Anthocoridae, Miridae) on larval populations of hawthorn psyllids (Hom., Psyllidae). *Journal of Applied Entomology*, 119(1–5): 479–486.

Oerke, E.C. & Dehne, H.W. 2004. Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23(4): 275–285.

Pazini, J. de B., Grützmacher, A.D., Martin, J.F.d.S., Pasini, R.A., Rakes, M. 2016. Selectivity of pesticides used in rice crop on *Telenomus podisi* and *Trichogramma pretiosum*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46(3): 327–335.

Pedigo, L. 1996. Entomology and pest management. 2nd Edition. Ed. Prentice-Hall Inc. New Jersey. 679.

Pericart, J. 1972. Hémiptères. Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l' ouest paléarctique. Faune de l'Europe et du Bassin Méditerranéen, 7. Paris, Masson & Cie.

Plan de acción nacional para el uso sostenible de productos fitosanitarios. http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/121210_PANUSPFF_tcm7-238072.pdf. (Consulta: 14-07-2017)

Potter, C. 1952. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. *Ann. Appl. Biol.*, 39: 1-28.

Pree, D.J., Archibald, D.E., Ker, K.W., Cole, K.J. 1990. Occurrence of pyrethroid resistance in pear psylla (Homoptera: Psyllidae) populations from southern Ontario. *Journal of economic entomology,* 83(6): 2159–2163.

Püntener, W. 1981. Manual for field trials in plant protection, second edition. Agricultural Division, Ciba-GeigyLimited, Basle, Switzerland.

Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios.

Reibisch, J. 1902. Über den Einfluss der temperatur auf die Entwicklung von fischeiern. *Wiss. Meeresuntersuch,* 2: 213-231.

Rieux, R., Fauvel, G., Faivre, D.A., Fournage, G., Lyoussou, W.A. 1994. Study of biological control against *Cacopsylla pyri* (L.) in pear orchards by experimental release of *Anthocoris nemoralis* F. in the egg stage. II. Results and discussion. Bulletin OILB SROP 17(2): 120–124.

Roltsch, W.J., Mayse, M.A., Clausen, K. 1990. Temperature-dependent development under constant and fluctuating temperatures: comparison of linear versus nonlinear methods for modeling development of western grape leaf skeletonizer (Lepidoptera: Zygaenidae). *Environ. Entomol.* 19 (6): 1689-1697.

Sánchez, J.A. & Lacasa, A. 2002. Modelling population dynamics of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to optimize their use as biological control agents of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Bulletin of Entomological Research,* 92: 77-88.

Sanchez, J.A., Acosta, M.A., Ortín, M.C., López, E., Trancón, N.I., Cruz, N.Z. 2010. El control biológico de *Cacopsylla pyri* (Homoptera: Psyllidae) en los cultivos de pera del Noreste de la Región de Murcia, España. *Boletin de Sanidad Vegetal Plagas*, 36(2): 197–207.

Sánchez-Ramos, I. I. 2000. Biología y control de *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781) (Astigmata: Acaridae), plaga de productos almacenados. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas.

Sánchez-Ramos, I., Pascual, S., Fernández, C.E., Marcotegui, A., González-Núñez, M. 2015. Effect of temperature on the survival and development of the immature stages of *Monosteira unicostata* (Hemiptera: Tingidae). *European Journal of Entomology*, 112(4): 664–675.

Sanderson, E.D. & Peairs, L.M. 1913. The relation of temperature to insect life. N.H. Coll. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. Nº 7.

Santas, L.A. 1987. The predators' complex of pear-feeding psyllids in unsprayed wild pear trees in Greece. *Entomophaga*, 32(3): 291–297.

Saulich, A.K. & Musolin, D.L. 2009. Seasonal development and ecology of anthocorids (Heteroptera, Anthocoridae). *Entomological Review*, 89(5): 501–528.

Schaub, L., Garnier, G., Bloesch, B. 2002. An extended laboratory method maximizing plant contact time to study the side-effects of pesticides on plant-dwelling predators. *Journal of Applied Entomology*, 126: 155–158.

Schmidt, J.M., Richards, P.C., Nadel, H., Ferguson, G. 1995. A rearing method for the production of large numbers of the insidiosus flower bug, Orius insidiosus (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). *Can. Entomol*., 127: 445-447.

Schoolfield, R. M., Sharpe, P.J.H., Magnuson, C.E. 1981. Non linear regresion of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. *Journal of Theoretical Biology*, 88: 719-731.

Sevacherian, V., Stern, V.M., Mueller, A.J. 1977. Heat accumulation for timing Lygus control measures on a safflower-cotton complex. *J. Econ. Entomol.,* 70: 399-402.

Shakya, S., Weintraub, P.G., Coll, M. 2009. Effect of pollen supplement on intraguild predatory interactions between two omnivores: The importance of spatial dynamics. *Biological Control,* 50: 281-287.

Shaltiel, L. & Coll, M., 2004. Reduction of Pear Psylla Damage by the Predatory Bug Anthocoris nemoralis (Heteroptera: Anthocoridae): The Importance of Orchard Colonization Time and Neighboring Vegetation. *Biocontrol Science and Technology*, 14(8): 811–821.

Sharpe, P.J.H. y DeMichele, D.W. 1977. Reaction kinetics of poikilotherm development. *J. Theor. Biol.,* 64: 649-670.

Shi, P. y Ge, F. 2010. A comparison of different thermal performance functions describing temperature-dependent development rates. *J. Therm. Biol.,* 35: 225-231.

Sigsgaard, L., Esbjerg, P., Philipsen, H. 2006. Experimental releases of *Anthocoris nemoralis* F. and *Anthocoris nemorum* (L.) (Heteroptera: Anthocoridae) against the pear psyllid *Cacopsylla pyri* L. (Homoptera: Psyllidae) in pear. *Biological Control*, 39(1): 87–95.

Sigsgaard, L. 2010. Habitat and prey preferences of the two predatory bugs *Anthocoris nemorum* (L.) and *A. nemoralis* (Fabricius) (Anthocoridae: Hemiptera-Heteroptera). *Biological Control*, 53(1): 46–54.

Smith, A.M. & Ward, S. 1995. Temperature effects on larval and pupal development, adult emergence, and survival of the pea weevil (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol*., 24: 623-634.

Solomon, M.G., Cranham, J.E., Easterbrook, M.A., Fitzgerald, J.D. 1989. Control of the pear psyllid, *Cacopsylla pyricola*, in South East England by predators and pesticides. *Crop Protection*, 8(3): 197–205.

Solomon, M., Cross, J.V., Fitzgerald, J.D., Campbell, C.A.M., Jolly, R.L., Olszak, R.W., Niemczyk, E., Vogt, H. 2000. Biocontrol of Pests of Apples and Pears in Northern and Central Europe - 3. Predators. *Biocontrol Science and Technology*, 10(2): 91–128.

Souliotis, C. & Moschos, T. 2008. Effectiveness of some pesticides against *Cacopsylla pyri* and impact on its predator *Anthocoris nemoralis* in pear-orchards. *Bulletin of Insectology*, 61(1): 25–30.

Srivastava, M., Bosco, L., Funderburk, J., Olson, S. 2008. Spinetoram is compatible with the key natural enemy of Frankliniella species thrips in pepper. *Plant Health Progress*, (January): 118–2.

Stäubli, A., Hächler, M., Pasquier, D., Antonin, P., Mittaz, C. 1992. Protection integrée et biologique des vergers de poiriers. Dix années d'experiences et d'observations sur le psylle commun du poirier *Cacopsylla* (=Psylla) *pyri* L. en Suisse romande. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture*, 24: 89-104.

Stavrinides, M.C. & Mills, N.J., 2009. Demographic effects of pesticides on biological control of Pacific spider mite (*Tetranychus pacificus*) by the western predatory mite (*Galendromus occidentalis*). *Biological Control*, 48(3): 267–273.

Steiner, H. Altner, G., Celli, G., Schneider, F., Baggiolini, M. 1977. Vers la production agricole intégrée par la lutte intégrée. Bull. OILB/SROP 1977/4, 153.

Sterk, G., Hassan, S.A., Baillod, M., Bakker, F., Bigler, F., Blümel, S., Bogenschüzt, H., Boller, E., Bromand, B., Brun, J., Calis, J.N.M., Coremanspelseneer, J., Duso, C., Garrido, A., Grove, A., Heimbach, U., Hokkanen, H., Jacas, J., Lewis, G.B., Moreth, L., Polgar, L., Roversti, L., Samsøe-Petersen, L., Sauphanor, B., Schaub, A., Stäubli, A., Tuset, J.J., Vainio, A., Veire Van de, M., Viggiani, G., Viñuela, E., Vogt, H. 1999. Results of the seventh joint pesticide testing programme carried out by the IOBC / WPRS-Working Group. "Pesticides and Beneficial Organisms." *BioControl*, 44: 99–117.

Stinner, R.E., Gutiérrez, A.P., Butler, G.D. 1974. An algorithm for temperature-dependent growth rate stimulation. *Can. Entomol.*, 106: 519-524.

Studebaker, G.E. & Kring, T.J. 2003. Effects of insecticides on Orius insidiosus (Hemiptera: Anthocoridae), measured by field, greenhouse and petri dish bioassays. *Florida Entomologist*, 86(2): 178–185.

Sutherland, A.M., Gubler, W.D., Parrella, M.P. 2010. Effects of fungicides on a mycophagous coccinellid may represent integration failure in disease management. *Biological Control*, 54(3): 292–299.

Taberner, A., Castañera, P., Silvestre, E., Dopazo, J. 1993. Estimation of the intrinsic rate of natural increase and its error by both algebraic and resampling approaches. *Computer Applications in the Biosciences*, 9 (5): 535-540.

Tobin, P.C., Nagarkatti, S., Saunders, M.C. 2001. Modelling development in grape berry moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environ. Entomol.,* 30: 692-699.

Tommasini, M.G. & Benuzzi, M. 1996. Influence of temperatura on the development time and adult activity of *Orius laevigatus*. *Bulletin OILB srop,* 19: 179-180.

Torà, R., Sió, J., Sarasúa, M.J., Avilla, J. 1995. Control Integrado de plagas en huertos de manzano y peral en Cataluña. *Fruticultura profesional,* 70: 36-51.

Unruh, T.R. & Higbee, B.S. 1994. Releases of laboratory reared predators of pear psylla demonstrate their importance in pest suppression. IOBC/ WPRS Bulletin 17(2): 146–150.

Vacante, V., Cocuzza, G.E., De Clercq, P., Van De Veire, M., Tirry, L. 1997. Development and survival of *Orius albidipennis* and *O. laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae) on various diets. *Entomophaga,* 42: 493-498.

Van De Veire, M., Sterk, G., Van Der Staaij, M., Ramakers, P.M.J., Tirry, L. 2002. Sequential testing scheme for the assessment of the side-effects of plant protection products on the predatory bug *Orius laevigatus*. *BioControl*, 47: 101-113.

Van der Blom, J. 2008. Pimiento bajo abrigo, 399-409. En: Jacas, J. y Urbaneja, A. [editores]: Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma-España. Valencia.

Van Driesche, R.G.; Hoddle, M. S.; Center, T.D. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Ed. The Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET). USDA. 751.

Van Lenteren, J. C., Bale, J., Bigler, F., Hokkanen, H. M. T., Loomans, A. J. M. 2006. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropods pests. *Annual Review of Entomology,* 51: 609-634.

Vilajeliu, M., Lloret, P., Vilardell, P. 1998. Dinámica poblacional de la psila (*Cacopsylla pyri* L.) y de sus enemigos naturales en plantaciones comerciales de peral de Girona. Boletín de sanidad vegetal. *Plagas*, 24(2): 231–238.

Vilajeliu, M., Casals, M., Vilardell, P. 2004. Métodos de muestreo de poblaciones de psila (*Cacopsylla pyri* L.) en plantaciones comerciales de peral, umbrales de tratamiento y estrategias de defensa. Phytoma-España. nº164: 84-90.

Vogt, H. & Brown, K. 2006. Working Group “Pesticides and Beneficial Organisms”. Proceedings of a Meeting at Debe (Poland), 27-30.

Wanumen Riaño, A.C. 2016. Evaluación del riesgo ecológico de insecticidas utilizados contra plagas hortícolas en el agente de control biológico *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae). Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S.I.A.

Wagner, T.L., Wu, H., Sharpe, P.J.H., Schoolfield, R.M., Coulson, R.N. 1984. Modeling insect development rates: a literature review and application of a biophysical model. *Ann. Entomol. Soc. Am*., 77: 208-225.

Wagner, T.L., Flamm, R.O., Wu, H.I., Fargo, W.S., Coulson, R.N. 1987. Temperature-dependent model of life cycle development of *Ips calligraphus* (Coleoptera: Scolytidae). *Environ. Entomol.* 16:4 97-50.

Zar, J. H. 1984. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.